UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SST

INSERM U930 équipe 2

THÈSE présentée par :

Sylviane Marouillat

soutenue le : **Mercredi 02 Février 2011**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

Etudes des variations structurales chromosomiques dans l'autisme et la déficience mentale.

THÈSE dirigée par :

Mr ANDRES Christian	PU-PH, Université François - Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme DAVID Véronique	PU-PH, Université de Rennes I
Mr STURTZ Franck	PU-PH, Université de Limoges

Jury :

Mme DAVID Véronique	PU-PH, Université de Rennes I
Mr STURTZ Franck	PU-PH, Université de Limoges
Mme BONNET BRILHAULT Frédérique	MCU-PH, Université François - Rabelais, Tours
Mr ANDRES Christian	PU-PH, Université François - Rabelais, Tours

A mes enfants

Remerciements

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

Merci au Professeur Véronique David, de l'université de Rennes I, et au Professeur Franck Sturtz, de l'université de Limoges, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Merci également au Docteur Frédérique Bonnet-Brilhault de l'Université de Tours pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au Professeur Christian Andres, pour avoir accepté de diriger cette thèse et dont les conseils m'ont été précieux sur le plan scientifique. Je tiens également à le remercier pour la confiance et la sympathie qu'il m'a témoignées au cours de ces années de thèse mais aussi depuis que je travaille dans son équipe.

Merci également au Professeur Denis Guilloteau, directeur de l'unité INSERM 930, pour m'avoir encouragé à faire cette thèse et pour son soutien dans ma carrière au sein de l'INSERM.

Un grand merci au Dr Patrick Vourc'h qui m'a accordé du temps en relisant attentivement ce manuscrit mais aussi durant la rédaction de la publication des travaux. Je tiens aussi à te remercier pour tes conseils, ta gentillesse et ta disponibilité. C'est très agréable et rare de travailler avec quelqu'un comme toi, tes qualités scientifiques et humaines sont précieuses et sont un moteur pour l'équipe.

Je tiens également à remercier le Dr Frédéric Laumonnier, pour ses remarques et ses suggestions qui m'ont permis d'enrichir mes travaux et d'apporter des améliorations à la rédaction du mémoire de thèse. J'ai apprécié les discussions scientifiques et mais aussi les échanges autour d'un café. Ton dynamisme dans le développement des projets scientifiques et au sein de l'équipe nous fait tous avancer.

Je remercie Gaëlle qui après un passage dans l'équipe, lors de son master2, est revenue parmi nous en Post-Doc. Je te remercie pour la patience que tu as eue en relisant ce pavé et pour

l'attention que tu y as consacrée. Merci aussi pour ton soutien dans la dernière ligne droite de ce travail. Je te souhaite bonne chance dans ta nouvelle vie professionnelle ainsi que dans ta vie personnelle.

Un immense merci (le mot est faible) aux deux « petites mains » du laboratoire, en fait ce sont les mains en or du laboratoire sans qui la recherche de l'équipe n'avancerait pas aussi vite. Cathy et Rose-Anne, merci pour votre amitié, votre écoute et votre soutien dans les moments difficiles. Merci pour l'ambiance de travail que vous savez rendre chaleureuse, pour votre bonne humeur, pour les discussions durant la pause café et les repas où on refait le monde. J'espère que l'on continuera encore longtemps à travailler ensemble.

Je remercie chaleureusement Julie et Hélène pour leur sympathie et l'aide qu'elles m'ont apportée dans le traitement statistique de mes données. Julie c'est toi la prochaine sur la liste, tu peux compter sur mon aide.

Je voudrais remercier tous les stagiaires qui ont participé avec dynamisme à ce travail notamment Saskya, Elodie, Claire et Vincent.

Je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien durant cette période.

Merci à Gérald pour notre avenir.

Enfin je voudrais remercier les deux êtres que j'ai de plus chers au monde, mes deux trésors, Quentin et Dorian. C'est grâce à vous que je n'ai pas baissé les bras durant les moments difficiles de ces derniers mois. Vous me donner la force de toujours aller de l'avant. J'espère que vous serez fier de votre maman.

Résumé

L'autisme et la déficience mentale sont deux syndromes neuro-développementaux impliquant des facteurs génétiques. Notre travail a consisté à rechercher de nouveaux gènes candidats ou facteurs de susceptibilité dans ces deux pathologies. Nous avons étudié deux cohortes de patients : 106 atteints d'autisme et 68 de déficience mentale non syndromique sporadique

Nous avons observé une association entre l'allèle 4 d'un marqueur microsatellite *GXAlu* localisé en 17q11.2 dans l'intron 27b du gène *NF1* et des patients atteints de déficience mentale non-syndromique.

Nous avons contribué à la mise en évidence d'une augmentation d'expression du transcrit NLGN4X, chez un patient autiste avec un retard mental non-syndromique présentant une mutation dans le promoteur du gène *NLGN4X*.

L'étude de la région 22q13 par MLPA, nous a permis de mettre en évidence une délétion *de novo* d'au moins 1Mb chez un patient autiste.

Les variations de nombre de copies de l'ADN (CNV) ont été étudiées chez des autistes par QPCR. Nous avons identifié 27 variations réparties sur 17 gènes parmi les 36 explorés. Les CNV observés dans les gènes *ITGA6, TAGLN3, HOXA1, DLG4* et *UBE2C* sont intéressantes en raison de l'implication de ces gènes dans le développement cérébral ou la fonction neuronale.

L'ensemble de ces résultats nécessite des expériences complémentaires de validation.

Mots clés : autisme, déficience mentale, microsatellite, étude d'association, étude d'expression, gène *NLGN4X*, région 22q13, variations de nombre de copies de l'ADN (CNV), MLPA, QPCR.

Résumé en anglais

Autism and mental retardation are two neurodevelopmental syndromes involving genetic factors. Our work consists in finding new candidate genes or susceptibility factors. 106 autistic patients and 68 sporadic non-syndromic mentally retardated patients were studied.

We have shown an association between allele 4 of a microsatellite marker *GXAlu* localized in 17q11.2, in intron 27b of the *NF1* gene and patients with non-syndromic mental retardation.

We contributed to the study on the *NLGN4X* gene. We demonstrated an increase of expression of the NLGN4X transcript, in an autistic patient with non-syndromic mental retardation linked to a mutation in the *NLGN4X* gene promoter.

We study the 22q13 region with the MLPA method, we have demonstrated a deletion *de novo* of at least 1Mb in an autistic patient.

The copy number variations (CNV) have been investigated in an autistic population by QPCR. We identified 27 variations on 17 genes among the 36 investigated. The CNV observed in *ITGA6*, *TAGLN3*, *HOXA1*, *DLG4* and *UBE2C* genes are interesting because of the involvement of these genes in brain development or neuronal function.

These results require further experiments for validation.

Keywords: autism, mental retardation, microsatellite, association study, expression study, *NLGN4*X gene, 22q13 region, copy number variations (CNV), MLPA, QPCR.

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 5
Résumé en anglais 6
Liste des tableaux 12
Liste des figures 13
Liste des annexes 15
INTRODUCTION 16
Préambule 17
Première partie : Le syndrome autistique 18
I. Historique d'une maladie complexe 19
II. Définitions 21
A. Les signes cliniques 21
B. La Classification 22
C. Les troubles envahissants du développement (TED) 24
III. Epidémiologie 25
A. Prévalence 25
B. Influence du sexe et de la génétique 26
C. Influence de l'origine ethnique, de la géographie et du milieu social 26
D. Influence des pathologies et troubles associés 27
IV. Etiologie 27
A. La neurobiologie de l'autisme 28
1. Les données neuroanatomiques 28
a) Le volume cérébral 29
b) Anomalies microscopiques 30
c) Les anomalies observées dans les structures cérébrales 31
2. Les données neurochimiques 33
a) Le système sérotoninergique 33
b) Le système dopaminergique et les catécholamines 35
c) L'acétylcholine 36
d) Les systèmes glutamatergique et GABAergique 36
e) L'ocytocine 37
f) La mélatonine 38

B. Les données environnementales 39
1. Les intoxications 39
2. Les infections 40
3. Les facteurs immunologiques 40
4. La vaccination 41
C. La Génétique de l'autisme 41
1. Les études de jumeaux et de familles 42
2. Les maladies génétiques et anomalies chromosomiques associées 43
a) Les syndromes génétiques 43
b) Les anomalies chromosomiques 47
c) Les maladies métaboliques 49
Deuxième partie : La déficience mentale 50
I. Un peu d'histoire 51
II. Définitions 52
A. La classification 52
3. Le DSM-IV-TR 52
4. La CIM-10 53
5. La CFTMEA-R 53
6. La classification selon le QI 53
7. Les tests psychométriques 54
B. Prévalence 54
III. Etiologie 55
A. Les causes environnementales 57
B. Les causes génétiques 58
1. Les anomalies chromosomiques 58
2. Les maladies monogéniques 61
Troisième partie : Stratégies d'indentification de nouveaux gènes dans l'autisme et la déficience mentale 66
I. Introduction 67
II. Les études de liaison 68
A. Le principe 68
B. Les résultats des études de liaison par criblage du génome entier 69
1. Les études de liaison dans l'autisme 70
2. Les études de liaison dans la déficience mentale 71

III. Les études d'association 73
A. Le principe 73
B. Les résultats des études d'association dans l'autisme 74
1. L'approche par criblage du génome entier (GWA) 74
2. L'approche par l'étude de gènes candidats 75
C. Les résultats des études d'association dans la déficience mentale 77
IV. Les études des variations structurales du génome 78
A. Les mécanismes responsables de variations structurales génomiques 78
1. Les recombinaisons homologues non alléliques (NAHR) 80
2. Les jonctions d'extrémités non homologues (NHEJ) 82
3. Le mécanisme FoSTeS 84
B. Les polymorphismes du nombre de copies (CNV) 85
1. Les caractéristiques des CNV 85
2. Techniques d'analyses des réarrangements génomiques 87
3. Les CNV dans l'autisme et la déficience mentale 89
a) Les CNV dans l'autisme 90
b) Les CNV dans la déficience mentale 93
OBJECTIFS DE CE TRAVAIL 98
MATERIELS ET METHODES 101
I. Les Populations étudiées 102
A. La population autiste 102
B. La population avec déficience mentale 103
C. La population d'individus témoins 104
D. L'extraction d'ADN 104
II. Etude du marqueur GXAlu dans le retard mental 105
A. Le clonage des allèles de GXAlu 105
B. La culture cellulaire et la transfection 106
C. L'extraction d'ARN totaux 107
D. La transcription inverse (RT) 107
E. La RT-PCR quantitative en temps réel (RT-QPCR) 108
F. Le séquençage d'ADN 108
1. Le principe 108
2. Le protocole 109
G. La dHPLC 109

1. Le principe 109
2. Application au génotypage du microsatellite GXAlu 110
III. Amplification multiples de sondes dépendantes d'une ligation (MLPA) et étude de la région 22q13 112
A. Le principe 112
B. Le protocole 113
C. L'analyse des données 114
IV. Etude de CNV par PCR quantitative en temps réel (QPCR) 115
A. Le principe 115
B. Les courbes de fusion 116
C. L'efficacité de QPCR 117
D. L'Analyse des données 117
E. Le protocole de quantification 118
RESULTATS 119
I. Etude d'association entre un polymorphisme d'une séquence Alu et la déficience mentale. 120
II. Approche gène candidat : NLGN4X et autisme 127
III. Exploration de la région chromosomique 22q13 dans l'autisme 134
A. Introduction 134
B. Résultats des analyses par MLPA 135
C. Analyse par QPCR 137
IV. Etude des variations de nombre de copies par PCR quantitative en temps réel chez une population d'autistes. 140
A. Introduction 140
B. L'optimisation de la méthode 142
1. Le choix du kit de QPCR 142
2. Validation méthodologique de la QPCR pour la recherche de polymorphismes de nombre de copies. 145
a) Recherche de CNV dans 6 gènes localisés sur le chromosome X. 145
b) Recherche de CNV dans le gène SOD. 148
C. Etude de CNV chez des patients autistes 150
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 154
CONCLUSION 167
BIBLIOGRAPHIE 171

Sites web consultés 192
ANNEXES 193
Annexe 1 : Tableau des amorces de QPCR avec leur localisation 194
Annexe 2 : Séquence des amplicons de QPCR 196
Annexe 3 : Paramètres de QPCR pour les 30 gènes autosomiques étudiés. 200
Annexe 4 : Publications et Communications scientifiques 203

Liste des tableaux

Tableau 1 : Correspondance entre la CIM-10, le DSM-IV-TR, la CFTMEA-R 23
Tableau 2: Les cinq troubles envahissants du développement..... 24
Tableau 3 : Estimation de la prévalence des troubles envahissants du développement..... 26
Tableau 4 : Maladies génétiques associées à l'autisme..... 43
Tableau 5 : Causes principales de retard mental et leur fréquence 56
Tableau 6 : Risque de récurrence de déficience mentale liée à des mutations monogéniques en fonction du mode de transmission..... 61
Tableau 7 : Exemples de gènes impliqués dans les déficiences mentales syndromiques et non syndromiques 65
Tableau 8 : Liste des gènes associés à l'autisme et leur fonction. 76
Tableau 9 : Variations structurales génomiques issues de NAHR et NHEJ 79
Tableau 10 : Polymorphismes répertoriés dans la DGV 86
Tableau 11 : Microdélétions et microduplications interstitielles associées au retard mental. . 95
Tableau 12 : Les critères diagnostique selon le questionnaire F84.0 [299.00] concernant les troubles autistiques, d''après le mini DSM IV,. 103
Tableau 13: Liste des allèles GXAlu..... 106
Tableau 14: Liste des amorces utilisées pour l'analyse par RTqPCR 108
Tableau 15: Liste des amorces utilisées pour l'analyse par dHPLC..... 111
Tableau 16 : Liste des gènes de la région 22q13 étudiés par MLPA. 135
Tableau 17 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de QPCR 137
Tableau 18 : Liste des gènes étudiés en QPCR et leur fonction 141
Tableau 19 : Analyse statistique par le test de Wilcoxon des données normalisées de QPCR des gènes localisés sur le chromosome X. 148
Tableau 20 : Efficacités de QPCR des gènes étudiés..... 150
Tableau 21 : Analyse de CNV et valeurs de QPCR.. 152
Tableau 22 : Bilan des analyses de CNV par QPCR dans notre banque de patients autistes 153
Tableau 23 : Fréquence des CNV dans la région 22q13 160

Liste des figures

Figure 1 : Schéma d'une coupe sagittale du cerveau humain 29
Figure 2 : Régions du chromosome 15 impliquées dans les syndromes d'Angelman et de Prader-Willi et dans l'autisme. 46
Figure 3 : Représentation générale de toutes les régions cytogénétiques d'intérêt associées à l'autisme. 48
Figure 4: Répartition des causes de déficience mentale. 57
Figure 5 : Principale causes génétiques de la déficience mentale. 58
Figure 6: Schéma simplifié de trois cas d'anomalies de structure chromosomique. 60
Figure 7 : Formes syndromiques de DMX ainsi que les gènes en cause. 63
Figure 8 : Modèle génétique. A polygénique à seuil. B mixte. 67
Figure 9 : Régions de susceptibilité à l'autisme. 71
Figure 10 : Idéogramme du chromosome X avec la position des 50 pedigrees DMX.. 72
Figure 11 : Diagramme de distribution des loci ou gènes pouvant être corrélés à l'autisme... 74
Figure 12 : Répartition des différents types de mutations identifiées dans les gènes humains à l'origine des maladies génétiques.. 78
Figure 13 : Mécanisme de recombinaison homologue non allélique, NAHR 80
Figure 14 : Schéma d'une séquence *Alu*.. 83
Figure 15 : Réparation de cassures double brin par NHEJ 83
Figure 16 : Mécanisme FoSTeS.. 85
Figure 17 : Distribution des CNV en fonction de leur taille d'après la DGV. 87
Figure 18 : Résolution des techniques d'analyse de l'ADN 89
Figure 19 : Distribution des CNV dans l'autisme.. 91
Figure 20 : Distribution des CNV responsables de retard mental syndromique et non syndromique.. 97
Figure 21: Cartographie du vecteur d'expression pCAT3® promoter® 105
Figure 22: Principe de la technique MLPA 113
Figure 23 : Exemple d'électrophérogramme obtenu par la technique MLPA pour un échantillon d'ADN. 114
Figure 24 : Schéma du gène *NF1* (haut) et grossissement de l'intron 27b (bas). 121
Figure 25 : Localisation des NLGN3 et NLGN4 au niveau d'une synapse glutamatergique.. 127
Figure 26 : Schéma de la région 22q13. 134

Figure 27 : Graphique montrant les données normalisées de MLPA.. 136
Figure 28 : Histogramme représentant les données de MLPA du patient ayant une délétion dans la région 22q13.. 137
Figure 29 : Paramètres de QPCR pour les gènes étudiés dans la région 22q13..... 138
Figure 30 : Analyse de la région 22q13 par QPCR chez des patients autistes..... 139
Figure 31 : Cartographie des gènes étudiés par QPCR. 140
Figure 32 : Analyses QPCR des gènes *HEM3* et *ALB*.. 143
Figure 33 : Quantité relative d'ADN évaluée par QPCR pour les gènes *GRIA3* et *NLGN4X*.. 144
Figure 34 : Localisation des gènes étudiés par QPCR sur le chromosome X. 145
Figure 35 : Analyse des paramètres de QPCR. 146
Figure 36 : Analyse de CNV par QPCR pour les gènes *GRIA3, NLGN4X, NLGN3, PTCHD1, UPF3B* et *UBE2A*..... 147
Figure 37 : Analyse de CNV dans le gène *SOD1* par QPCR.. 149
Figure 38 : Analyse des CNV par QPCR dans 6 gènes du chromosome X. 150
Figure 39 : Analyse des CNV par QPCR dans 30 gènes autosomiques. 151

Liste des annexes

Annexe 1 : Tableau des amorces de QPCR avec leur localisation..... 194
Annexe 2 : Séquence des amplicons de QPCR 196
Annexe 3 : Paramètres de QPCR pour les 30 gènes autosomiques étudiés. 200
Annexe 4 : Communications scientifiques..... 203

INTRODUCTION

Préambule

Les recherches sur la génétique de l'autisme se sont développées de manière exponentielle ces vingt dernières années. Une riche moisson de données a été accumulée. Cependant malgré ces efforts, le développement de grands consortiums ainsi que les évolutions technologiques, les causes de l'autisme demeurent inconnues chez une majorité de patients. De plus, les mécanismes physiopathologiques restent largement hypothétiques. Le retard mental présent chez 70% des patients autistes et le constat de gènes impliqués simultanément dans les deux pathologies ont introduit la notion de continuum entre l'autisme et la déficience mentale. Notre travail s'inscrit dans ce contexte, nous nous sommes attachés à rechercher des facteurs de susceptibilité dans l'autisme et la déficience mentale.

Cette thèse s'inscrit également dans un contexte professionnel particulier. En effet, ingénieur d'études au sein du laboratoire de l'équipe 2 de l'unité INSERM 930 depuis plusieurs années, j'ai participé aux différents projets de recherche de l'équipe. J'ai été encouragée par mon responsable d'équipe le Professeur Christian Andres à valoriser mon expérience par un doctorat de 3ème cycle.

Le manuscrit a été construit autour d'une introduction en 3 parties, les deux premières sont consacrées à un état des lieux de l'autisme puis de la déficience mentale. La troisième partie développe les stratégies d'identification de gènes candidats dans ces deux pathologies. Cette dernière section consacre un paragraphe aux variations de nombre de copies de l'ADN, qui est le thème majeur de notre travail.

Un deuxième chapitre est consacré aux matériels et méthodes et développe les techniques employées au cours de ces travaux.

Un troisième chapitre concerne les résultats de ce travail. Cette partie rapporte les données de quatre études qui ont été menées pendant cette thèse. Une partie des résultats a été publiée ou est en cours de publication, ils apparaissent sous forme d'article. Une seconde partie de résultats, qui a nécessité une mise au point technique importante, en cours de validation est également présentée. Ces résultats feront l'objet d'une future publication.

Les chapitres discussion et conclusion terminent ce manuscrit.

Première partie :

Le syndrome autistique

I. Historique d’une maladie complexe

Le mot autiste vient de la racine grecque autos qui signifie « soi-même ». Il a été employé pour la première fois en 1911 par le psychiatre suisse Eugen Bleuler, lorsqu’il a décrit les symptômes de patients schizophrènes repliés sur eux mêmes.

Par la suite, en 1943, Leo Kanner psychiatre américain d’origine allemande a réutilisé ce concept d’autisme pour caractériser le comportement de 11 enfants. Ces enfants présentaient un ensemble de symptômes particuliers que Kanner a regroupé en sept caractéristiques essentielles: la solitude, les obsessions pour des routines, une mémoire extraordinaire, l’écholalie, une sensibilité aux stimuli, une gamme d’intérêts limitée, une intelligence normale.

Selon Kanner: «l’autisme est une incapacité innée à établir le contact affectif habituel avec les personnes, biologiquement prévue, exactement comme d’autres enfants viennent au monde avec des handicaps physiques ou intellectuels». Kanner a attribué l'étiologie de l’autisme de ces enfants principalement à l’attitude des parents et à la qualité des contacts des parents avec leurs enfants, sans pour autant exclure la transmission héréditaire de certains caractères.

A la même période une étude est menée chez 4 enfants par un médecin autrichien, Hans Asperger, qui relate des caractéristiques de comportement apparentées à celles observées par Kanner. Il appelle ce syndrome «psychopathie autistique». Toutefois les patients observés par Asperger, contrairement à ceux de Kanner, s’exprimaient bien verbalement mais avaient un léger handicap en termes de motricité globale. Ce trouble décrit par Asperger en 1943 est actuellement classé, comme l’autisme de Kanner, parmi les troubles envahissants du développement (TED).

En 1966 Andreas Rett décrit un comportement de type autistique chez un groupe de patients, exclusivement des filles. Ce syndrome est caractérisé aussi par une atteinte neurologique (ataxie, stéréotypies manuelles caractéristiques, spasticité). Le développement de ces enfants était normal jusqu’à l'âge de 5-6 mois puis régressait brutalement. Ce syndrome a ensuite été classé dans les TED et son étiologie génétique découverte en 2000.

Dans les années 50, Bruno Bettelheim a eu une influence considérable sur les tentatives d’explication de ce syndrome complexe. Selon Bettelheim l’autisme serait dû à un

problème de relation mère/enfant, d'où la théorie des « mères réfrigérateurs ». Un enfant deviendrait autiste à cause d'une insécurité affective et un manque d'amour de sa mère. Cette théorie accentue la responsabilité des parents dans la maladie, laquelle fut préalablement mise en cause par Kanner. Cette philosophie de pensée qui a perduré jusqu'à la fin des années 60, a longtemps culpabilisé les parents et notamment les mères d'enfants autistes.

En 1968 une étude de Rutter marque un tournant dans la façon de concevoir l'autisme, elle constitue la base des conceptions développées de nos jours. L'analyse des observations faites sur l'autisme et des symptômes décrits a conduit Rutter à proposer une classification plus scientifique. Trois grandes catégories de symptômes devant apparaitre avant l'âge de trois ans sont ainsi établies:

- des problèmes de socialisation
- des troubles de la communication plutôt au niveau qualitatif que quantitatif
- un manque d'imagination manifesté par des intérêts restreints ou des comportements rituels.

Parallèlement, le terme d'autisme apparaît pour la première fois dans la deuxième édition du manuel de diagnostic et de classification des troubles mentaux (DSM-II) de l'association psychiatrique américaine, où l'autisme est classé dans les psychoses infantiles. Cette classification permet aux utilisateurs et aux acteurs impliqués d'adopter un langage commun. Les premières versions du DSM restent cependant sous forte influence psychanalytique. La version III du DSM publié en 1980 abandonne le versant psychanalytique pour le côté biomédical et range l'autisme dans la catégorie des troubles envahissants du développement (TED) sous l'appellation d'autisme infantile.

En 1977 les docteurs Susan Folstein et Michael Rutter publient la première étude de jumeaux autistes, établissant la preuve d'une base génétique de l'autisme.

II. Définitions

A. Les signes cliniques

L'autisme est un trouble du développement caractérisé par des altérations de la communication verbale et non verbale, du contact et des relations sociales ainsi que des comportements et activités répétitifs et restreints. Ces symptômes apparaissent avant l'âge de 3 ans et sont regroupés sous l'appellation « triade autistique ». Plus précisément des anomalies de comportement sont constatées envers les objets ou les personnes et dans certains secteurs du développement tel que le langage, la motricité, les capacités sensorielles et cognitives, la compréhension et l'expression des émotions.

L'enfant autiste établit rarement le contact et semble même l'éviter, l'évitement du regard est caractéristique. Il n'exprime pas ses émotions par la mimique et est incapable de comprendre celles d'autrui, de même pour l'imitation des gestes simples lors de jeux ou d'activités. Le langage expressif est absent ou retardé, certaines particularités telles que les écholalies sont fréquemment observées. La communication non verbale par les gestes ou les mimiques reste limitée. L'activité est pauvre, répétitive et stéréotypée comme par exemple aligner un nombre déterminé de jouets toujours dans le même ordre. On peut observer certains troubles sensoriels notamment au niveau auditif, ils peuvent se traduire par une hyper ou une hypo sensibilité aux bruits. On rencontre par ailleurs des perturbations du traitement des informations sensorielles, caractérisées par une réactivité particulière aux stimulations visuelles (fascination pour certaines lumières), gustatives (des manies alimentaires), auditives (intolérance au bruit et à certaines fréquences), ou encore au toucher (développement d'aversion ou d'attirance pour certains tissus). Les enfants autistes peuvent avoir des réactions d'angoisse, de colère ou d'agressivité disproportionnées face au changement de leur environnement quotidien. L'activité motrice peut être réduite ou augmentée, des attitudes posturales inhabituelles (la marche en écartant les bras) sont souvent observées. Par ailleurs, des troubles du sommeil, insomnies ou réveils nocturnes sont fréquents chez ces enfants.

La plupart des enfants autistes présentent un retard mental associé, leur quotient de développement est inférieur à 70, actuellement la proportion est estimée à 75% (Volkmar *et al.*, 2003). Lorsque que le retard mental est important, le problème du diagnostic de l'autisme peut se poser car le retard mental peut masquer certains signes propres à l'autisme.

De même, une épilepsie est observée chez 12 à 39% des patients autistes (Hara, 2007) alors que la prévalence de l'épilepsie est estimée entre 0,5 et 1% dans la population générale (Hauser W.A. *et al.*, 1991).

B. La Classification

Les causes de l'autisme sont, à ce jour, le plus souvent inconnues et restent sujettes à polémique en l'absence de marqueur objectivement mesurable et quantifiable. Les groupes de patients sont très hétérogènes; d'un point de vue cognitif et comportemental, les symptômes sont variables selon la gravité de la maladie. Depuis la première définition de l'autisme par Kanner en 1943 et jusqu'à nos jours, les spécialistes n'ont eu de cesse d'affiner et d'améliorer leurs critères de diagnostic afin d'établir une classification consensuelle qui puisse être utilisée par toute la communauté scientifique et médicale.

Actuellement, en France, le diagnostic de l'autisme repose sur 3 échelles de classification (Tableau 1) basées sur une description comportementale des troubles puisqu'il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique, moléculaire ou cellulaire. Ces trois échelles sont:

- Le DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders), rédigé par l'American Psychiatric Association. Le trouble autistique n'apparaît que dans la 3ème version. La version utilisée actuellement est la version IV révisée (DSM-IV-TR, 2000), qui fait apparaître l'autisme dans la catégorie des troubles envahissants du développement (TED). La 5ème version est en cours de rédaction.
- La CIM-10 (Classification Internationale des Maladies), dépend de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). La dernière version date de 1992 (ICD-10). Selon cette classification l'autisme est considéré comme un handicap et non une maladie.
- La CFTMEA est la classification Française des Troubles Mentaux de l'Enfant et de l'Adolescent. Elle a été établie à partir de travaux français, la 2ème version est parue en 2000 (CFTMEA-R-2000) et reste la version actuellement employée.

Tableau 1 : Correspondance entre la CIM-10, le DSM-IV-TR, la CFTMEA-R pour les différentes catégories de TED, d'après les recommandations de la FFP, HAS 2005

CIM-10	DSM-IV-TR	CFTMEA-R
• **Autisme infantile**	• **Trouble autistique**	• **Autisme infantile précoce - type Kanner**
• **Syndrome de Rett** • **Autre trouble désintégratif de l'enfance**	• **Syndrome de Rett** • **Trouble désintégratif de l'enfance**	• **Troubles désintégratifs de l'enfance**
• **Syndrome d'Asperger**	• **Syndrome d'Asperger**	• **Syndrome d'Asperger**
• **Autisme atypique** • **Autres TED**	• **Trouble envahissant du développement non spécifié (y compris autisme atypique)**	• **Autres formes de l'autisme** • **Psychose précoce déficitaire. Retard mental avec troubles autistiques ou psychotiques** • **Autres psychoses précoces ou autres TED** • **Dysharmonies psychotiques**
• **Hyperactivité associée à un retard mental et à des mouvements stéréotypés**	-	-

Le DSM-IV et la CIM-10 sont deux classifications reconnues internationalement et les critères sont sensiblement les mêmes, malgré des termes quelque fois différents. La CIM-10 n'est cependant pas limitée, contrairement aux deux autres classifications, aux maladies mentales mais s'étend à l'ensemble des maladies.

Les principaux instruments de diagnostic et d'évaluation clinique de l'autisme sont la CARS (Childhood Autism Rating Scale, Schopler *et al.*, 1980) qui est une échelle d'observation, l'ADI (Autism Diagnostic Interview) et l'ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised) (Lord *et al.*, 1994) qui sont des outils d'entretien semi-structuré et l'ADOS-G (Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic) (Lord *et al.*, 2000) qui est un outil d'observation semi-structuré. Notre unité de recherche a aussi développé un outil d'évaluation des comportements autistiques, la BSE-R (Behavioral Summarized Evaluation-

Revised) (Barthélémy *et al.*, 1997) qui est particulièrement adaptée pour les enfants présentant un comportement atypique.

C. Les troubles envahissants du développement (TED)

Comme nous venons de le voir dans les classifications DSM-IV, CIM-10 et CFTMEA-R, l'autisme appartient à la catégorie des troubles envahissants du développement. Cependant l'étude de la littérature fait apparaître plusieurs termes concernant l'autisme et les TED prêtant souvent à confusion. Ainsi certains auteurs parlent d'autisme classique, de spectre autistique, de troubles autistiques ou encore d'autisme de haut niveau pour désigner certains TED. Le terme autisme est souvent employé pour désigner l'autisme au sens de Kanner, mais aussi de façon plus générale pour tous les TED. Il est important de définir chaque terme afin d'être le plus rigoureux possible dans la classification de ces troubles.

Les TED sont des troubles neurologiques responsables d'anomalies du développement qui touchent la communication, les interactions sociales, les comportements, les activités et les intérêts. Ils forment un continuum dont la gravité des symptômes ou des déficiences varie. Le Tableau 2, issu du DSM IV-R, propose une classification spécifique des TED.

Tableau 2: Les cinq troubles envahissants du développement répertoriés selon le DSM-IV-R

TED	**Caractéristiques**
Désordre désintégratif de l'enfance (DDE)	• Détérioration importante du langage, du jeu, des comportements sociaux et adaptatifs après une période de développement normal de trois ans ou plus. • Grave déficience mentale
Syndrome de Rett	• Touche presque exclusivement les filles • Régression importante après une période de développement normal • Grave retard du langage et des capacités psychomotrices • Grave déficience mentale
Trouble autistique	• Trouble de la communication verbale et non verbale • Altération des interactions sociales • Comportements inhabituels, activités restreintes • Début avant l'âge de 3 ans
TED non spécifié	• Autisme atypique • Troubles graves et envahissants dans certains domaines, tels que l'interaction sociale réciproque, ou des activités et des intérêts restreints, mais absence des symptômes stricts du trouble autistique
Syndrome d'Asperger	• Troubles variables (de légers à graves) qui touchent l'interaction sociale réciproque et la compréhension des situations sociales • Activités répétitives et intérêts restreints • Aucun retard du langage ou du développement intellectuel • Troubles de la communication

Cependant l'autisme et les autres troubles envahissants du développement tendent aujourd'hui à être regroupés sous l'appellation générique de troubles du spectre de l'autisme (TSA ou ASD pour Autism spectrum disorder) (Allen DA., 1988), même s'il reste des distinctions au sein de ce spectre. Selon une publication de Juillet 2009 de l'association Autisme-Europe, le terme de diagnostic TSA remplace les termes « autisme » ou encore « TED » afin de mettre l'accent sur la spécificité des troubles du développement social et la grande variabilité des symptômes individuels.

III. Epidémiologie

A. Prévalence

Un état des lieux sur l'autisme et les TED en France, a été publié en janvier 2010 par la Haute Autorité pour la Santé (HAS). La prévalence de l'autisme «nu» y est estimée, d'après une méta-analyse de Fombonne (2009) à 0,2% et celle de l'ensemble des TED est d'environ 0,6%. Les données incluses dans le Tableau 3 mettent en évidence une augmentation de la prévalence d'un facteur 3 en dix ans pour l'autisme et l'ensemble des TED. Cette évolution peut s'expliquer par l'évolution des critères de diagnostic, une analyse plus fine de la variabilité phénotypique et une meilleure connaissance des troubles.

Tableau 3 : Estimation de la prévalence des troubles envahissants du développement d'après le site internet http://www.has-santé.fr

	Fombonne, 1999 (15)	Inserm, 2002 (19)	Fombonne, 2003 (16)	Fombonne, 2005 (17)	Fombonne, 2009 (18)
Nombre d'études incluses dans la revue	23	31	32	40	43
TED	18,7/10 000	27,3/10 000	27,5/10 000	37/10 000	**63,7/10 000**
Autisme infantile	7,2/10 000	9/10 000	10/10 000	13/10 000	20,6/10 000
Autre trouble désintégratif de l'enfance	-	-	0,2/10 000	0,2/10 000	0,2/10 000
Syndrome d'Asperger	-	3/10 000	2,5/10 000	3/10 000	6/10 000
Autisme atypique Autres TED	11,5/10 000	15,3/10 000	15/10 000	21/10 000	37,1/10 000

B. Influence du sexe et de la génétique

Le sex-ratio a peu changé depuis les premières études épidémiologiques, il est de 3 à 4 garçons pour une fille (Fombonne, 2003 ; Yeargin-Allsopp *et al.*, 2003). Le sex-ratio est moins élevé lorsqu'il y a un retard mental modéré à sévère associé (2 garçons pour 1 fille). En revanche, en absence de retard mental, le sex ratio est plus élevé (6 garçons pour 1 fille) (Fombonne, 2003).

La proportion d'autres enfants atteints dans les fratries avec un enfant déjà atteint est plus importante que dans la population générale (environ 22 fois plus) (Schaefer G .B. *et al.*, 2008, Lauristen *et al*., 2005). Les risques de récurrence sont respectivement de 4% et 7% si l'enfant affecté est un garçon ou une fille (Jorde L.B. *et al.*, 1991).

C. Influence de l'origine ethnique, de la géographie et du milieu social

Alors qu'aucune étude anthropologique complète n'ait été réalisée, nous pouvons cependant observer d'après les études et enquêtes réalisées que l'on trouve des cas d'autisme sur l'ensemble des continents, aucune ethnie ou pays ne semblent échapper à ce trouble. Il en est de même lorsque l'on observe les différentes classes sociales de la société. Les hypothèses développées par Kanner, où l'autisme était associé à une classe sociale aisée et

intellectuellement instruite ne sont plus d'actualité aujourd'hui, les différences sociales ou professionnelles ne représentent pas un facteur déterminant dans l'apparition de la maladie (De Giacomo A. et Fombonne E., 1998).

D. Influence des pathologies et troubles associés

La majorité des troubles associés à l'autisme ont un déterminisme génétique. Parmi eux: la sclérose tubéreuse de Bourneville (0 à 3,8% des autistes), le syndrome de l'X fragile (0 à 8,1%), la neurofibromatose de Recklinghausen (NF1) (<1%), la phénylcétonurie (Fombonne E., 2003). L'association de ses maladies génétiques constitue un argument fort en faveur de l'intervention de facteurs génétiques dans l'étiologie de l'autisme.

Les troubles autistiques sont intimement liés à la déficience mentale et l'épilepsie. D'après la revue de Fombonne (2003), 30% des autistes n'ont pas de retard mental, 30 % ont un retard mental léger ou modéré et 40% présentent un retard mental profond. Une déficience intellectuelle est présente chez 1/3 des patients atteints d'un TED. La prévalence de l'épilepsie est de 20 à 25% dans les TED, de 5 à 40% dans l'autisme selon les études contre 0,5 à 1% dans la population générale (Canitano R., 2007, Fombonne, 2003; Hauser *et al..*, 1991).

Par ailleurs, des déficits sensoriels ont été observés chez les enfants autistes, 9,5% présentent des déficits auditifs (Rosenhal *et al..*, 1999) et 1,3% présentent des déficits visuels (Fombonne, 2003).

IV. Etiologie

Actuellement, les causes du syndrome autistique restent en grande partie inconnues. Toutefois la présence d'une composante génétique a clairement été démontrée avec les études sur les paires de jumeaux réalisées entre les années 1970 et 1980. L'autisme est un syndrome multifactoriel où un certain nombre de facteurs de risque agiraient conjointement pour induire un phénotype. Le taux de concordance entre les jumeaux monozygotes (60 à 90%) et les jumeaux dizygotes (10%) va dans ce sens. Ces facteurs de risque peuvent être des interactions

gène/environnement ou des interactions gène/gène. Les effets des interactions gène/environnement peuvent être attribués à des facteurs environnementaux toxiques ou des facteurs épigénétiques qui par leur action perturberaient les fonctions des gènes et par voie de conséquence le tissu neural. Les facteurs de risque épigénétiques peuvent être des substances biochimiques (polluants toxiques, médicaments) des agents biologiques (virus) ou encore des expériences psychologiques traumatisantes (stress). Ces facteurs pourraient altérer les voies de signalisation des neuromédiateurs mais aussi influencer l'expression de gènes durant le développement cérébral (Levy *et al.* 2009).

A. La neurobiologie de l'autisme

1. Les données neuroanatomiques

Comme nous l'avons vu précédemment l'autisme pris dans son sens le plus large inclue des patients très hétérogènes d'un point de vue phénotypique. Les données neuroanatomiques se sont multipliées ces dernières années avec le développement de l'imagerie cérébrale qui a l'avantage d'être une méthode d'investigation non invasive. Les premières études d'imagerie cérébrale datent des années 80. Cette technique a permis de connaître les régions du cerveau qui pourraient jouer un rôle dans l'autisme et de caractériser les anomalies impliquées dans ce syndrome. On distingue 3 techniques d'imagerie cérébrale: la tomographie à émission de positons (TEP) qui permet de visualiser le cerveau au repos, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permet de mesurer l'anatomie cérébrale et enfin, l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique nucléaire (IRMf) qui permet d'observer le cerveau en activation. La figure 1 nous indique de manière schématique les différentes régions du cerveau vues en coupe sagittale.

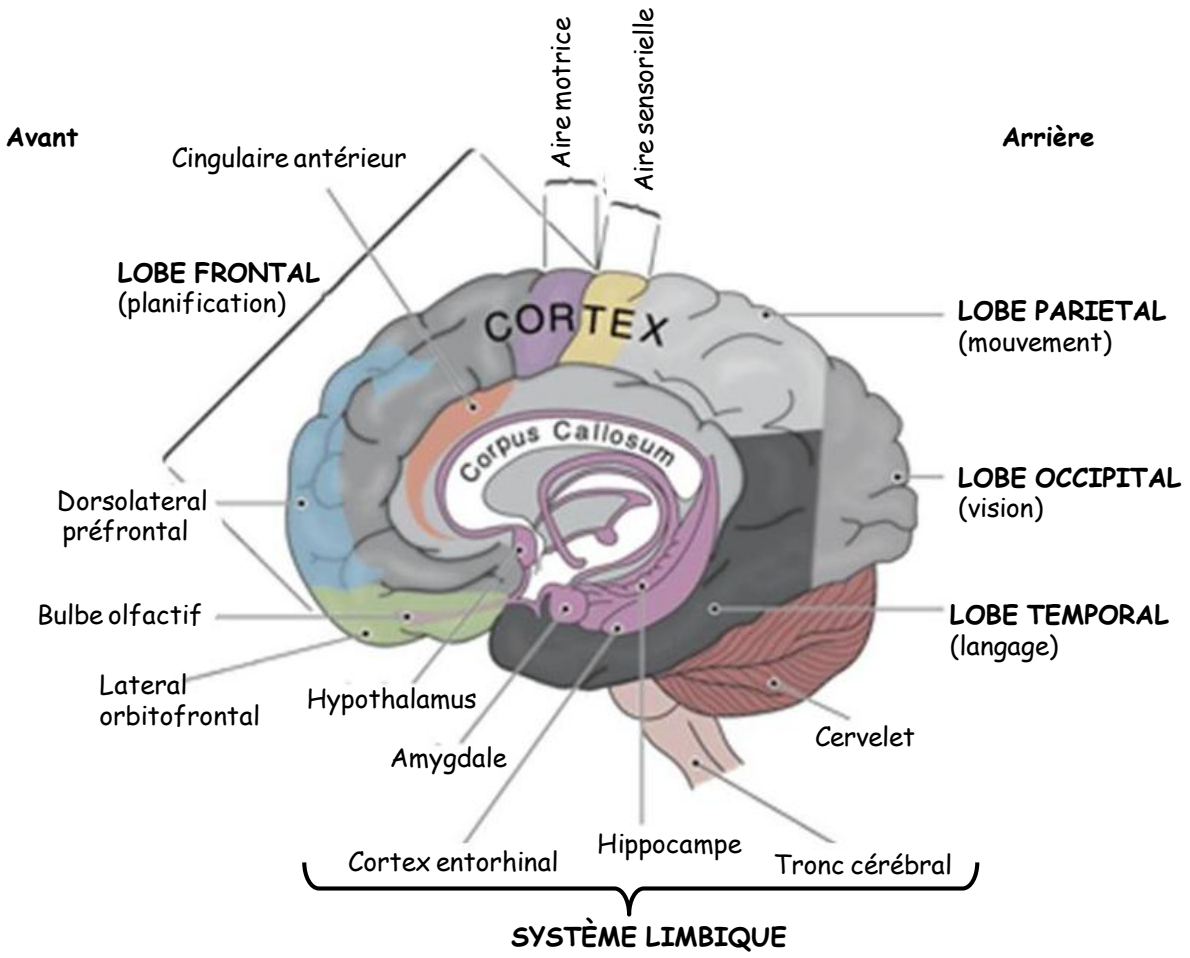


Figure 1 : Schéma d'une coupe sagittale du cerveau humain d'après le site internet : http://www.brainwaves.com/brain_diagram.html.

Un certain nombre d'études d'imagerie cérébrale ont impliqué plusieurs régions cérébrales avec des résultats souvent contradictoires. Une méta-analyse de Brambilla *et al.*., en 2003, a fait le point à partir d'études portant sur l'analyse des différentes régions du cerveau dans l'autisme. Par la suite, Stanfield *et al.*., en 2008, ont réalisé une nouvelle méta-analyse à partir de 46 études en essayant de corréler les données avec l'âge, le sexe et le QI des patients. Plus récemment, Verhoeven *et al.*. (2010) ont réalisé une revue des données d'IRM les plus fréquemment observées dans l'autisme.

a) Le volume cérébral

Lors de son étude, Kanner, en 1943, avait mentionné une macrocéphalie chez 5 des 11 enfants autistes. Une macrocéphalie est fréquemment observée chez une part importante des patients, deux études (Lainhart *et al.*, 1997, Courchesne *et al.*, 2001) ont observé une macrocéphalie à la naissance chez 15% des autistes. L'analyse menée par Stanfield *et al.* en

2008 renforce les résultats antérieurs et conclue à une augmentation du volume cérébral chez les patients autistes. Ces études soulignent une corrélation entre la maladie et l'âge, le QI et le volume intra-cranial des patients (Piven J. *et al.*, 1992, Aylward *et al.*, 2002, Brambilla *et al.*, 2003). Cette observation ainsi que l'augmentation du périmètre crânien (Lainhart *et al.*, 2006) sont des données neurobiologiques observées de façon constante dans la population autiste par plusieurs auteurs (Piven *et al.*, 1995, Hardan *et al.*, 2001, Sparks *et al.*, 2002). Ces augmentations pourraient résulter d'une anomalie d'un des trois processus suivant : une augmentation de la neurogénèse, une diminution de la mort neuronale et ou, une augmentation des tissus non neuronaux du cerveau tels que la glie ou les vaisseaux sanguins (Verhoeven *et al.*, 2010).

b) Anomalies microscopiques

Les études microscopiques cérébrales sont issues d'observations histologiques post-mortem chez des sujets autistes. Kemper (1993), a observé chez 6 autistes une augmentation de la densité cellulaire associée à une diminution de la taille des cellules au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale, suggérant une réduction de la densité des axones et des dendrites dans le cerveau des patients autistes. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Raymond *et al.* (1996) réalisées chez deux patients autistes. Cette architecture cérébrale correspondrait à celle d'un cerveau lors des premiers stades de maturation (Bauman *et al.*, 1985). Plusieurs études témoignent d'une diminution du nombre de cellules de Purkinje au niveau des hémisphères cérébelleux et du vermis ainsi qu'une diminution de 25% de la taille de ces cellules (Ritvo *et al.*, 1986, Fatemi *et al.*, 2002).

Par ailleurs, un épaississement anormal du cortex ainsi qu'une augmentation de la densité neuronale ont été rapportés par l'étude de Bailey *et al.*. (1998). Les neurones corticaux sont organisés en unités verticales appelées mini-colonnes. L'analyse post-mortem de cerveaux de sujets autistes a montré, au niveau cortical, une augmentation du nombre de mini colonnes, mais celles-ci sont plus petites et présentent une réduction de l'espace des neuropiles traduisant peut être une innervation plus étendue et une activation plus intense des neurones (Casanova *et al.*, 2002). L'équipe de Bailey a également observé la présence de neurones au niveau de la couche moléculaire du néocortex (couche I), une irrégularité des limites entre les différentes couches ainsi qu'une frontière peu définie entre les substances blanche et grise.

c) Les anomalies observées dans les structures cérébrales

(1) Le cervelet

C'est une structure qui n'occupe que 10% de la boite crânienne mais qui comprend plus de 50% de ses neurones. Il est maintenant démontré qu'en plus de sa fonction régulatrice de l'activité motrice, le cervelet peut interagir avec le cortex et avoir un rôle régulateur des régions impliquées dans les émotions et dans les fonctions cognitives (Middleton *et al*., 2000, Schmahmann J.D., 2004). Un défaut dans les circuits d'interaction entre ces deux structures pourrait expliquer les troubles de langage et de comportement observés chez les autistes (Herbert M.R., 2005). Le vermis est une région particulière du cervelet qui a fait l'objet de plusieurs études chez les patients autistes. Pour la première fois, en 1994, Courchesne *et al*.. ont publié des données montrant une hypoplasie des lobules VI-VII du vermis. L'analyse de Stanfield *et al*.. rapporte une diminution de la taille des lobules VIII- X et VI-VII en soulignant une hétérogénéité des résultats concernant les lobules VI-VII en fonction de l'âge et du QI. Ces auteurs démontrent que le volume des lobules I-V serait fonction de la répartition garçon/fille dans les cohortes, cependant globalement aucune variation n'est observée dans ces régions. Il est à noter qu'une diminution de la taille des lobules VI-VII n'est pas spécifique du syndrome autistique puisqu'elle a été observée dans d'autres pathologies associées telle que le syndrome de Down (Raz *et al.*, 1995) ou encore le syndrome de l'X fragile (Mostofsky *et al.*, 1998).

(2) Le cortex

Le cortex cérébral désigne la substance grise périphérique des hémisphères cérébraux. Il se compose de 6 couches cellulaires renfermant différentes classes de neurones, d'interneurones et de cellules gliales. Il peut être segmenté en différentes aires dont les aires motrice, sensorielle, auditive et visuelle. Par ailleurs on distingue 3 lobes cérébraux : frontal, pariétal et temporal.

L'amélioration des techniques d'imagerie a permis d'observer une augmentation du volume total des hémisphères cérébraux (Hardan *et al.*, 2001, Sparks *et al.*, 2002) ainsi qu'une augmentation du volume de la substance grise (Abell *et al.*, 1999) et de la substance blanche (Courchesne *et al.*, 2001) chez des enfants et jeunes adultes autistes, principalement sans retard mental ou avec un retard mental modéré.

Un taux de croissance anormal, en fonction du temps, des volumes de substance blanche et grise des lobes frontal, temporal et pariétal a été rapporté (Piven *et al.* , 1996,

Carper *et al.*, 2002, Schumann *et al.*, 2010). Par ailleurs, deux études (Zilbovicius *et al.*, 2000, Ohnishi *et al.*, 2000) ont mis en évidence une diminution bilatérale du débit sanguin cérébral au niveau des lobes temporaux et plus particulièrement au niveau du gyrus temporal supérieur (GST) et du sillon temporal supérieur (STS). Ces observations témoigneraient, selon les auteurs, d'une moindre activité synaptique et donc d'un dysfonctionnement de ces régions chez l'autiste. Une diminution bilatérale du volume de la substance grise dans la région temporale supérieure a été observée chez 21 patients autistes (Boddaert *et al.*, 2004), coïncidant avec les anomalies fonctionnelles rapportées dans la même région. La même équipe a mis en évidence par IRMf une anomalie d'activation du STS en réponse à des stimuli sonores vocaux alors que l'activation de cette zone est normale lorsque la stimulation provient de sons non vocaux (Gervais *et al.*, 2004). L'IRMf a également permis de mettre en évidence une perturbation de l'activation et de la vitesse de synchronisation des réseaux corticaux chez les sujets autistes. De plus, Dapretto *et al.*. (2006) ont montré une diminution de l'activité des neurones miroirs du gyrus frontal inférieur qui sont impliqués dans la réalisation des taches d'imitation. Par ailleurs, chez les autistes une corrélation entre l'hypoactivité de l'aire du gyrus fusiforme et des déficits de discrimination entre les personnes et les objets a été démontrée par plusieurs équipes (Schultz R.T., 2005, Hadjikhani *et al.*, 2004). De surcroit, les régions corticales associées au traitement du langage sont différemment sollicitées entre les sujets autistes et les sujets contrôles; chez les autistes l'activation du gyrus temporal inférieur (aire de Broca) est diminuée au profit de celle du gyrus temporal supérieur (aire de Wernicke) (Kana *et al.*, 2006).

(3) Le système limbique

Ce système est constitué d'un groupe de structures cérébrales jouant un rôle dans le comportement en particulier dans diverses émotions telles que l'agressivité, la peur, le plaisir, ainsi que la formation de la mémoire. Les principales composantes sont des structures subcorticales: l'hippocampe (impliqué dans la formation de la mémoire à long terme), l'amygdale (impliquée dans l'agressivité et la peur), la circonvolution cingulaire et le fornix (impliqué dans la mémorisation); l'hypothalamus (impliqué dans la régulation des fonctions comportementales, endocrines et du système nerveux autonome).

L'étude de Brambilla (2003) puis celle de Stanfield (2008) ne montrent pas de variation des volumes de l'hippocampe et de l'amygdale chez les sujets autistes. Cependant Stanfield indique que l'âge des patients est un facteur important, ainsi ils observent une augmentation du volume de l'amygdale uniquement chez les patients les plus jeunes.

Des anomalies morphologiques de l'hippocampe ont été observées chez des patients présentant des troubles du langage sévères avec un tableau clinique d'autisme ou de retard mental (Agostini *et al..*, 2010).

(4) Le corps calleux

Le corps calleux est une commissure télencéphalique (faisceau d'axones) interconnectant les deux hémisphères cérébraux. La plupart des études relatent une diminution du volume du corps calleux chez des patients autistes (Egaas *et al.*, 1995, Alexander *et al.* 2007). De plus, des anomalies de morphologie et de microstructure ont récemment été associées à la pathologie (Alexander *et al.* 2007). Ces observations pourraient traduire soit une diminution du nombre de fibres reliant les deux hémisphères soit un défaut de myélinisation de ces fibres.

(5) Le noyau caudé

Le noyau caudé est situé au niveau des noyaux gris centraux. Il joue un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire. Les méta-analyses de Brambilla et Stanfield rapportent une augmentation de son volume chez les patients autistes corrélée avec un comportement répétitif et stéréotypé.

2. Les données neurochimiques

a) Le système sérotoninergique

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est un neuromédiateur synthétisé à partir du tryptophane, principalement à partir des neurones du raphé, localisés au sein du tronc cérébral. On la trouve aussi au niveau du système digestif. Après une étape d'hydroxylation, le tryptophane est converti en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) qui est ensuite décarboxylé en sérotonine. La sérotonine est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques et cognitifs: l'anxiété, le cycle veille-sommeil, les comportements alimentaires, sexuels et maternels ou encore la douleur et la température corporelle. Quatorze récepteurs de la sérotonine ont été décrits (Zafeiriou *et al.*, 2009), presque tous sont impliqués dans le développement, certains interviennent dans le développement des dendrites et des épines dendritiques de l'hippocampe, d'autres dans la potentialisation à long terme, d'autres encore dans la différenciation neuronale ou la maturation dendritique (Sikich *et al.*, 1990, Tecott *et al.*, 1998, Dooley *et al.*, 1997). Les études biochimiques se sont focalisées sur la

sérotonine du fait de son implication dans la perception (Bauman & Kemper, 1994). La sérotonine joue un rôle important dans la régulation de l'humeur. Or des troubles de l'humeur et des angoisses ont souvent été décrites chez les autistes. L'intérêt des études du système sérotoninergique est aussi lié à son implication dans l'attachement social. Des études chez l'animal ont montré qu'une hypersérotoninémie pouvait diminuer l'attachement social en inhibant le stress lié à la séparation (Chamberlain *et al.*, 1990); ces observations pourraient suggérer un lien entre l'élévation du taux de sérotonine et les déficits des interactions sociales rencontrés chez les autistes. Plus récemment, le rôle de la sérotonine dans le développement précoce du cerveau a été proposé comme un facteur étiologique du développement de l'autisme (Whitaker-Azmitia, 2001). Les neurones sérotoninergiques sont détectés dès la 5ème semaine de gestation dans le cerveau humain (Sundstrom *et al.*, 1993), la sérotonine exercerait ainsi différentes actions sur la morphogénèse du système nerveux central (Whitaker-Azmitia, 1994, Mazer *et al.*, 1997, Chugani *et al.*, 1999). Des expériences *in vivo*, chez la souris, ont montré que la source principale de sérotonine aux stades précoces du développement serait d'origine maternelle et non fœtale (Cote *et al.*, 2007), ceci montre le rôle crucial de la sérotonine maternelle sur le développement normal du fœtus et en particulier de son cerveau. Plusieurs études font référence à des taux élevés de sérotonine dans le sang et les plaquettes sanguines chez les patients autistes (Anderson *et al.*, 1997, Cook et Leventhal 1996, Hérault *et al.* 1996). Les mécanismes de l'hypersérotoninémie dans l'autisme ne sont, à ce jour, pas élucidés et la corrélation entre l'hypersérotoninémie plaquettaire et certains comportements autistiques ne fait pas l'unanimité (Kuperman *et al..*, 1987, Mulder *et al..*, 2004, Hranilovic *et al..*, 2007). 30% des autistes présentent une augmentation de sérotonine plaquettaire (Ritvo *et al..*, 1970; Marazziti *et al..*, 2000), cependant elle ne semble pas spécifique de cette pathologie puisqu'on la retrouve, notamment, dans la schizophrénie (Freedman, 1981). Certaines études suggèrent une altération du système sérotoninergique central dans l'autisme mais des observations contradictoires ont été rapportées. Une étude par tomographie par émission de positons (TEP) a montré chez des garçons autistes une diminution unilatérale de synthèse de sérotonine dans le cortex frontal et le thalamus droit, associée à une augmentation de synthèse de sérotonine dans le cervelet. Cette asymétrie n'a pas été observée chez les filles (Chugani *et al..*, 1997, 1999). Il semblerait que les taux élevés de sérotonine présents dans le sang s'accompagnent d'une diminution des taux au niveau du cerveau. Des expériences de privation de tryptophane ont provoqué une exacerbation des comportements répétitifs (McDougle *et al..*, 1996). Un traitement par des inhibiteurs de recapture de la sérotonine (SSRI) a, quant à lui, permis d'améliorer ces comportements chez

les autistes (Kolevzon *et al..*, 2006) mais a produit des effets secondaires (Belik J., 2008, Bethea *et al..*, 2007). Actuellement, différentes études pharmacologiques se focalisent sur les effets des SSRI (inhibiteurs de la recapture de sérotonine) et sur les effets de l'administration précoce du précurseur de la sérotonine, le 5-HTP, dans cette maladie.

b) Le système dopaminergique et les catécholamines

La dopamine (hydroxytyramine) est un neurotransmetteur appartenant à la classe des catécholamines, elle est le précurseur de la noradrénaline et de l'adrénaline. Elle est synthétisée à partir de la tyrosine provenant de l'alimentation. La dopamine est également une neurohormone produite par l'hypothalamus, elle inhibe la libération de prolactine par le lobe antérieur de l'hypophyse. Au niveau du système nerveux central, elle est impliquée dans les phénomènes de dépendance via le système de récompense (Berridge *et al.*, 1998, Di Chiarra and Bassareo, 2007), ainsi que dans le contrôle des fonctions motrices. Des anomalies du système dopaminergique central sont responsables de plusieurs symptômes ou maladies cérébrales dont la maladie de Parkinson, la schizophrénie ou encore l'hyperactivité. La dopamine, via ses récepteurs, agirait sur la plasticité synaptique ce qui pourrait induire des perturbations au niveau de la mémoire et du langage. Deux études ont suggéré un rôle possible de la dopamine dans l'autisme: une amélioration clinique a été observée chez des patients autistes traités par neuroleptiques atypiques agissant comme des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D2 (Anderson et Hoshino, 1997, Buitelaar *et al.* 2000). Cependant les études du fonctionnement du système dopaminergique central par le dosage d'acide homovanillique (produit de dégradation de la dopamine) dans le liquide céphalo-rachidien de patients autistes ont rapporté des résultats contradictoires (Gillberg et Svennerholm, 1987, Narayan *et al*., 1993).

La noradénaline (ou norépinéphrine) est une catécholamine synthétisée à partir de la dopamine. Elle est le précurseur métabolique de l'adrénaline (épinéphrine). Les études réalisées sur l'animal ont souligné le rôle du système noradrénergique dans un certain nombre de fonctions. Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus sont impliqués dans les phénomènes d'attention, d'éveil, d'anxiété et d'apprentissage souvent perturbés chez les patients autistes. Différentes études indépendantes ont mis en évidence des taux plasmatiques anormalement élevés d'adrénaline et de noradrénaline chez des autistes (Launay *et al.*, 1987, Cook E.H., 1990, Leboyer *et al.*, 1992). Les taux urinaires de métabolites quand à eux sont variables alors que les taux plaquettaires sont diminués par rapport aux contrôles. Ces données sont appuyées par une autre étude montrant des taux plasmatiques élevés de

catécholamines et de leurs métabolites chez les autistes (Martineau *et al.*, 1992). Cependant des études contradictoires ont été publiées (Minderaa *et al.*, 1994, Young *et al.*, 1981). Des résultats plus probants seraient nécessaires pour pouvoir envisager un rôle significatif du système noradrénergique dans l'autisme.

c) L'acétylcholine

L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui joue un rôle aussi bien dans le système nerveux central où il est impliqué entre autre dans la mémoire et l'apprentissage que dans le système nerveux périphérique. L'acétylcholine se fixe au niveau post-synaptique sur deux types de récepteurs : nicotinique et muscarinique. Des anomalies neuropathologiques décrites dans les neurones cholinergiques de patients autistes ont suscité un grand intérêt pour l'étude de l'acétylcholine dans cette pathologie (Bauman et Kemper, 1994). Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) sont impliqués dans un large éventail d'anomalies neuronales et de maladies psychiatriques; en effet, ce système est impliqué dans les fonctions cognitives, une diminution des nAChRs a été observée dans la maladie d'Alzheimer, les démences à corps de Lewy, le syndrome de Down, l'autisme et la maladie de Parkinson. Des mutations dans les gènes codant les sous-unités α_4 et $ß_2$ des nAChRs ont été impliquées dans des formes héréditaires d'épilepsie (Steinlein *et al..*, 1995, 2004), trouble décrit chez 1/3 des autistes. Une diminution d'expression de ces 2 sous unités dans le cortex cérébral a également été observée *post-mortem* chez des sujets autistes (Perry *et al.*, 2001). Par ailleurs toujours dans des études *post mortem*, une diminution de liaison (65 à 73%) de l'acétylcholine aux sous unités α_4 $ß_2$ des nAChRs a été observée dans le cortex frontal et pariétal, mais aussi une augmentation de liaison à la sous unité α_7 au niveau du cervelet. Par ailleurs, une diminution de 30% de liaison des récepteurs muscariniques M1 a été rapportée dans le cortex pariétal (Perry *et al..*, 2001, Lee *et al..*, 2002, Martin-Ruiz *et al.;*, 2004).

d) Les systèmes glutamatergique et GABAergique

L'acide glutamique ou glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus répandu dans le système nerveux central alors que le GABA (acide γ-aminobutyrique) est le principal neurotransmetteur inhibiteur. Le glutamate est transformé en GABA par la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD) qui est l'enzyme limitante à la synthèse de ce dernier. Les fonctions de ces deux neurotransmetteurs sont étroitement liées. Le glutamate active les récepteurs ionotropes AMPA, NMDA et kaïnate ainsi que les récepteurs métabotropes. Le glutamate joue un rôle dans les fonctions cérébrales d'apprentissage et de mémorisation. Cependant un

excès de glutamate est susceptible d'entraîner des effets pathologiques tels que ceux rencontrés dans la sclérose latérale amyotrophique ou la maladie d'Alzheimer. La phencyclidine, (psychotrope) inhibiteur non compétitif du glutamate pour le récepteur NMDA, provoque des comportements similaires à ceux de la schizophrénie. Le glutamate, par la dépolarisation qu'il peut induire, est impliqué dans des crises d'épilepsie qui sont fréquentes dans l'autisme (Hussman *et al.*, 2001). Une des hypothèses actuelles dans l'autisme serait qu'une trop forte stimulation glutamatergique induirait une suppression de l'information GABAergique. Une étude par spectroscopie protonique à résonance magnétique (H-MRS) portant sur 25 patients autistes de haut niveau et atteints du syndrome d'Asperger, a montré une augmentation du taux de glutamate au niveau du système limbique (Page *et al.*, 2006). Des études antérieures *postmortem* ont montré des anomalies cellulaires dans cette région (ainsi que dans le cervelet) qui est riche en neurones glutamatergiques (Bauman et Kemper, 1994, Raymond, Bauman M.L., 1996). Par ailleurs des taux anormalement élevés de glutamate plasmatique ont été observés chez des autistes (Aldred *et al.*, 2003). Une augmentation des ARNm des récepteurs de type AMPA1 ainsi que du transporteur au glutamate est présente dans le cerveau de patients autistes, en revanche une diminution de la densité des récepteurs est observée au niveau du cervelet (Purcell *et al.*, 2001). Une hyperactivité glutamatergique pourrait provoquer une excitotoxicité délétère pour le développement neuronal (Bittigau et Ikonomidou, 1997). De plus l'activité glutamatergique atteint son maximum durant la deuxième année de vie de l'enfant, période durant laquelle les signes autistiques émergent dans la plupart des cas. Une activité perturbée du système glutamatergique et de la balance glutamate/GABA pourrait provoquer une croissance neuronale anormale et altérer les connectivités (Kornhuber *et al.*, 1989). Une diminution de 48 à 61% de l'enzyme GAD est observée *postmortem* chez des autistes dans le cervelet et les régions pariétales du cerveau suggérant de nouveau une anomalie dans le rapport glutamate/GABA (Fatemi *et al.*, 2002).

e) L'ocytocine

L'ocytocine (OT) est un neuropeptide synthétisé par les neurones hypothalamiques, elle est connue pour ses effets sur la contraction de l'utérus et lors de la lactation, mais intervient aussi entre autres, dans les phénomènes de sociabilité et la mémoire (Insel et Fernald, 2004, Neumann I.D., 2008). Un des traits de la pathologie autistique est un déficit dans les interactions sociales; l'hypothèse d'un rôle de l'OT dans l'étiologie autistique fait suite à des études chez l'animal où il a été montré que l'OT pouvait réguler le comportement

social (Carter C.S., 2003, Lim et Young, 2006). Une diminution du taux d'OT plasmatique a été observée par plusieurs équipes (Modahl *et al*., 1998, Green *et al*., 2001, Andari *et al*., 2010). Les taux d'OT plasmatiques sont corrélés positivement chez les enfants normaux avec l'âge et avec la capacité de socialisation, ce n'est pas le cas chez les patients autistes ceci suggère qu'un simple modèle de déficit en OT dans l'autisme n'est pas suffisant. Ces faibles taux sanguins d'OT peuvent être le reflet d'un mécanisme de compensation provoqué par des anomalies au niveau des récepteurs ou au niveau des précurseurs de l'OT (Modahl *et al*. 1998). Aucune étude ne rend compte du taux d'OT dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) chez les autistes. En revanche les dosages réalisés chez des femmes ayant subi des sévices durant leur enfance ainsi que chez les singes privés d'affection ont montré une baisse d'OT (Winslow J.T., 2005, Heim *et al*. 2009). Trois études ont examiné les effets de l'OT administrée en intra-nasal chez des autistes de haut niveau (Andari *et al*., 2010, Guastella *et al*., 2009, Hollander *et al*., 2003, 2007) et ont constaté des résultats encourageants; en effet, le contact visuel, des items dans les comportements répétitifs et les interactions sociales étaient améliorés. Il a été proposé que l'OT puisse contribuer aux anomalies de comportement social dans l'autisme via son action sur l'amygdale, région présentant des perturbations morphologiques et d'activation dans l'autisme (Brambilla, 2003, Szatmari, 2003).

f) La mélatonine

La mélatonine est une neurohormone endogène sécrétée par la glande pinéale qui tient un rôle majeur dans la régulation des rythmes circadiens, en particulier du cycle veille-sommeil. Cette neurohormone est synthétisée à partir de la sérotonine.

Des troubles du sommeil ont été rapportés chez les enfants avec autisme, la prévalence va de 44 % à 83 % selon les études (Richdale A.L.,1999). Krakowiak (2008) suggère que l'endormissement et les réveils nocturnes seraient les deux périodes critiques de sommeil les plus perturbées dans le groupe des enfants ayant un trouble du spectre de l'autisme.

Parallèlement aux études sur le sommeil, il a été recherché des troubles des rythmes circadiens chez des enfants avec autisme, en se basant sur l'étude des plaintes parentales à propos des rythmes veille-sommeil irréguliers chez leur enfant. Des anomalies de sécrétion de la mélatonine ont été mises en évidence chez des enfants avec autisme. Plusieurs études ont fait état de plus faible taux de mélatonine durant la nuit dans le sérum de patients autistes comparés à celui des contrôles (Brzezinski *et al*., 2005, Kulman *et al*., 2000, Melke *et al*., 2008). Similairement, le taux urinaire de son métabolite, la 6-sulfatoxymélatonine, est plus faible chez les autistes (Tordjman *et al*., 2005). Une seconde étude rapporte une association

entre le taux d'excrétion de 6-sulfatoxymélatonine et les phases du sommeil (Leu *et al*., 2010).

Les études récentes se sont focalisées sur l'impact de la mélatonine dans le traitement de l'insomnie chez les autistes. Le principal effet sur le sommeil est une phase d'endormissement plus rapide (Andersen *et al*., 2008, Wirojanan *et al*., 2009).

B. Les données environnementales

1. Les intoxications

L'exposition *in utero* à certains toxiques, virus ou hormones a été mise en cause dans plusieurs études concernant l'autisme. L'action des facteurs environnementaux interviendrait à un stade très précoce de l'embryogénèse (du 20ème au 40ème jour après fécondation chez l'homme) dans l'étiologie de l'autisme (Miller *et al..*, 2005, Ploeger *et al..*, 2010) et induirait des anomalies du tube neural (Rodier P.M. 2000). La thalidomide, prescrite dans le traitement de l'anxiété et reconnue depuis comme puissant tératogène a été associée à l'autisme dans une étude suédoise : si la thalidomide est donnée en traitement à des femmes enceintes à un stade précoce de leur grossesse, cela induit un syndrome autistique chez 4% des enfants (Stromland *et al.* 1994). Un modèle d'étude *in vivo* a été développé chez le rat en traitant des rattes gestantes à l'acide valproïque (agent anticonvulsif donné dans le traitement de l'épilepsie) (Rodier *et al..* 1996). Une diminution du nombre des cellules de Purkinje a été observée dans le cervelet. Une autre étude a montré que lorsque la mère était traitée par des anticonvulsivants (traitement de l'épilepsie) pendant sa grossesse, sur 57 enfants ayant un syndrome fœtal aux anticonvulsivants, 4 étaient autistes et 2 présentaient un syndrome d'Asperger (Moore *et al.*, 2000). Un autre médicament, un anti-ulcéreux, le misoprostol, s'il est administré chez la femme enceinte durant le premier trimestre de sa grossesse, peut induire un syndrome ou un comportement autistique (Bandim *et al..*, 2003). Des syndromes d'alcoolisme fœtal ont aussi été associés à l'autisme (Nanson *et al.*, 1992, Aronson *et al.*, 1997) avec notamment une perte de langage.

En outre, plusieurs équipes ont étudié les effets de l'acide rétinoïque, métabolite de la vitamine A, utilisé dans le traitement de l'acné ou de certains cancers. Aucune association n'a cependant été observée avec l'autisme alors que des modèles animaux ont mis en évidence des anomalies cérébrales similaires à celles observées dans l'autisme après l'administration d'acide rétinoïque (London E. et Etzel R.A., 2000) Une hypervitaminose ainsi qu'une

hypovitaminose A durant la grossesse provoquent, quant à elles des anomalies du tube neural (Means *et al.*, 1995).

2. Les infections

Une infection par le virus de la rubéole durant le 1er trimestre de la grossesse provoque souvent des anomalies congénitales. Une étude menée chez 243 enfants infectés par une rubéole congénitale a révélé que 4,1% d'entre eux développaient de l'autisme (Chess S., 1971). Dans une deuxième étude, 6% des enfants atteints de rubéole congénitale ont été diagnostiqués autistes (Chess S., 1977). Enfin, une méta-analyse de Fombonne (2003) montre que 0,3% des cas d'autisme peuvent être liés à une rubéole congénitale.

Le cytomégalovirus infecte 1 à 3% des femmes au cours de leur grossesse, la transmission au fœtus a lieu dans 40% à 50% des cas. L'infection *in utero* provoque des symptômes autistiques, une infection au cours du 3ème trimestre de grossesse, au moment de la myélinisation, a été observée chez certains patients autistes (Sweeten *et al.* 2004, Yamashita *et al.*, 2003, Barkovich *et al.* 1994).

3. Les facteurs immunologiques

Des altérations du système immunitaire durant des périodes critiques du développement cérébral et neuronal peuvent jouer un rôle dans les dysfonctionnements neuronaux observés chez les patients autistes. Ces perturbations du système immunitaire peuvent provenir d'anomalies de l'immunité maternelle pendant la grossesse ou d'une perturbation auto-immune (Ashwood *et al.* 2006).

Une augmentation des monocytes circulants, corrélée avec une augmentation d'interféron γ (IFNγ), a été observée dans l'autisme (Sweeten *et al.*, 2004). D'autres études font référence à des perturbations qualitative et quantitative des cellules tueuses NK (natural killer), lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes et macrophages (Fiumara *et al.*, 1999, Warren *et al.* 1987). Des résultats contradictoires sont rapportés concernant les taux l'IL12 (interleukine 12) et IFNγ (Singh V.K., 1996, Gupta *et al.*, 1998). Des études *in vitro* sur des cellules mononucléaires ont révélé une réponse immunitaire innée inappropriée avec une augmentation de cytokines proinflammatoires TNF-α et Il-1ß chez des patients autistes par rapport aux contrôles (Jyonouchi et *al.*, 2001). Les explorations sur les immunoglobulines plasmatiques ont révélé des taux anormaux d'IgG2 et d'IgG4 (Croonenberghs *et al.*, 2002)

mais aussi d'IgG1, d'IgM et d'IgG (Trajkovski *et al.*, 2004) suggérant une maladie autoimmune sous-jacente ou une altération de la sensibilité aux infections chez les patients autistes. La fréquence des maladies autoimmunes dans les familles avec autisme semble plus importante mais les données s'avèrent contradictoires (Comi *et al.*, 1999, Croen *et al.* 2005). La présence d'anticorps maternels dirigés contre certaines protéines du cerveau chez les patients autistes pourrait contribuer au développement de la maladie ou être la conséquence de celle-ci (Ashwood *et al.* 2006). Une étude de Singh et Rivas (2004) a montré la présence significative d'anticorps, dirigés contre trois protéines du noyau caudé, chez 49% des autistes testés mais pas chez les contrôles. L'association entre l'autisme et des dysfonctionnements du système immunitaire n'apparait pas très claire. Il est possible que des anomalies du système immunitaire ne soient spécifiques que de certains sous groupes d'autisme.

4. La vaccination

Le vaccin ROR (rougeole/oreillons/rubéole) a été incriminé comme pouvant induire un syndrome autistique (Wakefield *et al.*, 1999). Cette étude a fait polémique car elle soulevait un problème de santé publique en détournant de nombreuses familles de la vaccination obligatoire en Angleterre et ailleurs. Depuis, de nouvelles études ont largement prouvé qu'il n'y avait aucune corrélation entre l'autisme et le vaccin ROR (Doja A. et Roberts W., 2006, DeStefano, 2007). De même, plusieurs études n'ont pas observé d'association entre l'autisme et le thimérosal, dérivé du mercure contenu dans le vaccin ROR, entre autres (Thompson *et al.*, 2007). L'étude de Wakefield a définitivement été supprimée de la base du Lancet et de Medline en 2010, les reproches étant à la fois sur le fond scientifique (étude avec de nombreux biais rendant toute conclusion impossible) et l'éthique de l'étude (conflit d'intérêt patent entre Wakefield et les sociétés produisant les vaccins).

C. La Génétique de l'autisme

Une corrélation entre autisme et facteurs génétiques a été établie dans les années 1960, depuis l'étude de Rimland (1964) qui a montré un taux de concordance élevé chez les jumeaux monozygotes.

1. Les études de jumeaux et de familles

Les études familiales montrent clairement que certains traits « autistiques » sont aussi présents chez les sujets autistes que chez les parents et membres non autistes de la même famille, suggérant une héritabilité des traits (Freitag C.M., 2007). Le risque de récurrence est 22 fois plus élevé dans les familles ayant un enfant autiste que dans la population générale. Cependant, les récents travaux menés par Constantino (2010) sur la caractérisation et la quantification du risque de récurrence intrafamiliale, suggèrent que ce risque pourrait être plus élevé que celui précédemment publié par plusieurs auteurs suivant la définition qu'on lui donne. Les études familiales ont permis d'aboutir à la notion d'un phénotype élargi qui comporterait des anomalies cognitives et sociales, des désordres de la communication, des comportements obsessifs-compulsifs, des troubles de l'humeur et de l'anxiété, ainsi que des centres d'intérêts limités chez des apparentés du premier degré du sujet autiste. Ceci suggèrerait un terrain de susceptibilité génétique pour l'autisme (Smalley *et al.*, 1995, Hollander *et al.*, 2003).

En 1977, Folstein et Rutter ont publié la première étude sur des jumeaux autistes. Ils ont montré que le taux de concordance était beaucoup plus élevé chez les jumeaux monozygotes (MZ) que chez les jumeaux dizygotes (DZ). Cette constatation a été reproduite dans plusieurs études épidémiologiques où il a été mis en évidence que lorsque l'un des enfants est atteint d'autisme dans les couples MZ, la probabilité pour que le deuxième soit lui aussi autiste est proche de 90% contrairement à celle des couples de jumeaux dizygotes qui avoisine les 10% de concordance (Bailey *et al.*, 1995, Steffenburg *et al.*, 1989, Ritvo *et al.*, 1985).

Ainsi, le rapport de concordance entre les jumeaux MZ et DZ et le risque de récurrence observé dans les familles d'autistes, permettent de calculer un taux d'héritabilité (variance génétique/variance phénotypique) d'environ 90% (Bailey *et al.*, 1995).

La composante génétique se retrouve également dans l'association relativement fréquente de maladies génétiques et d'anomalies chromosomiques avec l'autisme. Ces différentes données sont en faveur d'une contribution génétique dont le mode de transmission reste encore inconnu même si les résultats disponibles orientent les recherches vers un modèle polygénique qui présente une hétérogénéité génétique (Folstein *et al.*, 1999).

2. Les maladies génétiques et anomalies chromosomiques associées

Dans 10% des cas, l'autisme peut être lié à des maladies monogéniques ou des anomalies chromosomiques (Herman *et al.*, 2007) (Tableau 4).

a) Les syndromes génétiques

Tableau 4 : Maladies génétiques associées à l'autisme (d'après Zafeiriou *et al.* 2007, Kelleher *et al.*, 2008).

Maladies	Gène(s) ou anomalie chromosomique	Prévalence de l'autisme dans la maladie	Prévalence dans l'autisme
X fragile	*FMR1*	25% - 33%	2% - 5%
Sclérose tubéreuse de Bourneville	*TSC1, TSC2*	16% - 65%	1% - 4%
Syndrome de Rett	*MECP2*	100%	2%
Neurofibromatose de type 1	*NF1*	4%	0% - 4%
Syndrome d'Angelman	*UBE3A*	42%	1%

(1) Le syndrome de l'X fragile

Le syndrome de l'X fragile (FXS) représente la cause la plus commune de retard mental héréditaire, il touche aussi bien les garçons que les filles. La prévalence dans la population générale est estimée à 1/4000 chez les garçons et à 1/7000 chez les filles (Crawford *et al.*, 2001). Le FXS est lié à des mutations dans le gène *FMR1* localisé en Xq27.3. la principale mutation, nommée fra (X), correspond à une expansion de triplet $(CGG)_n$ localisée dans la partie non traduite du gène FMR1, créant un site fragile sur le chromosome X. Les individus normaux ont la séquence CGG répétée moins de 40 fois, chez les individus atteints du FXS la séquence est répétée plus de 200 fois (mutation complète), on rencontre aussi des individus portant des prémutations (55 à 200 répétitions de CGG) (Madd alena *et al.*, 2001, Hagerman *et al.* 2009). Les allèles correspondant à des prémutations sont associés à une déficience cognitive plus légère que pour la mutation complète (Kaufmann *et al.*, 1999). La plupart des garçons atteints de FXS ont un QI inférieur à 50, alors que les filles présentent un retard mental plus modéré avec un QI allant de 70 à 85.

Le gène *FMR1* code la protéine FMRP qui se fixe sur des ARNm spécifiques et inhibe leur traduction, cette protéine interagirait avec plus de 400 ARNm différents (Brown *et al.*,

2001). L'amplification de triplets est associée à une hyperméthylation de la séquence CGG conduisant à une réduction de la transcription du messager de la protéine FMRP ou à la transcription de messagers anormaux selon le nombre de répétitions CGG. Un déficit de protéine FMRP entrainerait une dérégulation de la traduction des gènes localisés à différents loci impliqués dans l'autisme et le syndrome de l'X fragile (Hagerman R.J., 2006). Les patients FXS présentent des anomalies cognitives, une hypersensibilité aux stimuli sensoriels et de l'épilepsie, caractéristiques que l'on observe dans l'autisme (Hagerman R., 2002, Miller *et al.*, 1999) ; ces anomalies ont été reproduites dans un modèle de souris FXS invalidées pour le gène *FMR1* (Brennan *et al.*, 2006, Spencer *et al.*, 2005). Les souris invalidées pour le gène *FMR1* ont une augmentation de synthèse des protéines cérébrales due à l'absence de régulation de la traduction par la protéine FMRP, des perturbations de la balance des connectiques excitatrice/inhibitrice au niveau néocortical ainsi qu'une synchronisation neurale anormale (Gibson *et al.*, 2008). Des anomalies de la forme et de la taille des prolongements dendritiques ont été rapportées chez des patients FXS ainsi que chez les souris invalidées pour le gène *FMR1*. La prévalence de l'autisme dans la population FXS est de 30% et l'X fragile est observé chez 2 à 5% des autistes, ceci suggère que le gène *FMR1* jouerait un rôle dans l'autisme (Hagerman *et al.*, 2005, Kaufmann *et al.* 2004).

(2) La sclérose tubéreuse de Bourneville

La sclérose tubéreuse de Bourneville (STB) est une maladie autosomique dominante dont la prévalence est estimée à 1/10000. Des mutations dans deux gènes suppresseurs de tumeurs, TSC1 (région chromosomique 9q34) et TSC2 (région chromosomique 16p13), codant respectivement l'hamartine et la tubérine, sont à l'origine de la STB. La maladie est caractérisée par une atteinte multiviscérale (Crino *et al.* 2006) associée à des lésions cutanées et cérébrales, de l'épilepsie dans 70 à 93% des cas et du retard mental dans 50 à 80% des cas. Les mutations du gène *TSC1* sont les plus fréquentes dans les formes familiales. Le dimère formé par les deux protéines régule la croissance et la prolifération cellulaire (Curatolo *et al.*, 2008), si l'une des protéines manque, le complexe ne se forme pas et entraîne l'apparition de tumeurs bénignes. Les mutations, à l'origine de la STB, provoquent une activation permanente de ces protéines. Les mutations des gènes TSC induisent des altérations des structures neuronales et synaptiques (Napolioni *et al.*, 2008) ainsi que des modifications de neurotransmission notamment au niveau des interneurones GABAergiques (Levitt *et al.*, 2005). Le nombre de STB parmi les individus autistes est évalué entre 1 et 4%, il augmente à 14% lorsqu'une épilepsie est associée (Filipek *et al.*, 1999). Il est à noter que, la présence des

« tubers » ou lésions du cerveau au niveau des lobes temporaux a été associée à une augmentation significative de la fréquence de l'autisme (Bolton *et al.*, 2002).

(3) Le syndrome de Rett

Le syndrome de Rett ne touche quasiment que les filles. Sa prévalence est de l'ordre de 1/10000 à 1/15000. Les caractéristiques très particulières du phénotype ont conduit à une identification spécifique du syndrome dans les TED. Les enfants ont un développement apparemment normal de 6 à 18 mois, puis ils régressent et perdent leurs capacités de communication et de motricité fine des mains. Ils présentent un retard mental, un autisme et une microcéphalie. Des mutations du gène *MECP2* (methyl-CpG binding protein 2) localisé en Xq28 (Amir *et al.*, 2000) sont responsables de 90% des cas. La protéine MECP2 peut à la fois fonctionner comme un activateur ou un répresseur de la transcription (Chahrour *et al.*, 2008). Des études chez des modèles de souris ont montré que la perte de fonctions de la protéine MECP2 pouvait entrainer une diminution de la transcription de gènes neuronaux alors que le gain de fonction de la protéine MECP2 entrainait une augmentation de transcription de ces mêmes gènes. De manière intéressante le nombre de synapses excitatrices au niveau de l'hippocampe est augmenté quand la protéine MECP2 augmente et est diminué quand elle diminue (Chao *et al.*, 2007). Les recherches réalisées chez des modèles de souris du syndrome de Rett ont suggéré que des anomalies d'expression de la protéine MECP2 pouvaient induire des anomalies cognitives ainsi qu'un comportement autistique (Samaco *et al.*, 2008). Ce gène a été étudié dans l'autisme même si la fréquence des mutations semble rare (Vourc'h *et al.*, 2001, Ylisaukko-Oja *et al.*, 2005).

(4) La neurofibromatose de type 1

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie à transmission autosomique dominante, sa prévalence est estimée à 1/3000 (Friedman *et al.*, 1999). Des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *NF1* localisé en 17q11.2 sont à l'origine de la maladie. Cette maladie est caractérisée entre autre par la présence en grand nombre de taches café au lait ainsi que de tumeurs bénignes cutanées. Les patients atteints de NF1 ont des difficultés d'apprentissage (Rosser and Parker, 2003), des déficits de l'attention, ainsi que des fonctions exécutives, de la motricité et présentent des difficultés d'apprentissage dans 70% des cas (Hyman *et al.*, 2005). La prévalence de la NF1 dans l'autisme est de 0 à 1,4%. L'association de ces deux pathologies pourrait être liée au gène *NF1;* en effet un allèle particulier d'un marqueur GXAlu localisé dans l'intron 27b du gène *NF1* n'a été observé que dans la

population autiste (Mbarek et al., 1999). Ces résultats n'ont cependant pas été reproduits (Plank *et al.*, 2001).

(5) Le syndrome d'Angelman

Le syndrome d'Angelman (SA) est un trouble sévère du développement neurologique caractérisé par un retard sévère du développement, un retard mental, un déficit du langage important, des trémulations des membres et un comportement en apparence joyeux avec des rires inappropriés. La prévalence est estimée à 1/12000 (Steffenburg *et al.*, 1996). C'est la délétion de la région correspondant à la région impliquée dans les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman (PW/AS) (Figure 2) du chromosome 15 maternel qui est la cause de la pathologie.

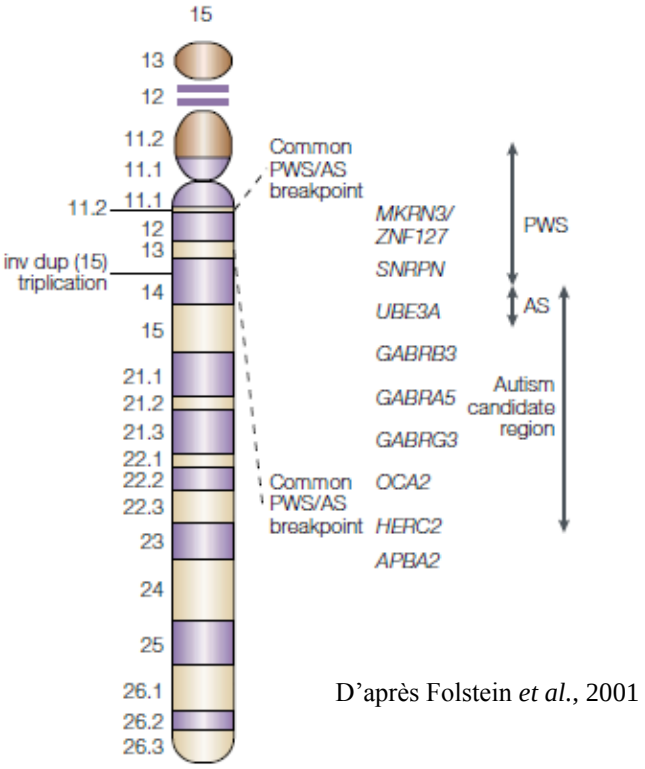


Figure 2 : Régions du chromosome 15 impliquées dans les syndromes d'Angelman et de Prader-Willi et dans l'autisme. La figure illustre les gènes de la région 15q11-13 impliqués dans ces pathologies.

Dans 70% des cas on observe une délétion du locus q11.2-q13, et parmi ceux-ci, 10% présentent une disomie uniparentale paternelle du chromosome 15 (deux chromosomes 15 hérités du père), 10% des cas présentent une mutation du gène *UBE3A* situé sur le locus q11-q12 codant l'ubiquitine-protein ligase E3A (Moncla *et al.*, 1999). La délétion de la région PW/AS du chromosome 15 paternel est, quant à elle, responsable du syndrome de Prader-

Willi. Quarante pour cent des personnes avec un SA rempliraient également les critères diagnostiques de l'autisme (Peters *et al.*, 2004).

(6) Les autres syndromes

De nombreux autres syndromes peuvent être associés à un trouble autistique: le syndrome alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X (ATRX), le syndrome de Sotos, la myopathie de Duchenne, le syndrome de Cornelia de Lange, l'hypomélanose d'Ito, le syndrome de Joubert, le syndrome de Moebius, le syndrome de Cohen, la dystrophie myotonique de Steinert, le syndrome CHARGE, le syndrome de Lujan-Fryns, le syndrome de Smith-Magenis, le syndrome de Timothy (Cohen *et al.*, 2005, Zafeiriou *et al.*, 2007). Ces pathologies rares ne concernent cependant que quelques cas isolés.

b) Les anomalies chromosomiques

L'autisme peut être attribué à des anomalies chromosomiques dans 5 à 10% des cas. Ces anomalies touchent l'ensemble des chromosomes (Figure 3, Vorstman *et al.*, 2006), on observe des translocations équilibrées ou non, des inversions ou encore des délétions et des duplications.

Figure 3 : Représentation générale de toutes les régions cytogénétiques d'intérêt (CROIs: Cytogenetic regions Of Interest) associées à l'autisme (extrait de Vorstman *et al*, 2006). A gauche des chromosomes : les régions liées (Lod score > 2) sont représentées par des traits bleus, celles associées (P< 0,05) par des traits rouges. A droite des chromosomes : les barres verticales représentent les CROIs ; les barres de même couleur indiquent que cette CROI a été rapportée plus qu'une fois dans la littérature. Les rectangles rouges indiquent les nouvelles régions d'intérêt potentiel quand un locus commun est rapporté plus de quatre fois associé à des anomalies chromosomiques, sans qu'il soit préalablement lié ou associé.

Ces réarrangements génomiques peuvent être à l'échelle du gène mais aussi du chromosome comme dans la trisomie 21 où il y a un chromosome surnuméraire pour la 21e paire. Les anomalies les plus récurrentes concernent le chromosome 15 et notamment la région PW/AS. Ces anomalies peuvent donner de l'autisme, souvent associé à un retard mental, et des malformations. On admet généralement qu'un microremaniement est responsable de la maladie à la condition qu'il soit absent chez les parents. L'étude approfondie des réarrangements génomiques dans l'autisme et la déficience mentale fera l'objet d'un chapitre de ce travail.

c) Les maladies métaboliques

La majorité des maladies métaboliques sont d'origine génétique avec une hérédité le plus souvent autosomique récessive (Benvenuto *et al.*, 2009, Manzi *et al.*, 2008). Ces pathologies sont présentes chez moins de 5% des individus autistes.

La phénylcétonurie, par l'accumulation au niveau du cerveau de phénylalanine, est la cause de retard mental mais aussi du développement d'un autisme. Depuis la mise en place d'un régime alimentaire particulier et du dépistage néonatale, cette pathologie a disparu dans les pays dits développés.

Des déficits dans le métabolisme de la créatine peuvent produire des comportements autistiques associés à des déficits cognitifs et moteurs et de l'épilepsie. Les anomalies se situent au niveau de la synthèse et du transport de la créatine, l'absorption de créatine par voie orale peut palier au déficit de synthèse et améliorer les troubles (Nasrallah *et al.*, 2010). Le dépistage de ces anomalies se fait par spectroscopie IRM des urines et imagerie.

Les déficits dans le métabolisme cérébral des folates présentent un phénotype associant entre autre un retard de développement psychomoteur, un retard mental, une ataxie cérébelleuse, une épilepsie et des troubles autistiques fréquents.

Le syndrome de Smith-Lemli Opitz (SLO) résulte d'un défaut de synthèse du cholestérol. La maladie est liée à des mutations du gène DHCR7 codant la 7-déshydrocholestérolréductase. Les patients ayant un SLO présentent un retard mental, une microcéphalie, un retard de croissance, une dysmorphie particulière ainsi que des malformations multiples (organes génitaux, reins, cœur, cerveau). Une étude récente a montré que 53 % des enfants SLO remplissent les critères diagnostiques de l'autisme (Tierney *et al.*, 2001). Un taux élevé de 7-déshydrocholestérol dans le sang permet d'orienter le diagnostic. Un diagnostic prénatal peut être réalisé en recherchant des mutations dans le gène *DHCR7*. Les enfants atteints qui reçoivent une supplémentation précoce en cholestérol voient l'amélioration de leurs troubles tout particulièrement des troubles autistiques.

Des déficits dans le métabolisme des purines liés à un déficit en enzyme adénylosuccinase ont également été observés chez des patients autistes. L'anomalie de synthèse de purine provoquerait des troubles du métabolisme énergétique ainsi que des effets toxiques induisant des anomalies cérébrales (Ciardo *et al.*, 2001).

Deuxième partie :

La déficience mentale

I. Un peu d'histoire

Les termes utilisés pour définir les personnes présentant un retard mental ont beaucoup évolué au cours du temps. Actuellement, la plupart des auteurs nomment cette population de « déficience mentale » de manière moins péjorative que par le passé où le terme consacré était « débile ». Au XIX siècle, Esquirol établit une classification des arriérations mentales en se basant sur des critères tels que la dysmorphie, l'état du langage, le déficit de jugement, l'incapacité mnésique et le manque de volonté. En outre, il différencie l'idiotie de la démence. La démence est une perte progressive des facultés intellectuelles alors que l'idiotie est l'état. Par la suite, c'est avec l'obligation scolaire que la déficience intellectuelle a été associée à l'insuffisance de moyens intellectuels. Seguin, en 1837, fut le premier à différencier les idiots, les imbéciles et les débiles. En 1904 Binet met en place une mesure scientifique de l'intelligence, le Quotient Intellectuel (QI) à partir de laquelle il propose une classification exposée ci-dessous:

-Un idiot est un enfant incapable de communiquer avec ses semblables; son âge mental correspond à celui d'un enfant de 0 à 2ans et il est inapte à la parole.

-Un imbécile est un enfant qui n'arrive pas à communiquer par écrit avec ses semblables, ni à lire ni écrire et qui présente un âge mental d'un enfant de 3 à 7 ans.

-Un débile est un enfant qui sait communiquer avec ses semblables par écrit et par la parole mais qui présente une déficience intellectuelle qui se traduit par un retard mental dans ses études; son âge mental est celui d'un enfant de 8 à 12ans.

En 1959 l'Association Américaine sur la déficience mentale propose une définition de l'arriération : état dans lequel les aptitudes mentales sont diminuées par suite de causes pathologiques. La même année les recherches en génétique humaine ont permis la découverte de la trisomie 21 par l'équipe du Dr Jérôme Lejeune. On lui donne également le nom de syndrome de Down en référence au Dr Down qui avait préalablement fait une description très détaillée des personnes atteintes de trisomie 21. Il les a comparés aux orientaux considérés à l'époque comme une race inférieure et dont le développement ne serait pas terminé, d'où le terme « mongolien », qui a largement été utilisé jusqu'à récemment pour qualifier cette population. Cette découverte a permis de mieux comprendre le fonctionnement cérébral et physiologique de la personne. Selon Zazzo (1965), la déficience mentale est une insuffisance

intellectuelle irréversible, d'origine biologique, due à l'hérédité ou à un accident précoce, compatible avec l'acquisition scolaire de base mais ne permettant pas d'atteindre le minimum intellectuel exigé par l'école. Zazzo introduit alors la notion d'hétérochronie, le débile comparé à l'enfant normal se développe à des vitesses différentes suivant les étapes du développement psycho-biologique. Selon cette notion, la débilité est moins un déficit intellectuel qu'une structure mentale particulière. En 1975, Mises, dans une approche plus psychanalytique, a définit les déficiences harmoniques et dysharmoniques. Il s'est intéressé à la personnalité des individus déficients intellectuels. Il explique que s'il existe des dysfonctionnements précoces d'ordre neurologique, ils influencent nécessairement l'évolution pulsionnelle, l'accès à l'individuation et l'élaboration des fonctions symboliques. Malgré la multiplicité des termes (déficience, retard, arriération, oligophrénie, débilité), un consensus se dégage, une définition des déficiences mentales est établie selon trois caractéristiques : un fonctionnement intellectuel général significativement inférieur à la moyenne, la notion de désadaptation sociale et l'apparition au cours du développement.

II. Définitions

A. La classification

Trois classifications, présentées ci-dessous, définissent des critères diagnostiques pour la déficience mentale.

3. Le DSM-IV-TR

Il s'agit d'un fonctionnement intellectuel général significativement inférieur à la moyenne, le niveau de QI est inférieur ou égal à 70 et les troubles apparaissent avant l'âge de 18 ans. Le fonctionnement adaptatif est altéré dans au moins deux des secteurs suivants: la communication, l'autonomie, la vie domestique, les aptitudes sociales, la mise à profit des ressources de l'environnement, la responsabilité individuelle, l'utilisation des acquis scolaires, le travail, les loisirs ou encore la santé et la sécurité.

4. La CIM-10

L'organisation mondiale de la santé définit le retard intellectuel comme un arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par une insuffisance des facultés et du niveau global d'intelligence, notamment au niveau des fonctions cognitives, du langage de la motricité et des performances sociales. Comme le DSM-IV-R, la CIM-10 définit quatre degrés de retard mental classés en fonction du QI.

5. La CFTMEA-R

La classification française des troubles mentaux définit le niveau mental et la catégorie de la déficience. Le retard mental peut être léger, modéré ou profond. Les déficiences sont classées en plusieurs catégories:

- harmoniques, elles sont fixes et peu évolutives
- dysharmoniques, elles présentent un processus évolutif, avec des poly-handicaps sensoriels et/ou moteurs et des démences.

6. La classification selon le QI

Les trois classifications distinguent quatre degrés dans le retard mental, évalué par la mesure du QI. En admettant un QI moyen de 100 et un écart-type de 15 dans la population générale, l'échelle de classement est la suivante (QI déterminés selon le test de Wechsler) :

-Retard léger: le QI se situe entre 50/55 et 70 et décrit des personnes connaissant des difficultés scolaires mais capables de s'intégrer à la société de façon autonome à l'âge adulte. Cette catégorie représente 85% des déficients mentaux.

-Retard modéré: le QI se situe entre 35/49 et 50/55 et décrit des personnes connaissant dans l'enfance des retards de développements importants mais ayant de bonnes capacités de communication et une indépendance partielle. Ces individus, qui représentent 10% des déficients mentaux, ont des problèmes d'intégration dans la société à l'âge adulte. Leur niveau intellectuel ne dépasse pas celui du CP.

-Retard grave: le QI se situe entre 20/25 et 35/40 et définit des personnes ayant besoin d'une assistance prolongée. Leur âge mental ne dépasse pas celui d'un enfant de 2 à 3 ans, leur langage est rudimentaire et les acquisitions sont incomplètes. Ce trouble concerne 3 à 4% des déficients mentaux.

-Retard profond: le QI est inférieur à 20/25 et représente des personnes ayant peu de capacités à communiquer, une absence de langage, des troubles moteurs graves et une autonomie très limitée voire nulle. Un à deux pourcent des déficients mentaux sont concernés par ce retard.

Cette classification a été simplifiée par l'association Américaine sur le Retard Mental (American Association of Mental Retardation, 1992), qui a définit deux degrés de sévérité: le retard mental sévère (QI<50) et le retard mental léger (50<QI<70).

7. Les tests psychométriques

L'exploration des capacités intellectuelles repose sur des tests psychométriques qui ne doivent jamais être utilisés isolément. Les données qu'ils fournissent doivent être interprétées en fonction de l'histoire et du contexte de vie de l'enfant. En effet le développement des capacités cognitives, du langage, de la motricité et de la socialisation de l'enfant sont très dépendants de son développement affectif.

Plusieurs tests et échelles existent, la plus utilisée en France chez l'enfant de moins de 3 ans est celle de Brunet-Lézine révisée par Josse en 1997, dans laquelle ils définissent un Quotient de Développement (QD). Les tests de développement permettent également de définir l'âge mental des enfants de plus de 3 ans et leur QI.

Le QI de Wechsler est différent de celui précédemment cité, il précise un QI verbal et de performance au sein du QI total. Les échelles de Wechsler sont les plus utilisées chez l'enfant de plus de 4 ans. La note de QI d'un sujet situe ses performances dans une distribution gaussienne de notes. Les échelles de Wechsler comprennent des épreuves verbales et non verbales.

B. Prévalence

La prévalence de la déficience mentale est de l'ordre de 1 à 3% dans la population générale (Chelly *et al.*, 2006). On estime qu'il y a 1,2 garçon pour une fille (McLaren et

Bryson, 1987), voir 2,2 garçons pour une fille lorsque le retard mental est sévère, suggérant que les gènes localisés sur le chromosome X seraient impliqués dans une proportion non négligeable des déficiences mentales (Lemay *et al.*, 2003). Les retards mentaux (RM) sévères ont une incidence estimée entre 0,3 et 0,4%, les retards mentaux légers quant à eux pourraient concerner jusqu'à 3% de la population générale (Moser H.W., 2004). La prévalence des patients atteints de retard mental sévère représente 10 à 20% des retards mentaux (Roeleveld *et al.*, 1997). La plupart des retards mentaux modérés ont tendance à être d'ordre familial ou polygénique comparativement aux retards mentaux sévères qui apparaissent plus sporadiquement (Lemay *et al.*, 2003).

III. Etiologie

Toutes les atteintes du système nerveux central quelle qu'en soit la cause, sont susceptibles d'entrainer une diminution des capacités intellectuelles. Sur le plan statistique, il existe une corrélation entre la profondeur du déficit intellectuel et l'existence d'une étiologie organique : plus le déficit est profond, plus la probabilité de trouver une cause organique est grande.

Les causes de déficience mentale sont multiples et variées, elles sont identifiées dans environ 50% des cas et présentées dans le

Tableau 5 (Curry *et al.*, 1997, Chelly *et al.*, 2006). Plus de 1000 maladies ont, par ailleurs, été associées au retard mental (Chelly *et al.*, 2006).

La déficience mentale peut être qualifiée de syndromique lorsqu'elle est associée à des signes cliniques, radiologiques, métaboliques ou biologiques. Dans les formes de déficience mentale non syndromiques le déficit cognitif est isolé. Cependant la frontière entre les deux n'est pas si aisée à définir, car lorsque les signes cliniques sont détaillés, des formes, jusqu'alors non syndromiques, peuvent apparaitre syndromiques (Frints *et al.*, 2002, Ropers H.H. et Hamel B.C., 2005).

Tableau 5 : Causes principales de retard mental et leur fréquence (D'après Curry *et al*., 1997)

Causes	**Fréquences**
Anomalies chromosomiques	4 – 28%
Syndromes dysmorphiques	3 – 7%
Maladies génétiques connues	4 – 14%
Anomalies morphologiques du système nerveux central	7 – 17%
Complications liées à la prématurité	2 – 10%
Retard mental lié à l'environnement-familial	3 – 12%
Facteurs environnementaux et médicamenteux	5 – 13%
Causes endocriniennes	1 – 5%
Inconnues	30 – 50%

Les causes anténatales représentent environ 80% des déficiences mentales, les causes périnatales et postnatales représentent, quant à elles, environ 10% chacune. La majorité des causes anténatales a un déterminisme génétique hormis les embryopathies et les fœtopathies toxiques ou infectieuses qui sont liées à des facteurs environnementaux. Les causes périnatales et postnatales semblent, quand à elles, avoir une étiologie environnementale.

Une étude menée par Stevenson (2003) et reprise par Rogers en 2008, sur une population de 10997 individus de Caroline du Sud, âgés de 20 ans et dont 59% étaient des garçons, illustre la fréquence des causes de déficience mentale classées d'un point de vue génétique et environnemental. Cette répartition est illustrée sur la Figure 4.

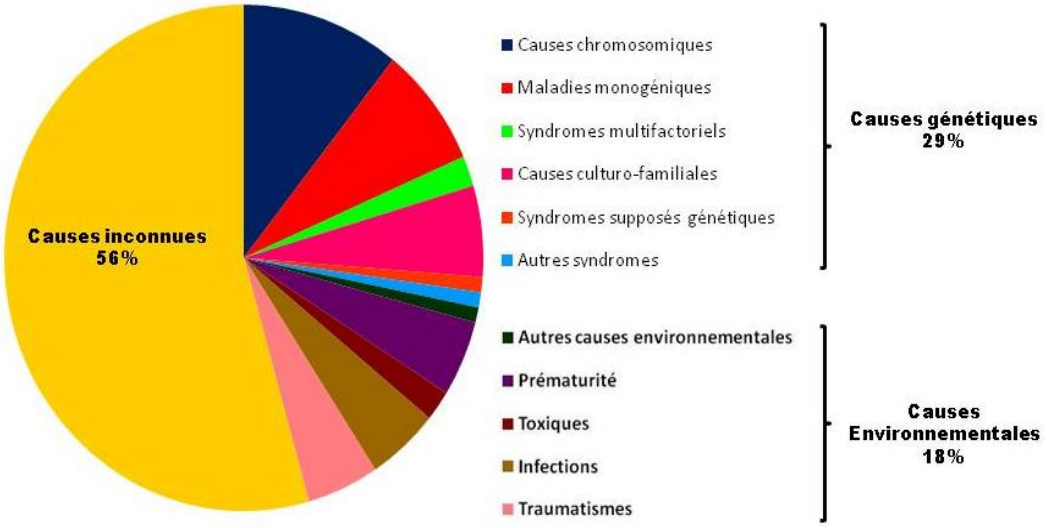


Figure 4: Répartition des causes de déficience mentale d'après Stevenson *et al.*, 2003, Rogers *et al.*, 2008.

A. Les causes environnementales

Les fœtopathies et les embryopathies d'origine toxique, infectieuse ou métabolique peuvent expliquer le développement d'une déficience mentale d'origine prénatale.

Par ailleurs, le syndrome d'alcoolisme fœtal (FAS) est sans doute une des causes les plus fréquentes de déficience mentale. Selon les communautés, la prévalence varie entre 0,6 et 3/1000 (Lemay *et al.*, 2003). Les personnes atteintes de FAS présentent un QI variant de normal à sévèrement bas. La plupart des individus ont des difficultés d'apprentissage, des déficits d'attention de fonctionnement adaptatif, une hyperactivité et ces caractères sont associés à une dysmorphie faciale. En outre, des déficiences mentales ont été observées chez des patients ayant souffert, *in utéro*, de déficits en iode ou ayant été exposés à l'iode radioactif. Les infections intra-utérines liées à la toxoplasmose, la rubéole, ou au cytomégalovirus, semblent être responsables de 3 à 8% des déficiences mentales (Bower *et al.*, 2000). Parmi les anomalies métaboliques citons le cas de la phénylcétonurie maternelle traitée puis oubliée ou asymptomatique qui provoque une déficience mentale dans 100% des cas avec microcéphalie et retard de croissance intra-utérin. Les déficiences mentales liées à la souffrance fœtale existent encore, malgré les progrès liés à l'obstétrique; l'anoxie cérébrale et l'ictère nucléaire (lié à un taux élevé de bilirubine) en sont les principales manifestations. Ces

déficiences mentales associées à celles liées à la prématurité représentent, quant à elles, environ 5% des cas.

Les causes postnatales sont responsables de 3 à 15% des déficiences mentales, dont la moitié par traumatisme (enfants secoués), les autres cas englobent les séquelles d'affections cérébrales (tumeurs cérébrales, hydrocéphalies, encéphalites aiguës), les effets des psychotropes (15% des enfants recevraient des psychotropes de façon chronique), la malnutrition et un environnement socioculturel défavorable.

B. Les causes génétiques

Les principales causes génétiques de la déficience mentale sont exposées Figure 5. Il est actuellement admis qu'environ 50% des déficiences mentales seraient d'origine génétique (Curry *et al.*., 1997, Stevenson *et al.*., 2003, Winnepenninckx *et al.*., 2003). Des mutations, préalablement décrites dans certains cas de déficience mentale, impliqueraient plusieurs gènes simultanément (Ropers *et al.*., 2007).

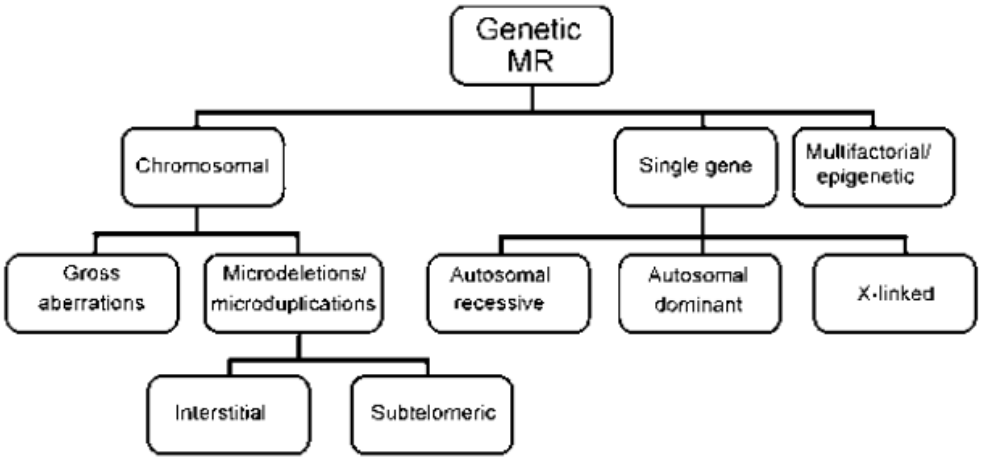


Figure 5 : Principale causes génétiques de la déficience mentale (Basel-Vanagaite L., 2008).

1. Les anomalies chromosomiques

Dans ce chapitre nous traiterons uniquement les anomalies détectables par les techniques de cytogénétique conventionnelle (>1Mb). Les microremaniements visibles par la méthode d'hybridation génomique comparative sur puces (CGH array) seront abordés dans un chapitre spécifique.

Les anomalies chromosomiques touchent aussi bien les autosomes que les gonosomes. Ces modifications du génome peuvent être rassemblées en deux groupes : les anomalies de nombre et les anomalies de structure. Leur fréquence, sans compter la trisomie 21, est de 0,75% (1 cas sur 130) et atteint 0,9% (1 cas sur 110) en comptant la trisomie 21. Les principales conséquences de ces anomalies sont:

-la naissance d'enfants polyhandicapés dont le degré de handicap est très variable.

-la perte de l'enfant *in utéro*, à la naissance, ou ultérieurement.

-la survenue de fausses couches, de stérilité ou encore d'hypofertilité.

On constate que les anomalies compatibles avec la survie des enfants concernent le plus souvent les chromosomes X, Y et 21.

Les anomalies de nombre se caractérisent par un excès ou l'absence d'un ou plusieurs chromosomes complets dans la cellule. L'anomalie est homogène si elle est présente dans toutes les cellules de l'organisme. L'anomalie est dite mosaïque si elle n'est présente que dans certaines cellules ou encore lorsque dans un même organisme, on est en présence de deux populations cellulaires génétiquement différentes (par exemple 30% de 48, XXYY et 70% de 48, XXXY). La seule monosomie complète viable concerne le chromosome X; il s'agit du syndrome de Turner. La présence d'un chromosome surnuméraire est responsable de l'apparition d'une trisomie; la plus fréquente est la trisomie 21 avec une prévalence de 0,12%. Des trisomies au niveau des paires 13 et 18 existent de façon moins fréquente. Cependant, d'autres caryotypes à 47 chromosomes sans handicap particulier existent : la disomie 47, XXY ou syndrome de Klinefelter, la disomie 47, XYY ou double Y, le triple X ou 47, XXX. D'autres marqueurs autosomiques surnuméraires ont été répertoriés, les plus fréquents sont la tétrasomie 22q, la tétrasomie 18p, et la tétrasomie 12p.

Les anomalies de structure se caractérisent par la modification de structure d'un fragment de chromosome qui peut entrainer un défaut ou un excès de matériel génétique. Ces anomalies peuvent être équilibrées s'il n'y a pas de perte ni addition de matériel chromosomique, le sujet porteur est normal. Dans le cas d'anomalies déséquilibrées, il y a perte ou excès de matériel chromosomique, avec des conséquences plus ou moins importantes du point de vue de la viabilité ou du handicap pour le sujet porteur.

Les anomalies de structure sont complexes et il en existe un grand nombre parmi elles : les translocations réciproques, les duplications et les délétions (Figure 6).

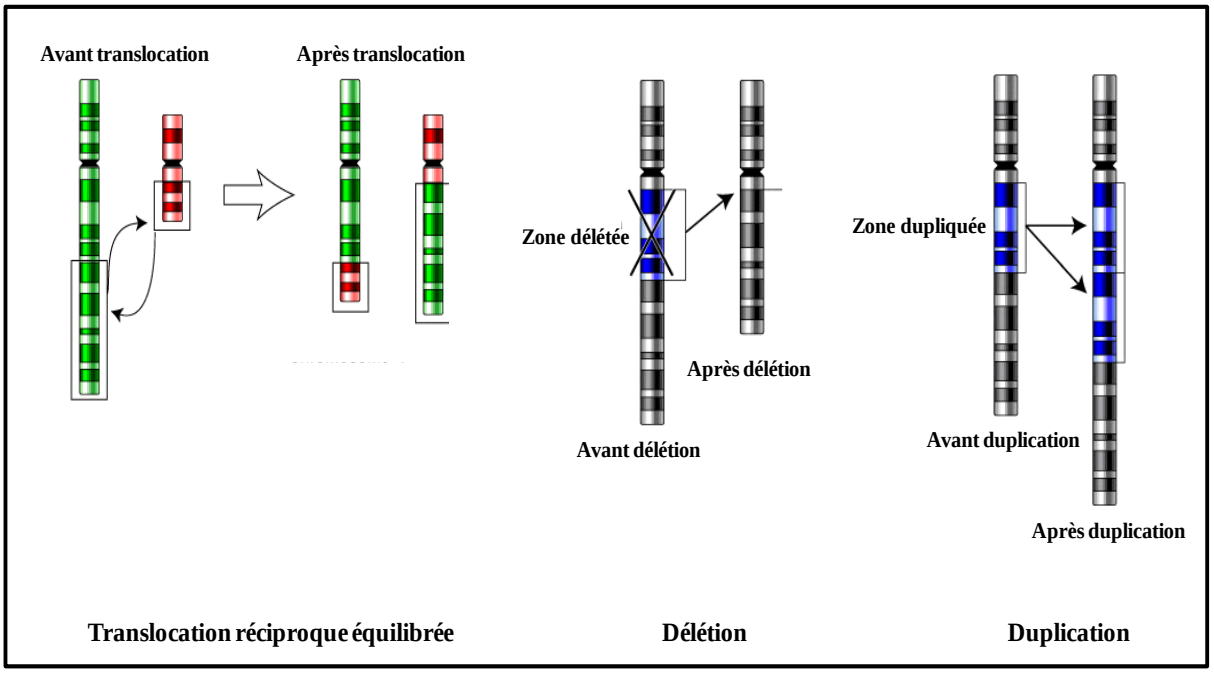


Figure 6: Schéma simplifié de trois cas d'anomalies de structure chromosomique.

Dans le cas d'une délétion un fragment de chromosome est perdu, les délétions peuvent être interstitielles ou terminales. Une délétion 5p au niveau de la zone 5p15.2 correspond à la maladie du cri du chat (1 naissance sur 50 000). La délétion 4p dans la zone 4p16.3 correspond au syndrome de Wolf. Les délétions 22q11.2 et 7q11.23 correspondant respectivement au syndrome de diGeorge (1/5000 naissances) et au syndrome de Williams restent assez fréquentes (1/7500 à 1/10 000) (Stromme *et al..*, 2002). Il existe aussi des inversions, on observe une double rupture suivie du retournement d'un fragment chromosomique, puis du recollement de ce même fragment. Une duplication correspond à un doublement de matériel génétique sur un chromosome.

Actuellement les anomalies subtélomériques sont responsables de 5 à 7% de l'ensemble des DM, cette fréquence est intermédiaire entre celle de la trisomie 21 et celle de l'X fragile. Des délétions de l'extrémité de la plupart des chromosomes ont été observées chez des patients atteints de déficience mentale (De Vries *et al.*, 2003). Ces anomalies ont émergé comme cause significatives des déficiences mentales avec le développement de nouvelles techniques d'analyse du génome telles que la CGH-array ou l'amplification multiple de sondes dépendantes d'une ligation (MLPA). Dans certains cas, les pertes de matériel génétique sont associées à des syndromes reconnaissables, mais malgré tout, la définition d'un phénotype clinique spécifique permettant d'orienter les recherches vers les anomalies

subtélomériques est très difficile du fait du faible nombre de patients présentant ce type de délétions. De Vries (2001) a proposé des critères pour faciliter la présélection des patients avec une déficience mentale modérée à sévère, cependant les anomalies subtélomériques sont également fréquentes chez les patients ayant une déficience mentale légère (Rodriguez-Revenga *et al.*, 2004, Koolen *et al.*, 2004, Bocian *et al.*, 2004).

De même, les microremaniemments interstitiels principalement mis en évidence par CGH-array expliqueraient une part importante des déficiences mentales idiopathiques (Visser *et al.*, 2003, Fan *et al.*, 2007, Froyen *et al.*, 2007).

Les remaniements chromosomiques mis en évidence chez les patients avec une déficience mentale suggèrent un lien de cause à effet entre la rupture ou l'inactivation d'un gène par l'un des points de cassure du remaniement et le phénotype observé. Ces phénomènes même rares sont extrêmement intéressants pour l'identification de nouveaux gènes candidats dans les déficiences mentales.

2. Les maladies monogéniques

Les études familiales dans lesquelles il a été observé une fréquence anormalement élevée de déficiences mentales au sein d'une même famille ont suggéré un mode de transmission mendelien de la pathologie. Le mode de transmission détermine le risque de récurrence intrafamiliale (Tableau 6). Des mutations dans un seul gène peuvent être responsables d'une grande variété de perturbations cliniques associées ou non à une déficience mentale.

Tableau 6 : Risque de récurrence de déficience mentale liée à des mutations monogéniques en fonction du mode de transmission (d'après Basel-Vanagaite L., 2008).

Mode de transmission	**Risque de récurrence dans la descendance pour des couples ayant un enfant atteint**	**Risque de récurrence dans la descendance des germains d'individus masculins avec retard mental***	**Risque de récurrence dans la descendance des germains d'individus féminins avec retard mental***
Autosomique récessive	25%	<1%	<1%
Autosomique dominante **	50%	Identique à la population générale	Identique à la population générale
Autosomique dominante (néomutation chez l'enfant)	<1%	Identique à la population générale	Identique à la population générale
Liée au chromosome X, récessive	50% pour la descendance garçon; caractères cliniques modérés, probablement > 50% pour la descendance fille	Identique à la population générale	25% pour la descendance garçon; caractères cliniques modérés, probablement> 25% pour la descendance fille
Liée au chromosome X, récessive (néomutation chez l'enfant)	<1%	Identique à la population générale	Identique à la population générale

* dans des couples non-consanguins

**En supposant une pénétrance incomplète

La plupart des cas de déficience mentale où l'étiologie est connue, concernent une transmission liée au chromosome X (DMX). Les DMX représentent 16% des DM chez les garçons (Stevenson R.E. et Schwartz C.E., 2009). Parmi les DMX, le syndrome de l'X fragile (FXS) est la première cause de retard mental héréditaire, l'ensemble des études met en évidence que 2% des patients présentant une déficience mentale sont porteurs de ce syndrome. Les caractéristiques de ce syndrome ont précédemment été développées dans la partie « génétique de l'autisme, syndromes génétiques ». Les études de cytogénétiques chez des enfants déficients mentaux ainsi que les études de liaison ont permis l'identification d'un site fragile en Xq27.3 et de définir les caractéristiques moléculaires du FXS (Oberle *et al.*, 1991). Le ratio de 1,3 garçon FXS pour une fille a, très tôt, suggéré l'implication du chromosome X dans la pathologie; par la suite, l'identification du gène *FMR1* a renforcé les premières hypothèses. Le concept qu'un seul gène pouvait être responsable de déficiences mentales était établi, ceci, malgré le fait que les patients FXS présentent des anomalies associées telles que de grandes oreilles, une mâchoire proéminente, une macro-orchidie, une scoliose et parfois des anomalies cardiaques (Richards *et al.*, 1981). La notion de déficience mentale syndromique et non syndromique a largement été utilisée, elle a permis de définir des groupes pour effectuer des analyses de liaison afin de localiser les gènes responsables des anomalies. Cependant ce concept devient moins évident depuis que des études ont montré que des mutations d'un même gène pouvaient être responsables à la fois de déficience mentale syndromique et non syndromique. Le gène *ARX* en est un exemple, une duplication de 24 pb dans l'exon 2 provoque des déficiences mentales non syndromiques mais aussi le syndrome de West ou encore le syndrome de Partington (Stromme *et al.*, 2002, Bienvenu *et al.*, 2002), cette hétérogénéité phénotypique pourrait être liée au fond génétique spécifique de chaque famille. Des observations similaires sont faites pour le gène MECP2 (responsable du syndrome de Rett), le gène RPS6KA3 (responsable du syndrome de Coffin-Lowry) et le gène ATRX (responsable de l'α- thalassémie) (Raymond F.L., 2010). Les mutations de ces gènes dans des familles DMX non syndromiques s'expliqueraient par le fait qu'il n'y aurait qu'une perte partielle de fonction de la protéine codée.

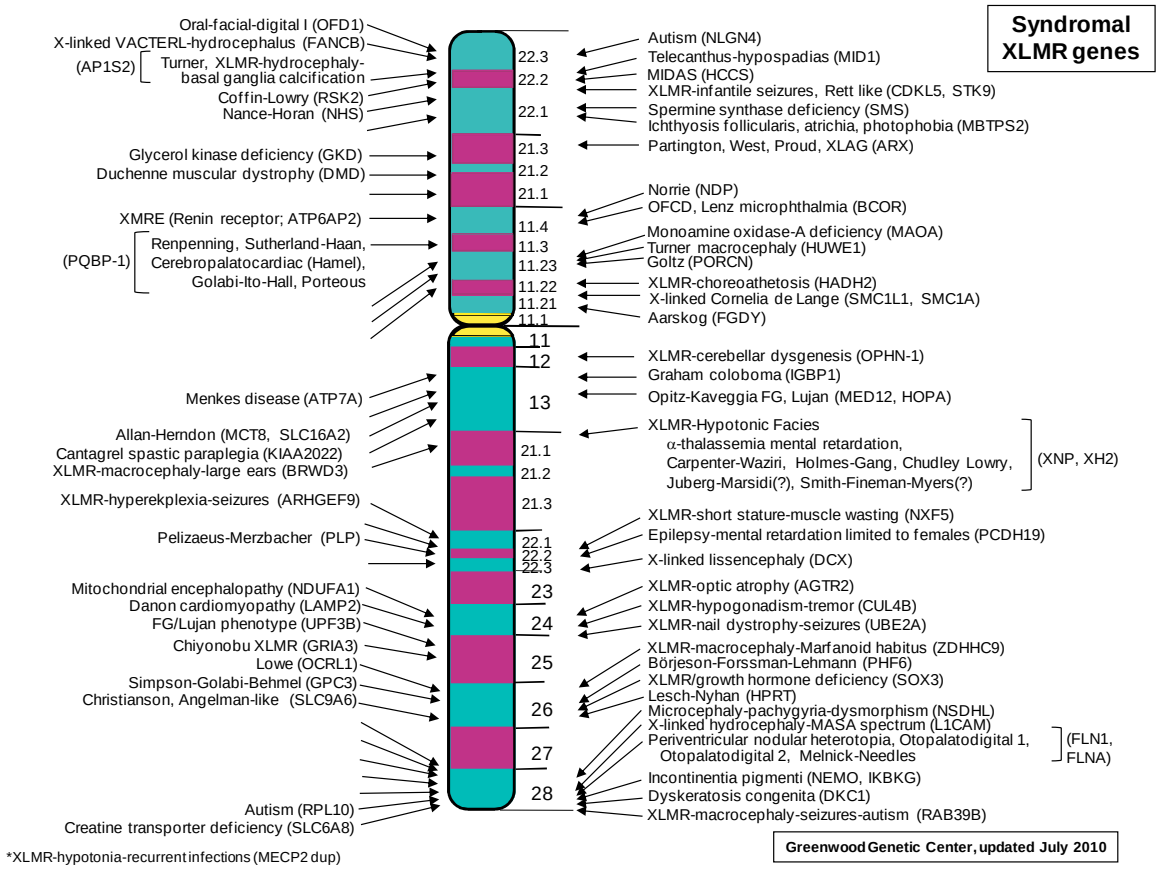


Figure 7 : Formes syndromiques de DMX ainsi que les gènes en cause. Figure extraite du site internet http://www.ggc.org/xlmr.htm. Carte réalisée par l'équipe de Stevenson R.E. et Schwartz C.E. (mise à jour juilllet 2010).

Depuis les années 2000 l'identification de nouveaux gènes responsables de retard mental a pris un nouvel essor avec le développement des nouvelles technologies, ainsi deux grandes études internationales EURO-MRX et IGOLD ont permis l'identification de nouveaux gènes responsables de DMX. Plus de 70 gènes localisés sur le chromosome X, lorsqu'ils sont mutés peuvent induire une déficience mentale syndromique ou non (Figure 7). Ces gènes représentent 10% des gènes du chromosome X. L'ensemble des études sur les patients avec déficience mentale suggèrent donc que la plupart des gènes impliqués dans les fonctions intellectuelles sont localisés sur le chromosome X. Les évènements de recombinaison sur le chromosome X chez l'homme sont limités aux périodes où les paires de chromosomes se forment. Par définition pour les chromosomes sexuels, cela n'est possible que chez les femmes, excepté pour les régions peudo-autosomiques du chromosome X. Ainsi le taux de perte ou de gain de gènes par recombinaison sur le chromosome X est plus faible que celui des autosomes. Toutefois au cours de l'évolution des espèces, il apparait que le taux de mouvement des gènes du chromosome X est supérieur à celui des autosomes. De nombreux gènes sont des répliques d'un gène parent, une duplication facilitée par entre autre

des mécanismes de rétroposition. L'origine chromosomique de nombreux rétrogènes se trouve être le chromosome X. Le positionnement d'un gène sur le chromosome X permettrait à la séquence d'évoluer vers de nouvelles fonctions dans un environnement préservé, ce qui expliquerait qu'une part importante des gènes impliqués dans les fonctions cérébrales soit située sur le chromosome X (Raymond F.L., 2010).

Actuellement peu de gènes autosomiques ont été associés aux déficiences mentales non syndromiques. Ceci peu s'expliquer par l'absence de grandes familles avec plusieurs sujets atteints sur plusieurs générations contrairement aux familles de déficiences mentales liées au chromosome X. De plus si le tableau clinique ne comporte aucun signe physique ou psychiatrique, il est très difficile de déceler le caractère génétique de ces pathologies, d'individualiser puis de regrouper des sous groupes cliniques de plusieurs familles et enfin d'élaborer des stratégies d'identification des gènes en cause. Dans les modes de transmission autosomiques dominants, les cas sont principalement sporadiques. Le mode dominant signifie que chaque enfant a une probabilité de 50% d'hériter de l'allèle causant la maladie. Un exemple d'hérédité dominante associée à un retard mental est la sclérose tubéreuse de Bourneville. Les transmissions autosomiques récessives concernent plus particulièrement les déficiences mentales liées à une anomalie métabolique où la perte de fonction des allèles entraine une diminution d'activité enzymatique suffisante pour provoquer la maladie comme dans le cas de la phénylcétonurie ou la galactosémie. Le mode récessif signifie que les deux parents sont porteurs de la mutation responsable de la maladie sans en présenter les symptômes ; l'enfant atteint héritera des allèles mutés de chacun de ses parents. Les génopathies autosomiques récessives peuvent être détectées uniquement si plusieurs sujets d'une même génération sont atteints, ce qui est plus fréquent dans les familles consanguines.

L'ensemble des gènes impliqués dans les déficiences mentales sont répertoriés dans le Tableau 7. A ce jour, 6 gènes ont été impliqués dans des déficiences mentales autosomiques récessives: le gène PRSS12, localisé en 4q24-q26, et codant la neurotrypsine (Molinari et al., 2002), le gène *CRBN* ou cereblon, localisé en 3pter et codant une protéine appartenant à un complexe ubiquitine ligase E3 (Higgins J.J. et al. 2004), le gène *CC2D1A* localisé en 19p13 et codant un facteur de transduction du signal impliqué dans la régulation positive de la cascade I-kB kinase/ NF-kappa-B (Basel-Vanagaite et al., 2006), le gène *GRIK2*, localisé en 6q21 et codant le récepteur ionotropique 6 du glutamate (Motazacker et al. , 2007); le gène *TUSC3*, localisé en 8p22 et codant une oligosaccharyltransférase liée au réticulum endoplasmique (Garshasbi et al., 2008) et enfin, le gène *TRAPPC9*, localisé en 8q24 et codant une protéine activateur de NF-kappa-B (Mir et al., 2009).

Parmi les gènes responsables de déficience mentale autosomique syndromique citons *UBE3A* (syndrome d'Angelman), *CREBBP* (syndrome de Rubinstein Taybi), *EHMT1* (syndrome 9q34), *RAI1* (syndrome de Smith-Magenis) et *ZEB2* (syndrome de Mowat-Wilson).

Tableau 7 : Exemples de gènes impliqués dans les déficiences mentales syndromiques et non syndromiques regroupés selon la fonction intracellulaire de la protéine codée (Raymond F.L., 2010).

Function	Gene	OMIM	Location	Disease	Syndromic	Non-syndromic
DNA and chromosomes	*ATRX*	300032	Xq21	ATRX	×	×
	RSK2 (RPS6KA3)	300075	Xp22.2	Coffin Lowry	×	×
	ZNF41	314995	Xp11.3			×
	ZNF81	314998	Xp11.23			×
	CREBBP	600140	16p13.1	Rubinstein-Taybi	×	
	RAI1	607642	17p11.2	Smith Magenis	×	
	EHMT1	607001	9q34	9q34 syndrome	×	
	CUL4B	300354	Xq24	macrocephaly	×	
	UBE3A	601623	15q11.2	Angelman	×	
	MED12	300188	Xq13.1	FG, Lujan Fryns	×	
	BRWD3	300553	Xq13.1	macrocephaly	×	×
DNA replication repair and recombination	*ERCC8*	609412	5q12	Cockayne	×	
	ERCC6	609413	10q11	Cockayne	×	
From DNA to protein, control of gene expression	*PHF6*	300414	Xq26.3	BFLS	×	
	FTSJ1	300499	Xp11.23			×
	FMR1	309550	Xq27.3	Fragile X	×	×
	FMR2	309548	Xq27.3			×
	MECP2	300005	Xq28	Rett syndrome	×	×
	JARID1C (SMCX)	314690	Xp11.22		×	×
	ARX	300382	Xp22.13	Partington, Wests	×	×
	PQBP1	300463	Xp11.23		×	
	UPF3B	300298	Xq25		×	×
Membrane structure	*NLGN4*	300427	Xp22.23	Autism	×	
	CASK	300172	Xp11.4		×	×
	DLG3	300189	Xq13.1			×
	IL1RAPL1	300206	Xp21.2			×
Membrane transport of small molecules and the electrical properties of membranes	*SYN1*	313440	Xp11.3		×	
	GRIK2	138244	6q21		×	×
	SLC6A8	300036	Xq28		×	
	SLC9A6	300243	Xq26		×	
	SLC16A2	300523	Xq13.2		×	
Intracellular compartments, protein sorting, vesicular traffic	*CC2D1A*	610055	19p13			×
	ZDHHC9	300646	Xq26		×	
	AP1S2	300629	Xp22		×	×
	TUSC3	601385	8p22			×
Cell communication-signalling	*GDI1*	300104	Xq28			×
	ARHGEF6	300267	Xq26.3			×
	PAK3	300142	Xq23			×
	CRBN	609262	3p26.2			
	AGTR2	300034	Xq23			×
	TSPAN7	300096	Xq11			×
	FGD1	300546	Xp11.22	Aarskog	×	×
	PRSS12	606709	4q21			×
	OPHN1	300127	Xq12	cerebellar hypoplasia	×	×
The cytoskeleton	*MID1*	300552	Xp22.2	Opitz GBBB	×	
	SHROOM4	300579	Xp11.2		×	×
Cell cycle and programmed cell death	*CENPJ*	609279	13q12	microcephaly	×	
Mechanics of cell division	*ASPM*	605481	1q31	microcephaly	×	
	MCPH1	607117	8q23	microcephaly	×	

Troisième partie :
Stratégies d'indentification de nouveaux gènes dans l'autisme et la déficience mentale

I. Introduction

L'autisme et la déficience mentale sont des maladies complexes avec une récurrence familiale, cependant leur caractère héréditaire dans la majorité des cas ne suit pas les lois de Mendel. Ces deux pathologies apparaissent multifactorielles liées à l'interaction d'une composante génétique polygénique et de facteurs environnementaux. L'apparition de la maladie est occasionnée par l'anomalie de plusieurs gènes appelés gènes de susceptibilité. Deux méthodes non paramétriques complémentaires sont le plus souvent utilisées pour localiser et identifier les gènes de susceptibilité prédisposant à une maladie multifactorielle : l'analyse des paires de germains atteints, qui permet de localiser un gène de susceptibilité, et les études d'association. Deux modèles génétiques ont été proposés pour expliquer les maladies complexes : le modèle polygénique à seuil (Figure 8A) et le modèle mixte (Figure 8B).

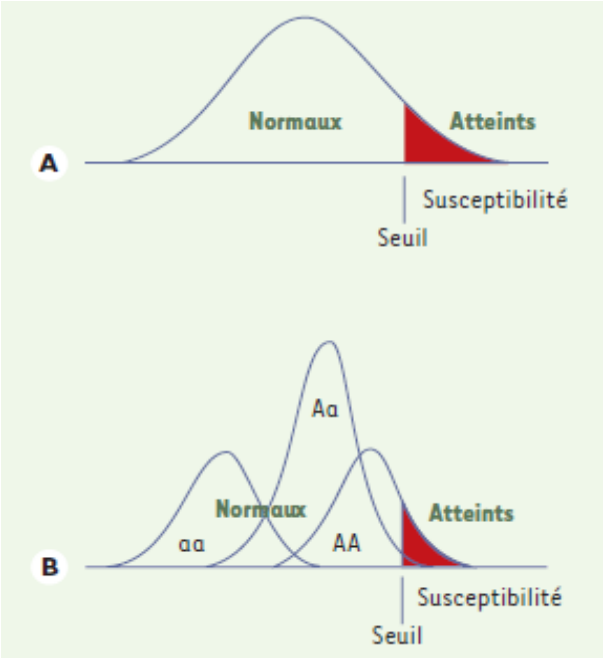


Figure 8 : Modèle génétique. A polygénique à seuil. B mixte. (Feingold J, 2005)

Dans le premier modèle, on suppose que la susceptibilité à la maladie est sous la dépendance de nombreux gènes (hérédité polygénique) et de facteurs environnementaux, dont

les effets individuels sont négligeables. Il en résulte une distribution gaussienne (courbe en forme de cloche) de la susceptibilité dans la population générale. Dès que la susceptibilité dépasse un certain seuil chez un individu, la maladie apparaît. Il s'agit donc d'une hérédité polygénique à seuil, qui intègre les facteurs environnementaux dans l'étiologie de la maladie. Dans le second modèle génétique, dit « mixte », la susceptibilité est sous le contrôle d'un gène majeur, dont l'action est toutefois modulée par un système polygénique et des facteurs environnementaux; la composante polygénique est moins nette dans ce modèle.

II. Les études de liaison

Les études de liaison dans le cas des maladies complexes sont principalement utilisées pour déterminer des loci de susceptibilité pour réaliser une cartographie plus fine par des études d'association et mettre en évidence des gènes de susceptibilité. Ces études sont basées sur une corrélation phénotype-génotype dans laquelle on recherche l'existence d'un lien entre un variant de l'ADN et le phénotype étudié. Une définition trop large du phénotype étudié a tendance à augmenter le taux de faux positifs qui peuvent fortement diminuer l'évidence de la liaison génétique tandis qu'une définition trop étroite augmente le taux de faux négatifs qui peuvent également diminuer la puissance statistique à générer une liaison génétique.

A. Le principe

Le principe de ces études est le suivant : si deux enfants d'une même fratrie sont atteints, c'est qu'ils partagent le même gène de susceptibilité. On va alors chercher à montrer la co-ségrégation d'un marqueur génétique avec une pathologie au sein de familles où plusieurs individus sont atteints. Si un des allèles du marqueur se transmet avec la pathologie plus souvent que ne voudrait le hasard, on en déduit qu'un gène impliqué dans la pathologie est situé à proximité du marqueur étudié. Le degré de liaison entre le locus du marqueur et le locus du gène en question se mesure par le taux de recombinaison θ, rapport entre le nombre de gamètes recombinés et le nombre total de gamètes. Suivant le modèle de transmission du caractère étudié, la mesure du degré de liaison génétique pourra être réalisée par une approche

paramétrique, bien souvent la méthode des Lod scores, ou par une approche non paramétrique, le plus fréquemment la méthode des paires de germains atteints. La méthode des Lod score est plus employée pour l'étude des maladies monogéniques, elle nécessite des familles avec de grands effectifs, elle reste peu adaptée à l'autisme mais a été utilisée dans les familles de retard mental lié à l'X.

La méthode des paires de germains atteints consiste à comparer, chez les couples de frères ou de sœurs atteints de la même maladie, le nombre d'allèles du marqueur génétique transmis en même temps par le père et la mère. Si le marqueur étudié est proche, voire dans un gène de susceptibilité impliqué dans la maladie, les paires de germains malades présenteront un excès d'allèles du marqueur en commun : cet excès s'explique par la liaison existant entre le locus marqueur et le locus impliqué dans la maladie. En l'absence de liaison, les probabilités que les deux germains atteints partagent 0, 1 ou 2 allèles identiques parentaux (IBD, *identity by descent*) sont respectivement de 1/4, 1/2 et 1/4. Ces proportions sont faciles à estimer si les quatre allèles parentaux sont différents. Ce type de méthode nécessite néanmoins d'avoir un grand nombre de paires de germains atteints afin de détecter de manière significative un ou des gènes de susceptibilité de la pathologie.

B. Les résultats des études de liaison par criblage du génome entier

Le criblage du génome consiste à réaliser un génotypage d'un grand nombre de marqueurs polymorphes situés sur tout le génome. Actuellement les études pangénomiques sont réalisées grâce à la technologie des puces SNP (single-nucleotide polymorphism). Dans ces études, on calcule le nombre d'allèles partagés et le nombre d'allèles non partagés entre les germains atteints pour chaque marqueur étudié. Les valeurs sont ensuite analysées par un test de chi2, en prenant comme hypothèse nulle, l'absence de liaison. Un maximum de Lod score (MLS) est alors calculé pour chaque marqueur et ceci permet de tracer une courbe MLS pour chaque chromosome. Les pics significatifs des courbes MLS représentent les sites portant un ou plusieurs locus de susceptibilité à la maladie ou au phénotype étudié.

1. Les études de liaison dans l'autisme

Ces études visaient à examiner la co-ségrégation de marqueurs génétiques avec certains caractères propres à l'autisme tels que le diagnostic d'autisme, la communication sociale, le langage, des données d'imagerie, des valeurs physiologiques et l'éveil. Ainsi des régions d'intérêt ont pu être décelées dans au moins deux études indépendantes et concernent les régions 2q21–33, 3q25–27, 3p25, 4q32, 6q14–21, 7q22, 7q31–36, 11p12–13, 17q11–21 (Szatmari *et al.*, 2007, Schellenberg *et al.*, 2006, Ma *et al.*, 2007, Freitag C.M., 2007, Duvall *et al.*, 2007, Alarcon *et al.*, 2008). Une étude récente (Allen-Brady *et al.*, 2009) réalisée avec une puce SNP de haute densité (10 000 SNP) et portant sur un pédigrée comprenant 7 patients autistes et 22 membres de la famille non atteints a permis d'identifier 3 régions précédemment décrites : 3q13.2-q13.31, 3q26.31-q27.3 et 20q11.21-q13.12. Une méta-analyse a confirmé la région 7q22-32 et observé une liaison pour les régions 10p12–q11.1 et 17p11.2–q12 (Trikalinos *et al.*, 2006). Cependant, dans une revue récente Abrahams et Geschwind (2008) soulèvent le problème que peu de loci identifiés ont été retrouvés dans des études indépendantes mis à part les régions 7q et 17q (Figure 9) (Cantor *et al.*, 2005). De ce point de vue, l'étude de l'Autism Genome Project Consortium, (2007) n'a pas donné de résultats marquants, car malgré un grand nombre d'échantillons (1168 familles) aucun locus significatif n'a été déterminé. Une étude a été réalisée *a postériori* en tenant compte de l'hétérogénéité des échantillons, sur deux ensembles de 57 familles provenant du Collaborative Linkage Study of Autism (CLSA). Les auteurs (Wassink *et al.*, 2008) ont rapporté la preuve d'une liaison pour 4 régions de susceptibilité (1q, 13p, 16q, et Xq) mais aucune preuve pour 2 autres régions auparavant décrites (7q et 13q). Bien souvent les études sont dans un premier temps réalisées sur un faible nombre d'échantillon, puis une nouvelle étude est de nouveau menée en élargissant la cohorte. Ceci ne permet pas toujours d'augmenter la liaison avec la maladie et a même tendance à diminuer le Lod score (Freitag *et al.*, 2010). Les marqueurs de susceptibilité peuvent être différents d'une population à l'autre, expliquant ainsi les différentes tendances de déséquilibre de liaison et soulevant de nouveau le problème d'hétérogénéité dans l'autisme.

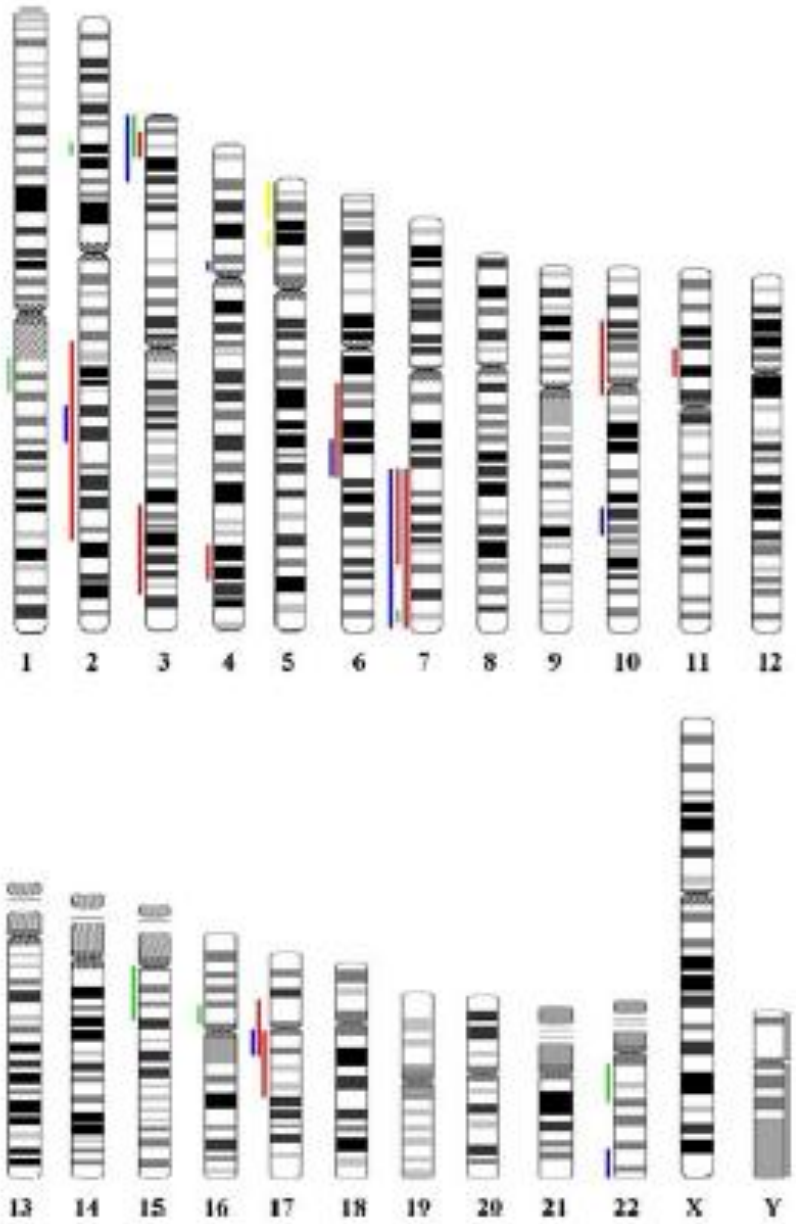


Figure 9 : Régions de susceptibilité à l'autisme (en rouge : études de liaison), (en jaune : études d'association sur génome entier), (en vert : CNV), (en bleu : gènes candidats), répliquées dans plusieurs études (Freitag *et al.*, 2010).

2. Les études de liaison dans la déficience mentale

Les études de liaison sur l'ensemble du génome sont peu répandues dans la littérature de la déficience mentale, ceci peut être expliqué par le fait que la principale voie d'approche pour la recherche de gènes candidats dans la déficience mentale est l'étude des remaniements chromosomiques équilibrés et notamment des translocations et inversions. Des études de liaison ont été réalisées sur le chromosome X afin de délimiter des zones d'intérêt (Figure 10).

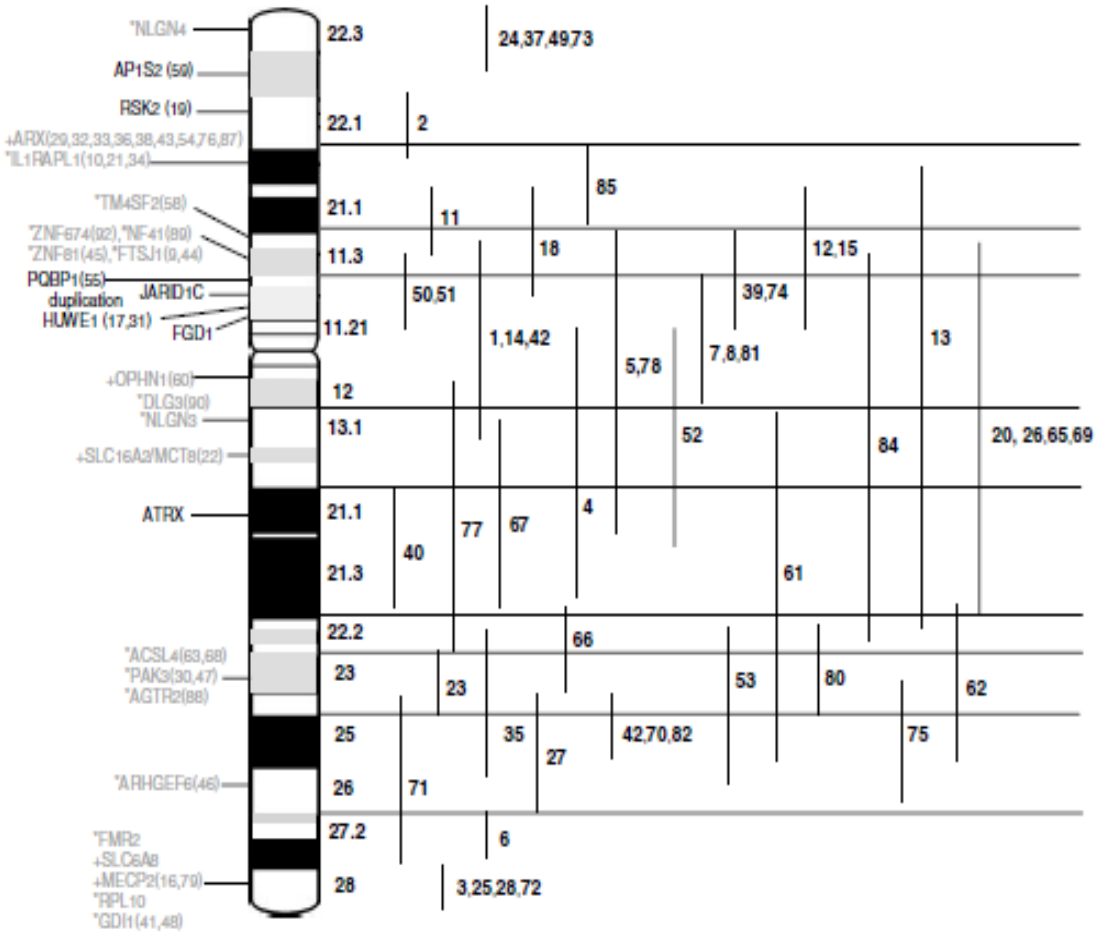


Figure 10 : Idéogramme du chromosome X avec la position des 50 pedigrees DMX. Les barres verticales indiquent les territoires de localisation obtenus par études de liaison/cytogénétique et le nombre positionné à côté correspond au nombre de cas dans les familles DMX. Les gènes identifiés comme étant impliqués dans les déficiences mentales liées à l'X sont indiqués à gauche du chromosome X et le nombre entre parenthèses correspond au numéro du pedigree DMX (Chiurazzi *et al.*, 2008).

Une étude conduite par Beleza-Meireles en 2008 dans une famille où 9 membres avaient un retard mental modéré non spécifique, 2 présentaient une schizophrénie et 13 membres non atteints, n'a pas montré de liaison significative; néanmoins les Lod scores les plus élevés ont été obtenus pour les chromosomes 13, 15 et 17. Une étude antérieure menée sur une population du Daghestan, d'origine caucasienne, a montré une liaison entre la région 12q23-24 et le retard mental non spécifique (Bulayeva *et al.*, 2005), la région 12q a également été liée à l'autisme par la méthode des paires de germains atteints, dans une étude en 2006, cependant le locus impliqué était différent (12q14) (Ma *et al.*, 2007).

III. Les études d'association

A. Le principe

Les études d'association sont effectuées pour déterminer si une variante génétique est associée à la maladie ou à un trait phénotypique de la maladie. Ainsi on cherche à mettre en évidence une différence de fréquence allélique pour un marqueur génétique, entre une population d'individus malades et une population d'individus sains (témoins). Un allèle est dit associé à la maladie s'il est en excès ou en déficit plus fréquemment parmi les malades non apparentés par rapport aux témoins. Dans une revue de 1996, Risch et Merikangas ont démontré que les études d'association offraient une plus grande puissance que les études de liaison pour la détection de loci à effet mineur. L'inconvénient de ces études est qu'elles requièrent un grand nombre d'échantillons afin d'éviter les faux positifs. La stratégie la plus utilisée dans les études d'association est la stratégie cas/témoins. Elle nécessite d'avoir des populations de malades et de témoins d'origine ethnique commune afin d'éliminer le biais dû à l'hétérogénéité des populations. Un allèle ou un marqueur associé peut être directement impliqué dans la maladie, on dit alors qu'il est causal; Il peut également être en déséquilibre de liaison avec le variant causal. Une alternative au biais de stratification des populations est l'utilisation du test de déséquilibre de transmission (TDT). L'analyse est réalisée sur des trios (le père, la mère et l'enfant atteint) et seuls les trios dont les parents sont hétérozygotes pour l'allèle associé sont considérés. On compare alors la fréquence à laquelle l'allèle associé est transmis à l'enfant atteint par rapport à une transmission au hasard.

Le but des études d'association, comme dans le cas des études de liaison, est de mettre en évidence des variants associés directement (causals) ou indirectement (déséquilibre de liaison). Plusieurs approches peuvent être envisagées dans cette perspective : la première vise à cibler les régions pointées par les études de liaison. La deuxième consiste à cibler des gènes potentiellement candidats parce qu'ils interviennent dans une voie de signalisation biologique impliquée dans la maladie. Enfin la dernière s'est largement développée depuis 2007 pour l'étude des maladies psychiatriques avec la technique CGH-array qui utilise l'hybridation génomique comparative sur puce. Cette technique repose sur l'étude d'association sur génome entier appelée GWA (genome-wide association). Une comparaison de la répartition des

polymorphismes situés sur l'ensemble du génome est réalisée entre des malades et des contrôles.

B. Les résultats des études d'association dans l'autisme

1. L'approche par criblage du génome entier (GWA)

Les études d'association réalisées sur génome entier souvent basées sur l'étude de marqueurs SNP, ne permettent pas de détecter des facteurs de risque pour des allèles rares ou des variant rares qui, cependant, pourraient être pertinent dans l'étiologie de l'autisme (Mc Carthy *et al.*, 2008). Une des premières études GWA réalisée sur une population des îles Féroé (12 patients autistes et 44 contrôles) où 601 marqueurs microsatellites ont été génotypés a permis d'identifier 6 régions chromosomiques associées à l'autisme : 2q, 3p, 6q, 15q, 16p et 18q (Lauritsen *et al.*, 2006). Les régions 7q et 17q ont tendance à être associées mais sans significativité. Une méta-analyse réalisée par Yang et Gill en 2007 (Figure 11), a repris les résultats de l'étude d'association GWA de Lauritsen, en y associant les régions d'intérêt déterminées par les études de liaison.

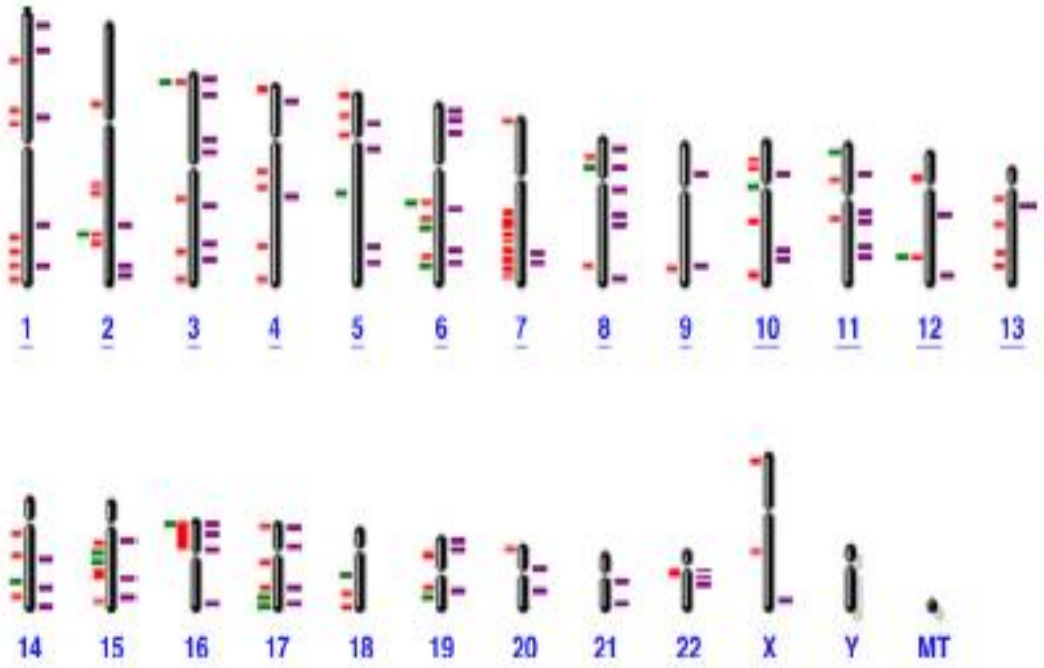


Figure 11 : Diagramme de distribution des loci ou gènes pouvant être corrélés à l'autisme (d'après Yang et Gill, 2007). Les positions des loci ou gènes sont représentées par des barres de différentes couleurs : liaisons significatives ou suggestives en rouge, marqueurs ayant une association positive ($p \leq 0{,}01$) en verts, localisation des gènes dont l'expression est altérée comparée aux contrôles (Fold change $\geq 1{,}0$) en violet.

Une mise à jour des régions d'intérêt associées à l'autisme a été réalisée dans une revue de Freitag (2010). L'auteur répertorie les loci associés à l'autisme répliqués dans plusieurs études (Figure 9, barres jaunes). Par rapport à l'analyse de 2007, peu de régions sont mises en cause. Ainsi trois études indépendantes réalisées chez des populations de patients autistes (une partie des patients des trois études était issue de l'AGRE : Autism Genetic Resource Exchange) ont associé les régions 5p14 et 5p15 avec une élévation de risque d'un syndrome autistique (Wang K.*et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2009, Weiss *et al.*, 2009). La région 5p14 correspond à une région hautement conservée au cours de l'évolution suggérant un potentiel rôle de régulation. A proximité des SNP associés sont localisés les gènes *CDH9* et *CDH10* codant des cadhérines impliquées dans les jonctions cellulaires calcium dépendantes au niveau du système nerveux central. Les SNP associés de la région 5p15 sont proches du gène *TAS2RI* codant un récepteur du goût et du gène *SEMA5A* (sémaphorine 5A) impliqué dans la guidance axonale. A ce jour la tendance est que chaque nouvelle étude d'association met en évidence de nouveaux loci sans pour autant confirmer les régions déjà associées, excepté pour la région 7q où est localisé le gène *CNTNAP2*, codant une protéine appartenant à la famille des neurexines. Ces dernières ont une fonction de molécules d'adhésion cellulaire au niveau du système nerveux central; de plus, le gène *CNTNAP2* a, lui aussi, été associé à l'autisme (Strauss *et al.*., 2006).

2. L'approche par l'étude de gènes candidats

L'approche gène candidat se définit par la recherche de l'implication d'un gène précis dans une pathologie. Pour cela, des hypothèses par rapport au rôle de certains gènes dans l'étiologie de la maladie sont formulées, notamment si ces gènes sont situés dans une région de liaison à la pathologie où s'ils interviennent dans une voie de signalisation associée à la maladie. Le choix des gènes se fait également par rapport à leur niveau d'expression dans certaines régions cérébrales d'intérêt.

Durant les dix dernières années, une centaine de gènes ont ainsi été associés à l'autisme, cependant pour la majorité d'entre eux, aucune association claire ni contribution évidente n'a pu être démontrée. Bien souvent les résultats apparaissent contradictoires et lorsqu'une association significative est rapportée, elle n'est, la plupart du temps, pas reproduite dans une autre population.

Malgré tout, une association positive a été rapportée pour 16 gènes dans plusieurs études avec, certes, des résultats contradictoires pour certains d'entre eux, notamment pour le

gène du transporteur de la sérotonine *SLC6A4*. Ces gènes peuvent être classés en différentes catégories suivant les processus biologiques dans lesquels ils interviennent (Tableau 8).

Tableau 8 : Liste des gènes associés à l'autisme et leur fonction.

Gènes	Fonction	Observations dans l'autisme	Références
Structure de la chromatine et la régulation de gène			
EN2	Facteur de transcription homéobox	Différents allèles de deux SNP ont été associé dans plusieurs études	Petit *et al*, 1995, Brune *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Yang *et al*, 2008
HOXA1	Facteur de transcription	Une seule étude d'association positive pour un variant SNP. Une deuxième étude a rapporté des résultats contradictoires, cette étude a associé un génotype particulier avec une augmentation du périmètre cranien chez un sous groupe d' autistes.	Freitag, 2007
WNT2	Facteur de transcription	Sur trois études réalisées, une seule a montré une association avec un variant SNP localisé en 3'UTR.	Freitag, 2007
PTEN	supresseur de tumeur, prolifération cellulaire, maintient structure de la chromatine	Mutations hétérozygotes observées chez des individus autistes, macrocéphales ou avec retard mental	Butler *et al*, 2005; Herman *et al*, 2007; Varga *et al*, 2009
Protéine de structure de la synapse			
SHANK3	Induction des dendrites	Un étude rapporte : des mutations avec décalage du cadre de lecture chez deux frère d'une même famille, dans une deuxième famille une délétion chez 1 patient, dans une troisième famille un enfant non autiste avec une délétion du gène et un enfant autiste avec une copie supplémentaire. Une deuxième étude a détecté une mutation et deux délétion du gène. Les mutations de ce gène restent rares.	Durand *et al*, 2007; Gauthier *et al*, 2009; Moessner *et al*, 2007
Récepteurs et transporteurs			
Glur6 (GRIK2)	Sous unité du récepteur kainate au glutamate	3 études sur des populations indépendantes avec une association positive (plusieurs SNP ou alllèles)	Jamain *et al*, 2002; Shuang *et al*, 2004
GABA-R	Sous unité du récepteur GABAergique	Association d'un marqueur microsatellite de l'intron 3 du gène GABRB3 dans 3 études, mais 4 autres études n'ont pas observées d'association. 3 autres études ont rapportées une association avec différents haplotypes, SNP ou microsatellites situés proches des gènes GABRB3 et GABRG3 (15q 11-13). l'association la plus puissante a été rapportée pour un SNP localisé au niveau du gène GABRA4 (4p). Plusieurs anomalies chromosomiques observées dans la région 15q11-13.	Vincent *et al*, 2006
SLC25A12	Transporteur mithochondrial glutamate/aspartate calcium dépendant	Etudes Cas-contrôles et TDT : 2 études d'association positive (élévation du facteur de risque pour un haplotype GG), 2 études négatives	Silverman *et al*, 2008
MET	Récepteur tyrosine kinase	Variant fonctionnel dans le promoteur, plusieurs SNP et allèles, mutations rares. Diminution de la protéine dans le cerveau post-mortem d'autistes.	Campbell *et al*, 2009; Campbell *et al*, 2006; Sousa *et al*, 2009
SLC6A4	Transporteur de la sérotonine	Beaucoup d'études contradictoires. Plusieurs associations ont été rapportées pour différents polymorphismes, dont un polymorphisme fonctionnel situé dans le promoteur (5-HTTLPR) et un polymorphisme VNTR localisé dans l'intron 2. Une augmentation des comportements obsessionnels compulsifs est rapportée associée à un génotype du VNTR et pour 2 polymorphismes SNP.	Devlin *et al*, 2005; Freitag, 2007
OXTR	Récepteur à l'ocytocine	3 études sur des populations indépendantes avec une association positive (SNP et haplotype)	Jacob *et al*, 2007; Lerer *et al*, 2007; Wu *et al*, 2005
Molécules d'adhésion cellulaire			
NLGN4	Synaptogénèse	Mutations de ces deux gènes dans deux paires de frères autistes dans une étude. Mutations avec délétion de 2pb dans le gène *NLGN4* dans une famille comprenant des individus autistes et retardés mentaux. Une mutation dans le promoteur NLGN4 avec effet fonctionnel a été rapportée chez un patient autiste. Deux autres études ont rapporté des mutations faux sens ou exonique dans le gène *NLGN4* chez des autistes. Une étude relate une mutation ponctuelle du gène *NLGN3*. Les mutations de ces gènes sont rares, plusieurs études rapportent des données non significatives.	Jamain *et al*, 2003; Laumonnier *et al*, 2004; Daoud *et al*, 2009
NLGN3	Synaptogénèse		
CNTNAP2	Migration neuronale	Expression préférentielle de la protéine au niveau des lobes frontal et temporal antérieurs, Mutation reponsable d'un décalage du cadre de lecture (exon 22) observée dans une population d'autistes de la communauté Amish. Transmission d'un allèle SNP particulier de l'intron situé entre les exons 2 et 3. Plusieurs variants rares ont été mis en évidence chez des autistes. Des variants ont été associés à un index de retard de langage.	Arking *et al*, 2008; Bakkaloglu *et al*, 2008; Alarcon *et al*, 2008
Protéines secrétée			
RELN	Migration neuronale, synaptogénèse	3 études ont associé une répétition de trinucléotides en 5'UTR avec l'autisme, 5 autres études n'ont pas montré d'association	Persico *et al*, 2001; Serajee *et al*, 2006; Skaar *et al*, 2005
LAMB1	Migration cellulaire, croissance des neurites	Association avec des variants fonctionnels rares dans 2 études (mutation nonsens dans exon 30, 2 SNP dans intron 25)	Bonora *et al*, 2005; Hutcheson *et al*, 2004

Les études d'association par criblage du génome entier ainsi que les études de gènes candidats ne permettent pas d'associer un unique gène à l'autisme; cependant il est intéressant

de noter que ces études ont fait ressortir qu'une majorité de gènes candidats serait impliqués dans le développement cérébral. L'ensemble des données actuelles converge préférentiellement vers une association entre l'autisme et des réseaux de gènes, plutôt qu'une association avec un gène en particulier. L'hypothèse d'une étiologie polygénique de l'autisme se trouve donc renforcée.

C. Les résultats des études d'association dans la déficience mentale

Les études de liaison dans des régions restreintes du génome ainsi que les anomalies chromosomiques constituent les principales méthodes d'investigation pour la mise en évidence de gènes liés à la déficience mentale. Néanmoins des auteurs ont étudié l'association entre des mutations ou des polymorphismes de certains gènes avec le retard mental syndromique et non syndromique. Une des causes du retard mental syndromique est bien souvent métabolique, ainsi la littérature rapporte plusieurs études où le métabolisme du folate a été exploré. Des associations positives ont été observées entre des polymorphismes de gènes codant des enzymes intervenant dans le métabolisme des folates et le retard mental syndromique (Acacio *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2008, Biselli *et al.*, 2009). En revanche aucune association n'a été observée entre les gènes de cette voie métabolique et le retard mental non syndromique (Dutta *et al.* 2008, Saccucci *et al.*, 2008).

Un déficit fœtal en iode peut être responsable de certains cas de déficience mentale, c'est pourquoi les gènes d'enzymes ou de récepteurs intervenant dans le métabolisme thyroïdien ont été étudiés. Là encore la littérature rapporte des associations positives et négatives entre le retard mental et les gènes codant les enzymes ou les hormones de cette voie métabolique (Guo *et al.*, 2004, 2005, Li *et al.*, 2009).

Dans le cadre des études d'association liées au retard mental syndromique, il est difficile de savoir si l'association des gènes candidats est liée au retard mental ou à tout autre signe clinique ou biologique de la pathologie et d'en tirer des conclusions. En ce qui concerne le retard mental non syndromique les variants associés sont considérés comme des facteurs de susceptibilité. Plusieurs études rapportent une association positive entre le retard mental non syndromique et des polymorphismes : variants du gène *MAOA* (May *et al.*, 2009) ; SNP du gène *CBS* (Dutta *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2005) ; SNP du gène *NLGN4* (Qi *et al.*, 2009), le génotype Pro72/Pro72 de *p53* (Saccucci *et al.*, 2007) ; mutation A140V dans le gène *MECP2*

récurrente chez des patients d'une même famille (Winnepenninckx *et al.*, 2002) ; deux haplotypes du gène *COMT* (Zhang *et al.*, 2007).

IV. Les études des variations structurales du génome

A. Les mécanismes responsables de variations structurales génomiques

Les substitutions nucléotidiques, les insertions/délétions de quelques nucléotides et les remaniements géniques de grande taille constituent les 3 grandes classes de mutations responsables de maladies génétiques (Figure 12).

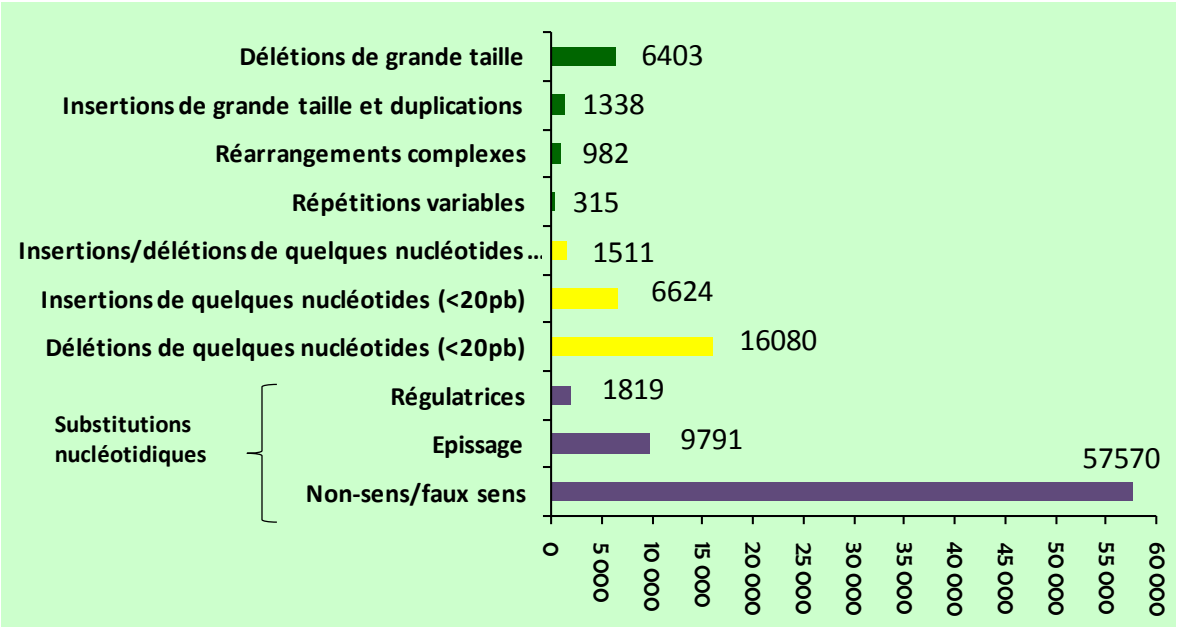


Figure 12 : Répartition des différents types de mutations identifiées dans les gènes humains à l'origine des maladies génétiques. Données extraites de la base de données HGMD mise à jour du 27 juillet 2010 (http://www.hgmd.org).

Les réarrangements chromosomiques complexes ont été associés à des pathologies présentant un caractère complexe tels que la susceptibilité à l'infection HIV, la schizophrénie,

l'autisme et la déficience mentale (Zhang *et al.*, 2009). Ces anomalies, présentées dans le Tableau 9, peuvent concerner les régions subtélomériques dans 8 à 10% des cas mais aussi des régions chromosomiques interstitielles réparties sur l'ensemble du génome. Ils sont consécutifs à une cassure de l'ADN double brin dont la réparation met en jeu des mécanismes de recombinaison chromosomique de différentes origines (Tableau 9) :

-les recombinaisons homologues non alléliques (NAHR) (Lupski J.R., 2004, Shaw C.J. Lupski J.R., 2004)

-les jonctions d'extrémités non homologues (NHEJ) (Lieber M.R., 2008)

-le mécanisme FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) (Lee *et al.*, 2007).

Tableau 9 : Variations structurales génomiques issues de NAHR et NHEJ

Variation du nombre de copie : CNV	Segment d'ADN présent dans le génome avec un nombre de copie variable par rapport au génome de référence. La taille des fragments varie de 1kb à plus de 50kb. Les CNV peuvent être des délétions, des duplications ou des insertions. Les CNV peuvent être *de novo* ou hérités des parents.
Polymorphismes du nombre de copie	Présents à plus de 1% dans la population, SNP et CNV.
Duplication segmentaire et LCR (low-copy repeat).	Segment d'ADN de 10 à 500kb présent en plus d'une copie par génome haploïde, avec un degré d'identité >95%. Ces séquences représentent 5% du génome.
Inversion	Segment d'ADN qui a sa séquence inversée par rapport à l'ensemble du chromosome. Les inversions péricentriques incluent le centromère, mais pas les inversions paracentriques.
Translocation	Changement de position d'un segment chromosomique sans perte d'ADN si la translocation est équilibrée, avec perte si elle n'est pas équilibrée. Les translocations peuvent être intra ou inter chromosomiques.
Les variations structurales incluent les CNV, les variations SNP, les inversions, les translocations, les duplications segmentaires et les LCR. Elles peuvent être classées en deux catégories : les réarrangements récurrents et les réarrangements non récurrents.	
Réarrangements récurrents	Ils résultent d'évènements de recombinaison homologue non allélique (NAHR, non allelic homologous recombination) entre de grandes séquences répétées d'ADN (>10kb) telles que les LCR ou les duplications segmentaires.
Réarrangements non récurrents	Conséquence de recombinaisons non homologues ou illégitimes entre séquences qui ne présentent pas ou très peu d'homologie de séquence incluant les NHEJ (jonctions d'extrémités non homologues), la rétrotransposition, le FoSTeS et les NAHR entre des séquences répétées de types L1 et *alu*.

1. Les recombinaisons homologues non alléliques (NAHR)

Les réarrangements NAHR sont dus à des séquences répétées appelées LCR (Low Copy Repeat) ou à des duplications segmentaires ou encore à des duplicons (Weiss *et al.* 1991); ces éléments représentent 5% du génome humain et constituent la base moléculaire des remaniements intrachromosomiques récurrents. Certaines régions du génome plus particulièrement les régions péricentromériques et subtélomériques des chromosomes sont enrichies en duplications segmentaires. Ces segments ont l'aspect d'un ADN normal et, à première vue, ne sont pas facilement identifiables en tant que séquences répétées. La formation de duplications segmentaires se réalise en deux étapes : dans un premier temps des segments génomiques dupliqués à partir de différents chromosomes s'accumulent au niveau d'un site accepteur où ils forment une mosaïque de séquences dupliquées. Plus tard au cours de l'évolution des primates, ces blocs complexes se sont eux-mêmes dupliqués et transposés au niveau d'autres régions où ils sont retrouvés sous une forme plus ou moins remaniée (Figure 13).

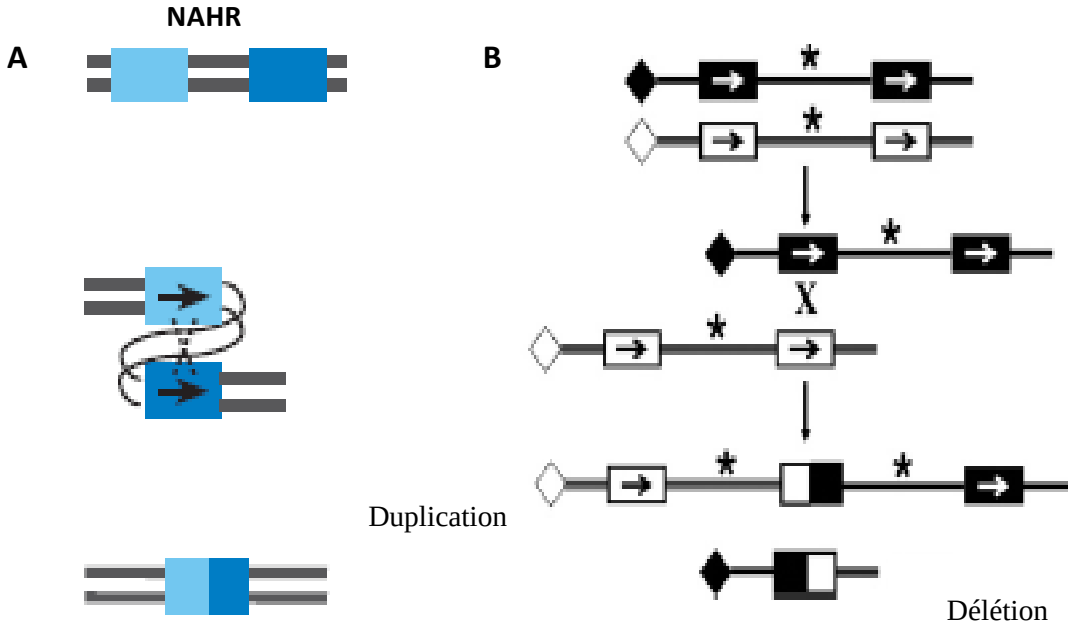


Figure 13 : **A**, Mécanisme de recombinaison homologue non allélique, NAHR entre des séquences répétées de type LCR, SD, *Alu* ou élément L1. **B**, échange entre des séquences homologues en orientation directe, entrainant une délétion ou une duplication du segment intermédiaire (d'après Zhang *et al*, 2009 et Schluth-Bolard *et al*, 2008).

Les NAHR sont provoquées par l'alignement puis le crossing-over entre deux séquences d'ADN répétées, non alléliques, ayant une très forte homologie (Figure 13**A**). La recombinaison de séquences répétées spécifiques d'une région ou d'un chromosome et dans le même sens d'orientation génère des duplications ou des délétions **(**Figure 13**B**), alors que la recombinaison de séquences répétées inversées engendre des inversions du segment génomique compris entre les deux duplicons. Les NAHR qui surviennent entre des segments répétés de deux chromosomes différents peuvent induire des translocations (Lupski J.R., 1998, Stankiewicz *et al.*, 2002). Les recombinaisons anormales peuvent expliquer la récurrence de certaines pathologies. Le phénotype clinique de ces désordres génomiques résulte vraisemblablement d'une expression anormale des gènes localisés dans le fragment génomique remanié. En fonction de la taille du fragment génomique impliqué, ces désordres génomiques peuvent se manifester sous la forme de syndromes de gènes contigus ou de maladie mendélienne (Stankiewicz *et al.*, 2002). La plupart de ces désordres génomiques résultent d'un remaniement chromosomique dont la taille est inférieure à 5Mb.

La forte homologie de séquence des LCR et des duplications segmentaires en font de bons substrats moléculaires de recombinaison homologue non-allélique (NAHR). Différents blocs de LCR sont quelquefois localisés de façon adjacente les uns par rapport aux autres avec des sous unités en tandem alors que d'autres, sont situés dans une orientation antisens conduisant à des constructions LCR complexes (Carvalho *et al.*, 2008). Ces structures LCR complexes peuvent engendrer l'apparition de variation de nombre de copies (CNV) durant la méiose et la mitose, ces variants structuraux sont des facteurs de susceptibilité aux réarrangements chromosomiques (Barbouti *et al.*, 2004, Carvalho *et al.*, 2008, Cusco *et al.*, 2008). D'autres segments répétés tels que les transposons L1, les séquences *Alu* et certains pseudogènes peuvent être des substrats de NAHR, s'ils proviennent de familles similaires ou s'ils possèdent des identités de séquences suffisantes pour engendrer des recombinaisons homologues (Zhang *et al.*, 2009). Un point chaud de recombinaison de 28pb a été observé dans les séquences *Alu* (Sen *et al.*, 2006), alors qu'aucun point chaud n'est rapporté dans les séquences L1 (han *et al.*, 2008). Les points chauds de NAHR recoupent de façon proche ceux observés pour les recombinaisons homologues alléliques (AHR) (Zhang *et al.*, 2009).

Les NAHR peuvent survenir pendant la méiose, durant laquelle il se produit un crossing-over inégal qui produit des réarrangements chromosomiques constitutionnels tels que des polymorphismes bénins et sporadiques s'ils sont *de novo* ou bien des maladies génomiques héréditaires (Lupski J.R., 2007, Lupski *et al.*, 2005, Turner *et al.*, 2008). Les NAHR agissent également au niveau de la mitose, induisant une population mosaïque de

cellules somatiques portant des CNV ou des variations structurales (Lam *et al.*, 2006, 2007, Flores *et al.*, 2007).

2. Les jonctions d'extrémités non homologues (NHEJ)

Bien que moins fidèle que la recombinaison homologue, le NHEJ, est le mode de réparation des cassures double brin d'ADN prédominant chez les mammifères car il est rapide et peut intervenir quel que soit l'état de réplication de l'ADN. Ce mécanisme de réparation induit des erreurs entrainant des anomalies du nombre de copies ou des réarrangements non récurrents liés à des maladies comme par exemple dans la myopathie de Duchenne : le gène de la dystrophine est le siège de délétions dont les points de cassure non récurrents dispersés dans l'intron 49 sont situés dans 1/3 des cas dans des éléments de type *Alu* ou LTR (Long Tandem Repeat) (Nobile *et al.*, 2002).

Les recombinaisons liées au mécanisme NHEJ sont dues à des séquences répétées plus petites comme les SINEs ou LINEs (Shaw C.J. Lupski J.R., 2004).

Les éléments SINEs sont des éléments nucléaires courts dispersés (Short Interspersed Nuclear Elements), qui mesurent moins de 500pb et qui peuvent être présents à plus de 500 000 exemplaires dans le génome humain. Le SINE humain le mieux caractérisé est un ensemble de séquences similaires appelées séquences *Alu* (leur nom est du à la présence d'un site de clivage pour l'endonucléase *AluI*). Les séquences appartenant à cette famille, ont une longueur de 200 à 300pb et sont dispersées de façon relativement uniforme dans le génome. Le schéma commun des séquences *Alu* est représenté Figure 14.

La répétition *Alu* est la séquence la plus abondante du génome humain, avec un nombre de copie supérieur à 1 million. Les séquences Alu constituent environ 11% du génome humain et sont dispersées tous les 3 ou 4kb environ. La moyenne d'identité entre ces séquences se situe entre 70 et 98%. On considère que les séquences *Alu* dérivent d'un rétrotransposon provenant d'un ARN abondant dans le cytoplasme. Leur insertion ancestrale, chez les primates remonte à environ 65 MA. Elles ont une composition en base GC relativement élevée.

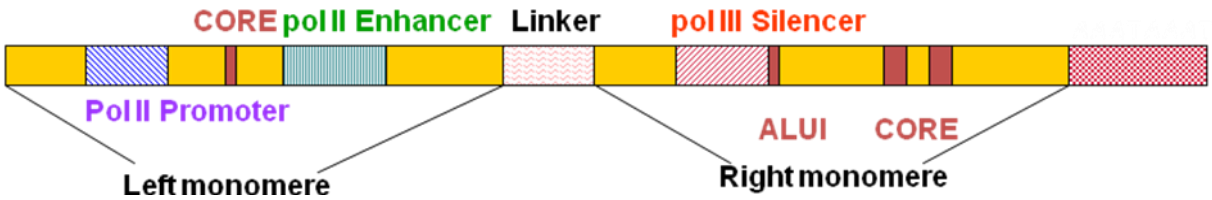


Figure 14 : Schéma d'une séquence *Alu*. Duplication en tandem d'une séquence de 130bp suivie d'une séquence de 31bp en aval du dimère et riche en A. Ces séquences de 130bp présentent une homologie avec le 7SLARN, un petit ARN composant de la particule de reconnaissance du peptide signal. Cet ARN est transcrit activement par la RNApolIII qui transcrit aussi les tARN, les petits ARN nucléaires et les ARN5S. Les séquences Alu sont flanquées de répétitions directes de longueur variable (5 à 35bp).

Dans les cellules germinales les séquences Alu ont été montrées comme responsables d'un grand nombre de maladies héréditaires comme certains cancers (Kolomietz *et al.*, 2002). Dans les cellules somatiques, elles sont également responsables de l'apparition de certaines maladies, comme la leucémie Myéloïde Aigue, dans laquelle elle génère une duplication partielle du gène *MLL* (Strout *et al.*, 1998).

Les éléments LINEs (Long Interspersed Elements) représentent une autre catégorie de séquences d'ADN répétées transposables. Chez l'homme un exemple de ce type d'éléments est la famille L1. Les membres de cette famille ont une longueur de 6400pb et on estime à 500 000 leur nombre de copies dans le génome. Leur extrémité 5' est très variable et leur rôle dans le génome n'est pas défini.

NHEJ

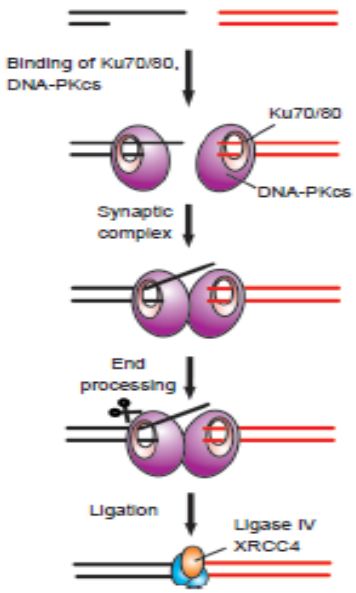


Figure 15 : Réparation de cassures double brin par NHEJ (d'après Wetering *et al*, 2008).Le complexe Ku70/80 va interagir avec les deux extrémités de la cassure double brin. Ce complexe possède une activité terminale transférase et une activité nucléase. Le complexe Ku70/80 va recruter la sous unité catalytique DNA-PKs qui va préparer les extrémités pour la ligation. L'hétérodimère XRCC4/ligase IV induit la ligation des extrémités.

Les NHEJ induisent une réparation par jonction des extrémités non-homologues (Figure 15), c'est une liaison d'extrémité à extrémité de l'ADN, ce processus est utilisé majoritairement chez les mammifères. Les NHEJ ne nécessitent pas de substrat avec une forte homologie de séquence, ils peuvent laisser ou enlever des nucléotides au niveau des points de jonction (Pollack *et al.*, 1999). Les pertes de séquences et/ou les mutations introduites sont courantes avec les NHEJ, comparativement au NAHR. Bien souvent ceci n'engendre aucune conséquence délétère, car les mammifères ont deux copies de chaque gène. Les mécanismes moléculaires de la recombinaison NHEJ sont encore mal connus, cependant un certain nombre de motifs pourraient constituer des points chauds de recombinaison comme des séquences alternées de purines-pyrimidines, des régions MAR (matrix-associated regions) riches en nucléotides A/T, sites de clivage des topo-isomérases ou, encore, des séquences palindromiques (Chuzhanova *et al.*, 2003).

3. Le mécanisme FoSTeS

En 2007, un nouveau mécanisme de réarrangement a été associé à l'apparition des délétions et duplications non récurrents du gène *PLP1*, entrainant le syndrome de Pelizaeus-Merzbacher. Ce mécanisme, le FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) (Figure 16), est lié à la réplication de l'ADN et entraine la formation de réarrangements non récurrents complexes comme le montre la Figure 16 (Lee *et al.*, 2007). Son principe est le suivant : lorsque la fourche de réplication progresse, l'extrémité 3' du brin d'ADN en formation peut changer de matrice pour un autre ADN simple brin situé sur une fourche de réplication voisine.

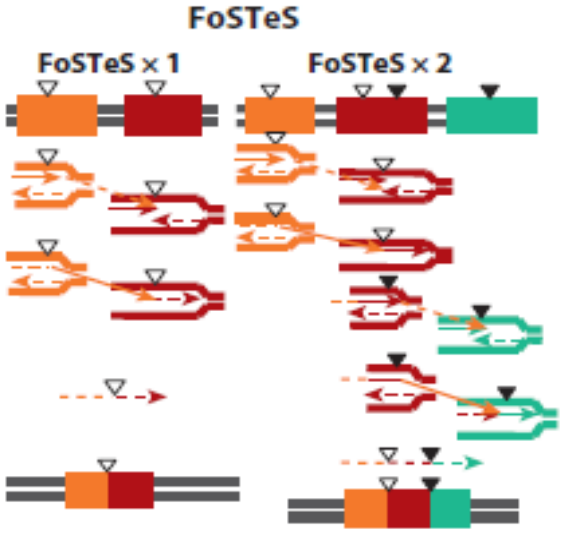


Figure 16 : Mécanisme FoSTeS. FoSTeS simple (X1) responsble de réarrangements simple, FoSTeS multiple (X2 ou plus) responsable de réarrangement complexe (d'après Zhang et al, 2009).

Ce mécanisme nécessite seulement une micro-homologie de séquence (Hastings *et al.*, 2009). Il serait également impliqué dans l'apparition des réarrangements génomiques non récurrrents des syndromes de Potocki-Lupski (PTLS) et de Charcot-Marie-Tooth de type 1A (CMT1A) (Redon *et al.*, 2006).

B. Les polymorphismes du nombre de copies (CNV)

1. Les caractéristiques des CNV

Cinquante ans après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN, la séquence complète du génome humain était publiée dans Nature (2001). Consécutivement est née la notion que les individus partagent 99,9% d'identité génomique et que par voie de conséquence la variabilité génétique entre individus est représentée par les 0,1% restant. Les 17 millions de SNP (Build 130, dbSNP NCBI) répartis environ toutes les 300pb ont longtemps été considérés comme la plus importante source de diversité génétique chez l'homme. Cependant avec le développement des nouvelles méthodes d'exploration du génome, comme l'hybridation génomique comparative sur puce (CGH-array), L'amplification multiplexe de sondes nucléiques dépendant des ligatures (MLPA) ou encore la PCR quantitative en temps réel (QPCR), de nouveaux polymorphismes ont été identifiés; parmi eux, les variations de nombre de copie (CNV) de segments d'ADN contribueraient pour 0,12 à 7,3% de la variabilité interindividuelle (Redon *et al.*, 2006). La majorité des CNV mesurent

entre 1 et 10 kb mais certains peuvent être supérieurs à 1Mb. La taille des CNV est généralement comprise entre 1kb et 1Mb.

Les premières études réalisées en 2004 par Sebat *et al.*. et Iafrate *et al..*, ont analysé respectivement 20 et 39 individus normaux chez qui ils ont identifié plus de 200 CNV. Une étude des CNV, à plus grande échelle, a été réalisée en 2006 par Redon *et al..*, sur une population de 270 individus issus de la collection Hapmap (populations d'Europe, d'Afrique et d'Asie). Les auteurs ont ainsi identifié 1447 régions de CNV représentant 12% du génome. Ces données ont largement contribué au développement d'une base de données (Database of Genomic Variants, DGV ; http://projects.tcag.ca/variation/) répertoriant les variants génomiques. En 2010, cette base a référencé plus de 57000 CNV chez l'homme (Tableau 10).

Tableau 10 : Polymorphismes répertoriés dans la DGV

Polymorphismes	**Nombre**
CNV (délétions, insertions, réarrangements complexes) avec une taille >100kb	57829
Insertions/Délétions (100pb à 1kb)	30748
Inversions	850
Nombre total de loci de CNV	14478

D'après ces dernières données, les CNV représenteraient alors 30% du génome. Cependant, de nombreuses puces utilisant des sondes BACs ont tendance à surestimer la taille des régions génomiques remaniées; c'est pourquoi l'équipe de McCaroll a réévalué les CNV des 270 individus étudiés par Redon, en utilisant une puce hybride CNV-SNP plus résolutive (Affimétrix 6.0). Ces auteurs ont identifié des CNV dans 82% des régions CNV déjà décrites; de plus, ces CNV étaient 5 à 15 fois plus petits. Ainsi la proportion de CNV décrits par Redon ne représenterait en fait que 5% du génome. Il est actuellement admis que plus de 240Mb du génome constituent des CNV ce qui représente plus de 12% de l'euchromatine et représente 6% de chaque chromosome (Choy *et al.*, 2010).

Le taux de mutation lié aux SNPs est estimé entre 1,8 et $2,5x10^{-8}$ par paire de bases et par génération (Zhang *et al.*, 2009). Le taux de mutation, locus spécifique, dû à certains CNV

de novo avoisinerait 1,7x10^{-6} à 1x10^{-4} par locus et par génération, soit 100 à 10000 fois celui lié aux SNPs. Contrairement au taux de mutation relativement constant des SNPs, le taux de mutation des CNV varie en fonction des loci. Ceci pourrait s'expliquer par les différents mécanismes de formation (NAHR, NEHJ ou FoSTeS) de CNV, mais aussi par l'architecture régionale ou locale (proximité de LCR favorisant les recombinaisons) du génome qui favoriserait une instabilité génomique. Ces analyses s'ajoutent aux observations tendant à montrer que les CNV seraient préférentiellement en dehors des gènes et des régions génomiques ultra conservées (Derti *et al.*, 2006, Redon *et al.*, 2006).

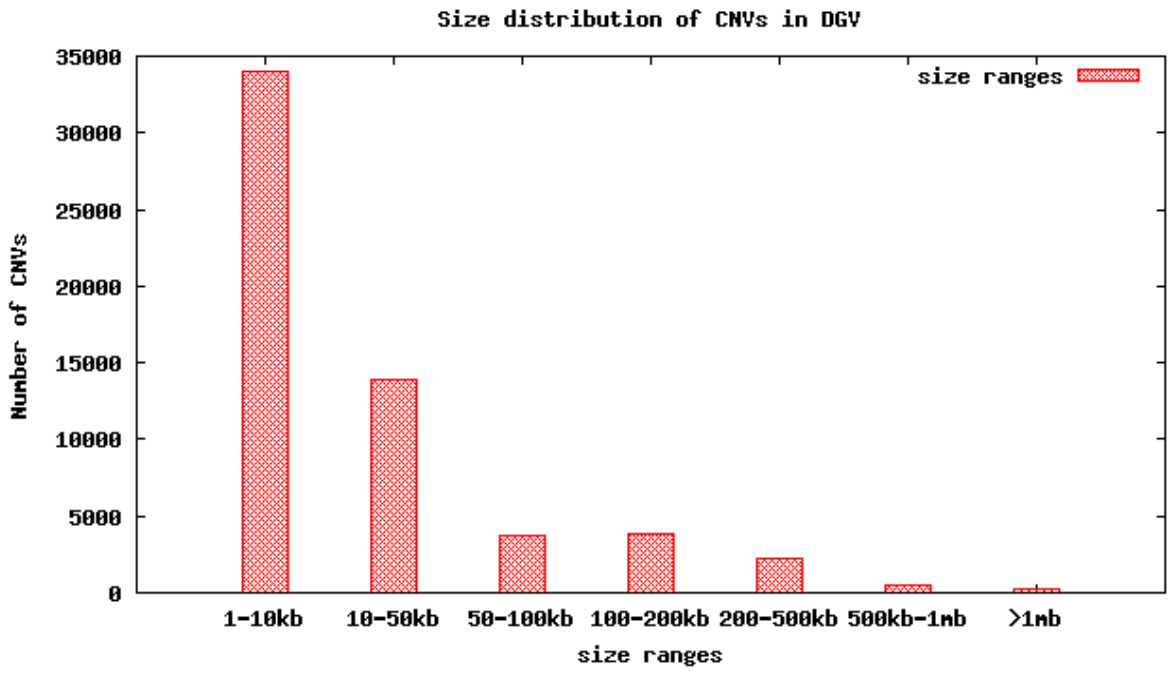


Figure 17 : Distribution des CNV en fonction de leur taille d'après la DGV.

Lorsque la fréquence des CNV est supérieure à 1% dans la population générale on parle d'un polymorphisme du nombre de copies (CNP). Il convient cependant d'être prudent par rapport aux variations de fréquence de certains CNPs en fonction de l'origine ethnique de la population testée.

2. Techniques d'analyses des réarrangements génomiques

- Les techniques cytogénétiques :

Le caryotype standard est réalisé sur les chromosomes en métaphase. C'est la technique d'exploration de première intention en présence de syndrome malformatif ou de

retard mental. Il ne permet pas cependant de détecter les réarrangements inférieurs à 5 voire 10Mb.

L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) est réalisée sur les chromosomes en métaphase ou interphase. Des sondes fluorescentes vont s'hybrider spécifiquement sur des loci donnés. Cette technique permet de détecter des syndromes microdélétionnels avec une résolution de 100 à 300kb. Elle est également utilisée pour valider les données de CGH-array. La FISH permet la détection des translocations équilibrées, ce qui n'est pas le cas de la CGH-array.

- Les techniques moléculaires

Actuellement la plus utilisée est la CGH-array. Elle permet de travailler sur le génome complet. Elle consiste à déposer sur des lames de verre des sondes qui peuvent être des clones génomiques (BAC), des cDNA ou encore des oligonucléotides. L'ADN des patients fragmenté par digestion enzymatique puis marqué par un fluorochrome est mélangé avec de l'ADN contrôle lui aussi fragmenté et marqué par un autre fluorochrome. Le mélange est hybridé avec les sondes de la lame de verre. L'analyse est réalisée en mesurant l'intensité de la fluorescence émise. Le ratio de fluorescence entre les deux fluorochromes permet de savoir si les deux ADN étudiés ont le même nombre de copie pour une sonde donnée. Cette technique permet de détecter des variations de quelques kb (Figure 18).

Les techniques de PCR quantitative (QPCR) et d'amplification multiple de sondes dépendantes d'une ligation (MLPA) ont des résolutions comparables à la CGH-array, elles sont souvent utilisées pour valider les données de CGH-array. Ces techniques permettent de cribler des loci spécifiques. Le principe de ces deux techniques est détaillé dans le chapitre « matériels et méthodes ».

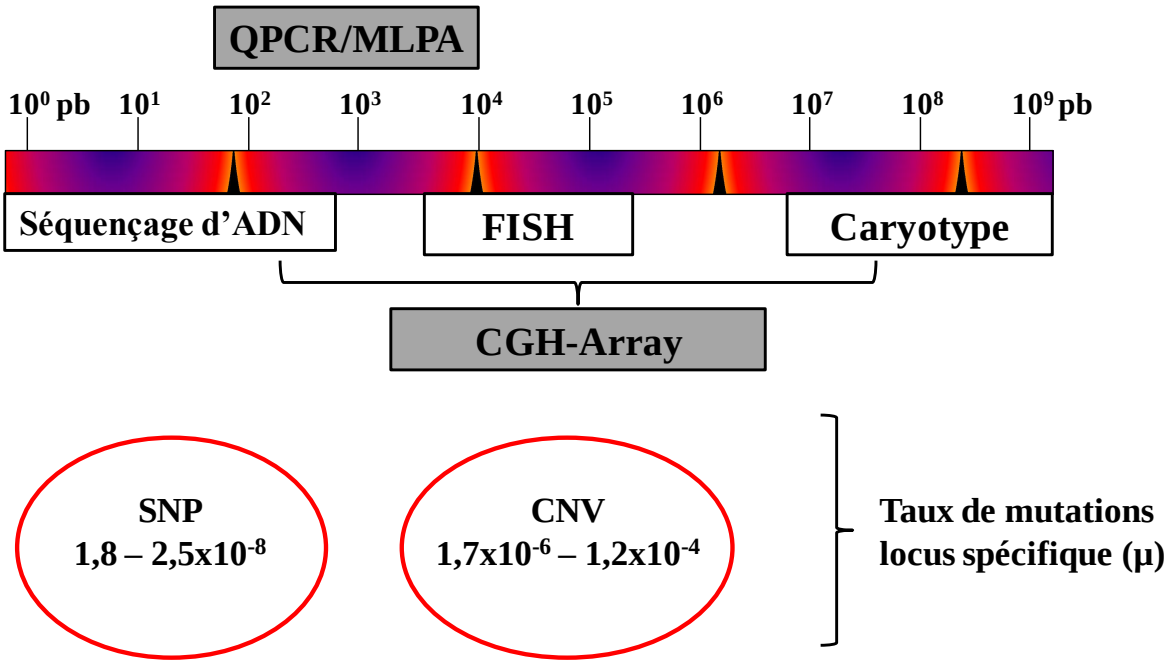


Figure 18 : Résolution des techniques d'analyse de l'ADN

3. Les CNV dans l'autisme et la déficience mentale

Certains auteurs distinguent les CNV bénins des CNV pathogéniques, ils ont proposé des critères majeurs permettant de définir le caractère pathogène ou bénin des CNV. Ces critères incluent le caractère hérité ou l'apparition *de novo* de l'anomalie, son contenu en gène, la nature de l'anomalie (délétion ou duplication), sa taille, sa localisation par rapport aux régions génomiques associées à des maladies et aux régions de CNV polymorphiques connues (Rodriguez-Revenga *et al.*, 2007). Il existe plusieurs bases de données internationales compilant les CNV pathogéniques dont DECIPHER (http://www.sanger.ac.uk/postGenomics/decipher), ECARUCA (www.ECARUCA.net) et la DGV citée précédemment. Un des moyens de rechercher le niveau de pathogénicité d'un CNV consiste tout d'abord à regarder s'il contient des gènes, de rechercher puis de mesurer l'expression de ces gènes. La présence d'un CNV peut avoir des conséquences sur l'expression d'un gène par deux mécanismes : soit elle joue directement sur le dosage génique, ou bien, elle agit indirectement en affectant les éléments transcriptionnels régulateurs de ce gène. Stranger *et al.* (2007) ont montré que 17,7% des variations d'expression des gènes étaient dus à des CNV. Depuis quelques années, les CNV ont également été identifiés comme

facteurs de susceptibilité à des maladies complexes multifactorielles dont l'autisme et la déficience mentale (Zhang *et al.*, 2009).

a) Les CNV dans l'autisme

Plusieurs études ont montré l'importance des CNV dans l'étiologie du syndrome autistique. Ces CNV peuvent être *de novo* ou hérités. Les CNV se manifestent par la présence de variants rares ou encore de syndromes chromosomiques liés à l'autisme. L'augmentation de la résolution des méthodes d'investigation utilisant les puces suggèrent que la proportion de cas d'autisme qui est attribuée aux variants rares devrait être supérieure aux 6-7% identifiés par les techniques de cytogénétique standard. La proportion de CNV *de novo* est de 1% chez les contrôles, de 2 à 3% chez les familles multiplexes d'autisme et atteint 7 à 10% chez les familles simplexes. Ces proportions sont les mêmes que celles que l'on observe dans d'autres pathologies complexes pour lesquelles des mécanismes génétiques différents apparaissent entre les cas sporadiques et les cas familiaux. Sebat *et al.*. (2007) et Marshall *et al.*. (2008) ont respectivement observé 10% et 7% de CNV de *novo* chez les patients autistes dont la famille ne compte qu'un seul enfant autiste et 2% chez les patients issus d'une famille qui compte des apparentés du premier degré atteints. Christian *et al.*. (2008) ont identifié 11,6% de CNV chez des enfants ayant un trouble du spectre autistique, 14% étaient de novo et 86% étaient hérités. Morrow *et al.*. (2008) ont trouvé des CNV submicroscopiques (<500kb), *de novo,* chez plus de 10% des patients autistes. Weiss *et al.*. (2008) et Kumar *et al.*. (2008) ont rapporté des délétions ou duplications récurrentes d'environ 660kb dans la région 16p11.2 chez environ 1% des autistes, cependant les délétions en 16p11.2 ne sont pas spécifiques de l'autisme, puisqu'elles sont également présentes chez des patients atteints de retard mental. Ajoutés à l'ensemble de ces données, des réarrangements génomiques impliquant le gène *NRXN1* (2p16) ont été observés (Kim *et al.*, 2008). Une étude portant respectivement sur 859 et 1336 patients autistes et 1409 et 1110 sujets sains a permis d'identifier, grâce à des puces SNP, plusieurs nouveaux gènes de susceptibilité codant des molécules d'adhésion neuronales. Les auteurs ont remarqué une plus grande proportion de CNV chez les patients autistes par rapport aux contrôles, dans la région des gènes *NLGN1* et *ASTN2* codant respectivement la neuroliguine 1 et l'astrotactine 2 (Glessner *et al.*, 2009). Par ailleurs, les auteurs ont également constaté que des CNV situés dans ou à proximité des gènes impliqués dans la voie de l'ubiquitine, plus particulièrement UBE3A, PARK2, RFWD2, et FBXO40, étaient présents uniquement chez des patients autistes.

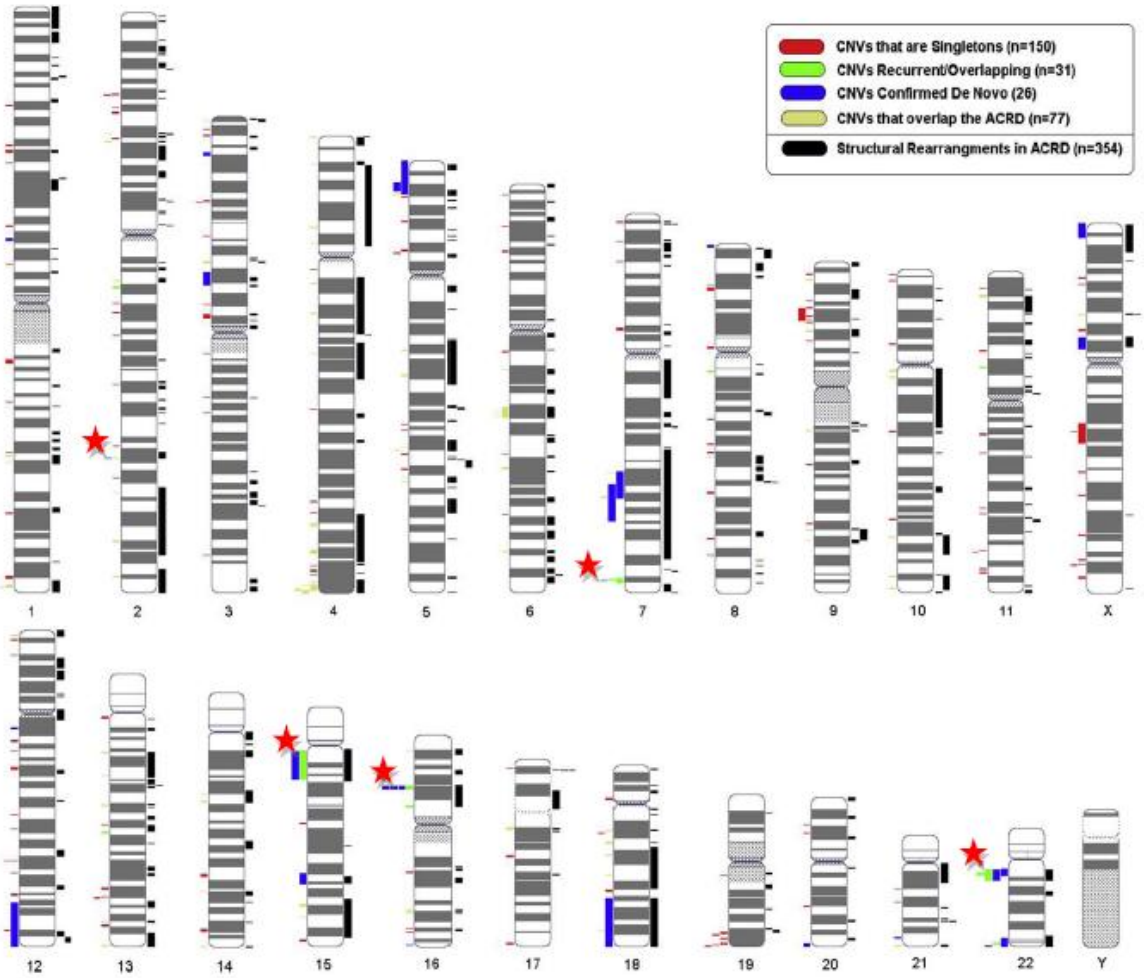


Figure 19 : Distribution des CNV dans l'autisme. Les CNV issus de la base de données ACRD, (Autism Chromosome Rearrangement Database) sont en noirs sur la droite des chromosomes. Sur la gauche des chromosomes sont référencés les CNV spécifiques de l'autisme répertoriés par l'équipe de Marshall. En bleu les CNV *de novo*, en vert les CNV récurrents, en jaune les CNV récurrents avec les CNV de la base ACRD, en rouge les CNV isolés. Avec un astérix, les CNV appartenants aux catégories *de novo* et récurrrents (total : 5) (d'après Marshall *et al*, 2008).

Une étude menée sur 943 familles touchées par l'autisme et 1488 contrôles a identifié plus de 150 loci contenant des variants rares chez plusieurs patients autistes, certains variants correspondaient à des loci déjà décrits (délétion exonique du gène *NRXN1*, duplication 15q11-13), mais deux nouveaux locus ont été identifiés en 17q22 et 14q21 incluant respectivement les gènes *BZRAP1* et *MDGA2* qui codent respectivement la protéine 1 associée au récepteur des benzodiazépines et une immunoglobuline de type C2 (Bucan *et al*., 2009).

En 2010, un travail publié par l'AGP (Autism Genome Project Consortium) et portant sur l'étude des CNV rares (fréquence <1%, taille >30kb), chez 996 individus du spectre autistique et 1287 contrôles, a montré une plus forte proportion de CNV chez les autistes (1,19 fois, p=0,012), plus particulièrement au niveau de loci déjà impliqués dans l'autisme et ou le retard mental (Pinto *et al.*, 2010). Les CNV identifiés étaient aussi bien *de novo* que hérités et dans certaines familles, les deux à la fois. Ces CNV impliquaient de nouveaux gènes de susceptibilité tels que *SHANK2, SYNGAP1, DLGAP2* ainsi que le locus *DDX53-PTCHD1* situé sur le chromosome X. Guilmatre *et al.*. (2009) ont analysé les CNV dans des populations d'autistes, de schizophrènes et de déficients mentaux. La présence de CNV s'avère plus importante dans ces populations que dans les populations contrôles, la plupart des CNV sont présents dans les 3 pathologies, soutenant l'existence de voies biologiques partagées dans les maladies neurodéveloppementales.

L'ensemble de ces études a permis de mettre en exergue des régions chromosomiques présentant des CNV de façon récurrente, et ainsi de dégager de possibles gènes de susceptibilité à l'autisme. Les principaux CNV répertoriés sont présentés ci-dessous.

- la duplication 15q11-13 impliquant des gènes codant les sous-unités du récepteur GABA ainsi que le gène *UBE3A* déjà mis en cause dans les troubles autistiques et dans les syndromes d'Angelman et de Prader-Willi. Cette duplication s'accompagne, chez les enfants atteints, de retard de développement psychomoteur et intellectuel.

- La délétion 22q13 impliquant entre autre le gène *SHANK3,* et pour lequel des mutations ont été observées chez des patients autistes.

- La délétion 16p11 mais aussi la duplication de la même région ont été observées chez des patients autistes et chez des retardés mentaux. Cette région contient environ 25 gènes, parmi eux les gènes *MAPK3, DOC2A* et *SEZ6L2* qui sont exprimés au niveau du cerveau et régulent l'activité synaptique (Kumar *et al*., 2008).

- La duplication 17p11.2. Cette région est délétée dans le syndrome de Smith Magenis dans lequel les patients présentent fréquemment des troubles autistiques. Cette région englobe le gène *RAI1* qui code un facteur de transcription.

- La duplication 7q11.23. Cette région est impliquée dans le syndrome de Williams-Beuren. Les enfants atteints présentent un retard de développement psychomoteur évoluant

vers un retard mental et des troubles autistiques. Cette région contient le gène de susceptibilité à l'autisme *AUTS2* qui code une protéine nucléaire (Kalscheuer *et al*., 2007).

- La délétion 7q31. Cette délétion est aussi associée à un retard de langage. Les gènes *FOXP2, MET, LAMB1 et WNT2* précédemment associés à l'autisme sont situés dans cette région. Ils codent le facteur de transcription FOXP2, le récepteur au facteur de croissance hépatocytaire, la laminine béta 1 et le proto-oncogène WNT2.

- La délétion 2q37. Cette région comprend plus de 80 gènes.

- Les délétions et duplications de régions du chromosome X, plusieurs gènes localisés sur le chromosome X (*NLGN3* en Xq13, *NLGN4* en Xp22, *MECP2* en Xq28, *MAO-A* en Xp11.23 *et FMR1* en Xq27.3) sont impliqués comme facteurs de susceptibilité dans l'autisme.

Le locus 2p16 où est localisé le gène *NRXN1* qui code la neurexine 1 ainsi que le locus 7q35-36 qui contient le gène *CNTNAP2* codant la contactine 2 peuvent être ajoutés aux régions de prédisposition à l'autisme car plusieurs études ont décrit des CNV dans ces régions (Morrow *et al..*, 2008; Marshall *et al..*, 2008).

L'idéogramme de Marshall (2008) (Figure 19) répertorie des CNV sur l'ensemble des chromosomes, les régions 2q, 3q, 6q, 7q, 15q, 16p, 17q et 22q sont également des régions identifiées comme liées à l'autisme par les études de liaison. Cependant la majorité des CNV décrits correspondent à des variants rares mais que l'on pourrait répartir en fonction du mécanisme biologique sur lequel ils agissent dans l'autisme : activité synaptique, prolifération cellulaire, maturation cellulaire, voie de signalisation GTPase/Ras ou encore voie de l'ubiquitine.

b) Les CNV dans la déficience mentale

Le taux global de détection de réarrangements génomiques chez les enfants atteints de déficience mental et ou d'anomalies congénitales est de l'ordre de 12 à 18%. Parmi les anomalies génomiques détectées, 3 à 5% sont identifiées à l'aide du caryotype classique, 5 à 6% par la technique de FISH (hybridation fluorescente *in situ*) et 4 à 7% par CGH-arrray. Par rapport au caryotype classique, la CGH-array permettrait d'identifier 9 à 13% des CNV associés à la déficience mentale. Les anomalies détectées par FISH peuvent aussi l'être par CGH-array avec une résolution plus importante notamment au niveau des régions subtélomériques. En effet, l'équipe de Froyen (2008) a étudié 300 familles DMX: 6 duplications couvrant la région Xp22.11 ont été décrites chez 6 garçons présentant un retard

mental non syndromique. La région récurrente de ces duplications s'étendait sur 320kb et englobait 4 gènes connus dont 3 jouant un rôle dans le retard mental : *SMC1A, RIBC1, HSD17B10*, et *HUWE1*. *SMC1A* code une sous unité du complexe de cohésion. Des mutations ponctuelles de ce gène sont responsables du syndrome de Cornelia de Lange associé à des dysmorphies faciales, un retard mental, des déficits de croissance (Musio *et al.*, 2006). Des mutations silencieuses du gène *HSD17B10* sont responsables de retard mental syndromique (Lenski *et al.*, 2007). Parallèlement à la duplication impliquant le gène *HUWE1*, les auteurs ont observé 3 mutations ponctuelles dans ce gène chez 3 familles DMX. Ces données soulignent le rôle d' *HUWE1* dans la DMX et soutiennent la thèse d'un gène sensible au dosage génique, qui serait en partie responsable du retard mental dans les cas de duplication. Des mutations du gène *MECP2*, localisé en Xq28, sont associées à des retards de développement, du retard mental et des encéphalopathies chez les garçons. De récentes études ont suggéré que des duplications de ce gène pourraient aussi être responsables de phénotypes cliniques conduisant à une déficience mentale avec épilepsie chez les garçons (Bauters *et al.*, 2008, Carvalho *et al.*, 2008, Del Gaudio *et al.*, 2006, Van Esch *et al.*, 2005). Des microduplications ont également été identifiées, chez 7 patients, dans la région 17p13.3 qui inclue les gènes *LIS1* qui code une acétylhydrolase et *14-3-3Ɛ* qui code une tyrosine 3 monooxygénase (Bi *et al..*, 2009). Une corrélation « génomotype (le génomotype, terme employé par l'équipe du Pr Lupski, il représente l'ensemble des CNV des gènes d'une région chromosomique) »/phénotype des données de cette étude a mis en évidence qu'une augmentation du dosage génique du gène *LISC1* était responsable de microcéphalie, d'anomalies structurales cérébrales légères, de retard de développement modéré à sévère, alors que la duplication du gène *14-3-3Ɛ* augmente le risque de macrosomie, de retard de développement et d'un trouble envahissant du développement. Une corrélation entre 148 CNV associés à la déficience mentale et le phénotype développé par environ 5000 modèles de souris invalidées a été recherchée par Webber *et al.* (2009). Les CNV associés au retard mental ont été significativement trouvés parmi les orthologues murins de deux classes de gènes : les gènes intervenant dans la morphologie axonale et les gènes impliqués dans la morphologie des neurones dopaminergiques. Une analyse plus sélective a permis de souligner des associations entre le phénotype des souris et certains caractères tels les anomalies cérébrales, l'épilepsie ou la fente palatine. Ainsi 78 gènes contribueraient au retard mental et aux phénotypes qui lui sont associés. Les mêmes auteurs dans une étude plus récente (Hehir-Kwa *et al.*, 2010) ont suggéré que le taux de CNV rares serait plus important que ce qui était présumé et qu'il existerait un nombre élevé de loci pour lesquels l'hérédité et la pénétrance

seraient variables notamment pour les régions 1q21.1, 15q13.3 et 16p13.3. Ces constatations démontrent les limites de la théorie qui considère qu'un CNV est bénin s'il est hérité et récurent et causal s'il est rare et *de novo*. Le développement des nouvelles techniques d'exploration du génome complet par CGH-array ou SNP-array ont permis l'identification de nouveaux syndromes microdélétionnels et de microduplications comme le montre le Tableau 11 (Vissers *et al.*, 2010, Koolen *et al.*, 2009, Schluth-Bolard *et al.*, 2008).

Tableau 11 : Microdélétions et microduplications interstitielles associées au retard mental (d'après Vissers *et al*., 2010).

Name	Size (Mb)*	LCR	MIM	Clinical features
1q21.1 microdeletion	1.1	+	612474	Mild-to-moderate MR, MC, cardiac abnormalities, cataracts, clear incomplete penetrance
1q21.1 microduplication	1.1	+	612475	Autism or autistic behaviours, mild to moderate MR, microcephaly, mild FD
1q41q42 microdeletion	1.2	–	–	MR, seizures, various dysmorphisms, cleft palate, diaphragmatic hernia
2p15q16.1 microdeletion	3.9	–	–	MR, MC, receding forehead, ptosis, telecanthus, short palpebral fissures, downslanting palpebral fissures, broad/high nasal bridge, long/straight eyelashes, smooth and long philtrum, smooth upper vermillion border, everted lower lip, high narrow palate, hydronephrosis, optic nerve hypoplasia
3q29 microdeletion	1.6	+	609425	MR, mild FD, including high nasal bridge and short philtrum
3q29 microduplication	1.6	+	611936	Mild/moderate MR, MC, obesity
7q11.23 microduplication	1.5	+	609757	MR, speech and language delay, autism spectrum disorders, mild FD
9q22.3 microdeletion	6.5	–	–	MR, hyperactivity, overgrowth, trigonocephaly, macrocephaly, FD
12q14 microdeletion	3.4	–	–	Mild MR, failure to thrive, proportionate short stature and osteopoikilosis
14q11.2 microdeletion	0.4	–	–	MR, widely spaced eyes, short nose with flat nasal bridge, long philtrum, Cupid's bow of the upper lip, full lower lip, auricular anomalies
15q13.3 microdeletion	1.5	+	612001	MR, epilepsy, hypotonia, short stature, microcephaly and cardiac defects
15q24 microdeletion	1.7	+	–	MR, growth retardation, MC, digital abnormalities, genital abnormalities, hypospadias, loose connective tissue, high frontal hairline, broad medial eyebrows, downslanted palpebral fissures, long philtrum
16p11.2 microdeletion/duplication	0.6	+	611913	Association with MR, autism, schizophrenia
16p11.2p12.2 microdeletion	7.1	+	–	MR, flat facies, downslanting palpebral fissures, low-set and malformed ears, eye anomalies, orofacial clefting, heart defects, frequent ear infections, short stature, minor hand and foot anomalies, feeding difficulties, hypotonia
16p13.1 microduplication	1.6	+	–	Association with autism, significance uncertain
16p13.1 microdeletion	1.6	+	–	MR, MC, epilepsy, short stature, phenotypic variability
17p11.2 microduplication †	3.7	+	610883	MR, infantile hypotonia, failure to thrive, autistic features, sleep apnoea, and structural cardiovascular anomalies
17q21.31 microdeletion	0.5	+	610443	MR, hypotonia, long hypotonic face with ptosis, large and low set ears, tubular or pear shaped nose with bulbous nasal tip, long columella with hypoplastic alae nasi, broad chin
19q13.11 microdeletion	0.7	–	–	MR, pre- and postnatal growth retardation, primary microcephaly, hypospadias, ectodermal dysplasia including scalp aplasia, dysplastic nails and dry skin
22q11.2 microduplication	3.7	+	608363	Highly variable. MR, FD, for example widely spaced eyes and downslanting palpebral fissures, velopharyngeal insufficiency, conotruncal heart disease
22q11.2 distal microdeletion	1.4–2.1	+	611867	MR, prematurity, prenatal/postnatal growth delay, mild skeletal abnormalities, arched eyebrows, deep set eyes, smooth philtrum, thin upper lip, hypoplastic alae nasi, small pointed chin
Xq28 microduplication	0.4–0.8	–	–	MR, severe hypotonia, progressive lower limb spasticity, absent or very limited speech

FD, facial dysmorphisms; LCR, low copy repeat; MC, microcephaly; MR, mental retardation.
*Common region.
†Potocki–Lupski syndrome.

Ces principaux syndromes sont répertoriés ci-dessous:

-Le syndrome 17q21.31 fut un des premiers décrit (Koolen *et al.*, 2006, Sharp *et al.*, 2006, Shaw-Smith *et al.*, 2006), la comparaison du phénotype présenté par les patients porteurs de la délétion a permis de définir une nouvelle entité clinique. La fréquence de ce syndrome varierait entre 0,3 et 1% des retards mentaux.

-La délétion 15q24 (Sharp *et al.*, 2007) qui s'étend en moyenne sur 1,7Mb. A ce jour 5 cas avec un retard mental léger ont été décrits, tous des garçons. Cette délétion serait due à un mécanisme NAHR.

-La microdélétion 3q29 est une délétion interstitielle qui englobe une région de 1,5Mb contenant 22 gènes dont 5 sont connus (*PYTI1A, PAK2, MFI2, DLG1, BDH*).

-La délétion 2q32-q33 est visible du fait de sa taille (8,1Mb) sur le caryotype classique (Van Buggenhout *et al.*, 2005), elle est entre autre caractérisée par un retard mental sévère.

- Ballif et al. (2007) ont décrit une délétion récurrente en 16p11.2-p12.2 d'une taille de 7,1 à 8,7Mb chez des patients avec déficience mentale. Cette délétion survient dans une région très riche en duplicons.

- Le syndrome du Cri du chat ou monosomie 5p est une délétion qui touche le bras court du chromosome 5. La délétion peut être très petite ou impliquer la totalité du bras court. On observe une délétion du gène *TERT* codant une sous unité transcriptase inverse du complexe de la télomérase. Il semble exister une corrélation entre la taille de la délétion et l'expression clinique de la maladie.

Trois microduplications, miroir moléculaire de microdélétions fréquentes ont maintenant un phénotype clinique décrit.

-La microduplication 7q11.23 (miroir de la microdélétion 7q11.23 responsable du syndrome de Williams Beuren), les patients présentent un profil neurocomportemental avec des troubles du langage et une dysmorphie discrète (Berg *et al.*, 2007).

-La microduplication 17p11.2 (syndrome de Potocki-Lupski), cette région est particulièrement riche en duplicons et par conséquent, elle est le siège de nombreux remaniements récurrents ou non; 63% des patients sont porteurs d'une duplication de 3,7Mb (Potocki *et al.*, 2007). Une région minimale critique de 1,3Mb a été définie pour ce syndrome, elle englobe le gène *RAI1* pour lequel des mutations ponctuelles ont été décrites dans le syndrome de Smith-Magenis (miroir moléculaire du syndrome de Potocki-Lupski).

-La microduplication Xq28, cette région est riche en gènes impliqués dans le développement cérébral dont *MECP2* et *L1CAM* qui code la protéine d'adhésion cellulaire L1 (Van Esch *et al.*, 2005).

-Plusieurs cas de duplication Xp22.31 ont été décrits; leur taille est comprise entre 149kb et 1,74 Mb. La région dupliquée est encadrée par des LCRs (Wagenstaller *et al.*, 2007, li *et al.*, 2010).

Stankiewicz et Lupski, (2010) ont répertorié sur un idéogramme, les CNV identifiés par CGH-array et associés à la déficience mentale (Figure 20).

Les approches qui ont révélé les CNV pathologiques dans le retard mental ont également contribué à l'identification d'un nombre important de CNV « bénins » rencontrés dans la population générale. Ces CNV considérés comme non pathologiques pourraient cependant jouer un rôle de facteur de risque direct ou indirect en fonction des gènes perturbés.

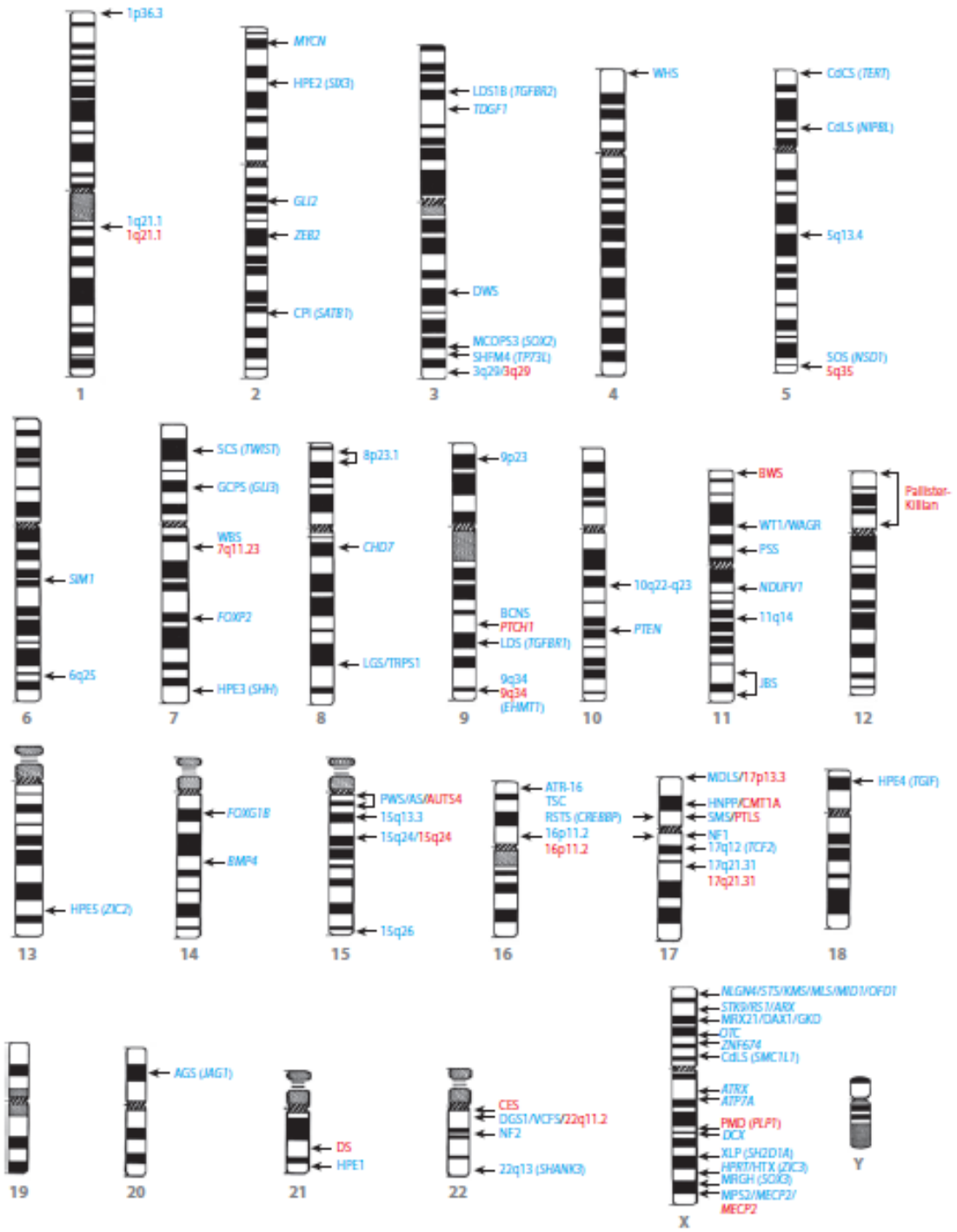


Figure 20 : Distribution des CNV responsables de retard mental syndromique et non syndromique. Les duplications apparaissent en rouges et les délétions en bleus (d'après Stankiewicz et Lupski, 2010).

OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

La présence d'un retard mental chez 75% des patients autistes ainsi que la manifestation de troubles autistiques chez 30% des patients déficients mentaux suggèrent des mécanismes physiopathologiques communs à ces deux maladies et en particulier l'existence de causes génétiques communes. Ces deux pathologies partagent des syndromes génétiques associés (syndrome de l'X fragile, syndrome d'Angelman, syndrome de Rett,…), des maladies génétiques associées (sclérose tubéreuse de Bourneville, neurofibromatose de type I, …). Une mutation dans un gène peut induire à la fois de l'autisme et du retard mental (*NLGN4X, SCHANK3, NRXN1, GRIK2).* Des CNV communs ont été mis en évidence. Ces observations semblent montrer qu'il existerait un continuum entre ces deux pathologies.

Notre travail a porté sur la recherche de nouveaux gènes impliqués dans l'autisme et la déficience mentale et dans la mise au point d'une méthode de criblage rapide de recherche de CNV dans des régions ciblées, dans l'autisme. Nous avons également étudié plus spécifiquement 3 loci : la région du gène *NF1*, le gène *NLGN4X* et la région 22q13.

Plusieurs loci ont été associés à l'autisme ou à la déficience mentale par la présence de CNV, de polymorphismes ou encore de mutations dans certains gènes importants dans le développement cérébral ; parmi eux, le locus du gène *NF1* et le gène *NLGN4X,* que nous étudions au laboratoire et pour lesquels des travaux ont été publiés (Mbarek *et al*., 1999, Laumonnier *et al*., 2004). Les gènes *NF1* et *NLGN4X* interviennent respectivement dans les voies de signalisation Ras/GTPase et la synapse glutamatergique qui constituent des voies importantes dans l'autisme (Pinto *et al.,* 2010).

La région 22q13 est également un locus majeur dans l'autisme, plusieurs études ont mis en évidence des CNV ainsi que des mutations du gène *SHANK3* chez des patients autistes. La protéine SHANK3 par son interaction avec les neuroliguines et les neurexines, intervient dans la régulation de la synpase glutamatergique.

Nous avons employé différentes stratégies pour conduire notre étude :

- L'étude d'association a été employée pour évaluer l'impact d'un marqueur microsatellite GXAlu localisé dans l'intron 27b du gène *NF1* (neurofibromatose de type 1) dans la déficience mentale non syndromique.

- L'approche gène candidat a été utilisée pour :

- La recherche et l'étude de l'implication de mutations du gène *NLGN4X* chez des autistes avec ou sans retard mental associé.
- L'étude de la région 22q11-13 par MLPA dans une cohorte de patients autistes.
- La recherche de CNV par PCR quantitative en temps réel dans des régions ciblées du génome chez des patients autistes.

MATERIELS ET METHODES

I. Les Populations étudiées

A. La population autiste

Les patients autistes étudiés proviennent du service de pédopsychiatrie du CHRU de Tours (106 patients dont 27 filles et 79 garçons) et de la Fondation Autisme (45 patients). Ces patients sont non apparentés, d'origine caucasienne et d'âge variant de 4 à 48 ans au moment de l'évaluation clinique. Le diagnostic clinique des patients a été réalisé selon les critères définis par le DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders, 2000) (Tableau 12). L'évaluation clinique de certains patients a été complétée par L'ADI (Autism Diagnostic Interview, Lord *et al.*, 1994) et la CARS (Childhood Autism Rating Scale, Schopler *et al.*, 1980). L'échelle d'évaluation du comportement autistique BSE-R (Barthélémy *et al.*, 1997) a été utilisée afin d'apprécier d'éventuels progrès des patients.
Le quotient de développement a été mesuré avec les tests habituellement employés par les cliniciens : le test de Brunet-Lézine (1951) et l'Echelle Différentielle d'Efficience Intellectuelle (EDEI-R, Perron et Borelli, 1998).

Les patients pour lesquels un diagnostic de syndrome d'Asperger ou de syndrome de Rett a été posé ont été exclus des études ainsi que ceux présentant des maladies métaboliques, neurologiques ou génétiques associées. De plus, la présence d'éventuelles anomalies chromosomiques a été étudiée, notamment la mutation FRAXA, qui est due à l'amplification de triplets CGG ; les patients positifs pour cette mutation ont été exclus il en est de même pour ceux présentant une duplication 15q (Syndrome d'Angelman).

Par ailleurs les patients ou leurs parents ont donné un consentement éclairé écrit pour la conduite de ces études. Ces protocoles d'étude ont reçu l'approbation des collectivités locales et des comités d'éthique nationaux (INSERM projet RBM 93045).

Tableau 12 : Les critères diagnostique selon le questionnaire F84.0 [299.00] concernant les troubles autistiques, d''après le mini DSM IV, American Psychiatric Association (1994).

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

B. La population avec déficience mentale

Les 64 patients avec déficience mentale étudiés proviennent du service de génétique du CHRU de Tours. Ces patients sont tous d'origine caucasienne et n'ont pas de lien de parenté. Un examen clinique minutieux a été réalisé par les cliniciens afin d'écarter tous signes liés à une déficience mentale syndromique. Tous les patients testés sont négatifs pour la mutation X fragile. Ils ne présentent pas les critères de comportement autistique du DSM-IV, le RM est

léger à profond avec un QI inférieur à 70. L'étude des familles n'a pas montré d'antécédent de déficience mentale, la population étudiée n'est donc constituée que de cas sporadiques.

Tous les patients ou leurs parents ont donné un consentement éclairé par écrit.

C. La population d'individus témoins

La population de témoins est constituée de donneurs anonymes français d'origine caucasienne issus du centre de transfusion sanguine de Tours. Ce sont des individus sains, non apparentés, hommes et femmes.

D. L'extraction d'ADN

L'ADN des patients et des témoins est obtenu à partir d'un prélèvement de sang dans des tubes traités à l'EDTA ou extrait à partir de lignées lymphoblastoïdes établies à partir des globules blancs des patients. Pour les prélèvements sanguins, après centrifugation, le culot cellulaire est lavé et récupéré en présence de NaCl 9‰. Les hématies sont lysées par ajout d'une solution hypotonique (Tris HCl 200mM, NaCl 10mM, $MgCl_2$ 5mM), trois lavages successifs en milieu hypotonique permettent d'obtenir un culot leucocytaire. Une lyse cellulaire est effectuée pendant une nuit à 37°C, sous agitation, en présence de tampon TE 20-5 (Tris-HCl 20mM, EDTA 5mM, pH8), de protéinase K (200µg/mL) qui digère les protéines membranaires et les nucléoprotéines liées à L'ADN, et de sarkosyl (34mM) qui est un détergent qui détruit les membranes cellulaires, et permet de ce fait la libération de l'ADN génomique. L'ADN est ensuite précipité en présence d'acétate d'ammonium (1M) et d'éthanol (85%). L'acétate d'ammonium modifie la charge globale de l'ADN qui devient alors neutre et visible sous forme d'une « méduse ». Le précipité d'ADN est placé dans une solution de TE 20-5, contenant 0,2M de NaCl et incubé à 42°C sous agitation pendant une nuit afin d'éliminer toute protéine qui aurait pu précipiter en même temps que L'ADN. L'ADN est de nouveau précipité par adition d'éthanol absolu, la nouvelle « méduse » d'ADN est lavée trois fois en présence d'éthanol 70% à -20°C afin d'éliminer les sels. L'ADN est finalement dissout dans une solution de TE 10-1 à pH8, incubé 30 minutes à 65°C puis incubé sur un agitateur rotatif à 4°C jusqu'à solubilisation complète (48h).

La concentration des solutions d'ADN génomique est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm à l'aide du NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. La pureté de l'ADN est donnée par

la mesure du rapport des absorbances à 260 nm/280 nm qui doit être compris entre 1,8 et 2. Les solutions d'ADN sont ensuite conservées à 4°C.

La qualité des ADN est évaluée lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1%, préparé avec du tampon de TBE 1X. La migration de 50ng d'ADN est réalisée sous une tension de 120 volts pendant 45 minutes. Les ADN ne présentant pas une bande de haut poids moléculaire lors de l'électrophorèse sont exclus des études.

II. Etude du marqueur GXAlu dans le retard mental

A. Le clonage des allèles de GXAlu

Le marqueur microsatellite GXAlu a été amplifié par PCR à l'aide des amorces GXAlu-F (CAAGAAAAGCTAATATCGGC) et GXAlu-R (GGAACCTTAAGTTCACTTAG). Les produits de PCR ont tout d'abord été clonés dans un vecteur d'amplification pCR2.1 TOPO (Invitrogen), puis séquencés afin de vérifier la séquence et le sens d'insertion des différents allèles. Les inserts GXAlu (Tableau 13) ont alors été clonés dans un vecteur d'expression pCAT3-promoter® (Promega) (Figure 21) dans un site de clonage KpnI/XhoI. Des bactéries TOP10 (Invitrogen) sont transformées par choc thermique avec ces constructions plasmidiques.

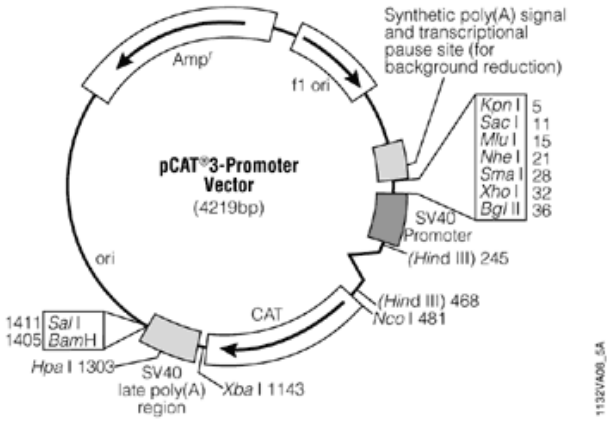


Figure 21: Cartographie du vecteur d'expression pCAT3® promoter®

L'ADN plasmidique des clones positifs est ensuite extrait en suivant le protocole du kit Qiagen miniprep. La séquence et le sens d'insertion des allèles GXAlu sont de nouveau vérifiés par séquençage.

Tableau 13: Liste des allèles GXAlu

Allèles GXAlu	Nombre de répétitions AAAT	Taille produit PCR (bp)
1	10	408
2	9	404
3	8	400
4	7	396
5	6	392

B. La culture cellulaire et la transfection

La lignée cellulaire COS7 (cellules épithéliales rénales de singe vert) est cultivée en milieu DMEM (Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 50U/mL de penicilline et 50µg/mL de streptomycine.

Les cellules ont été transfectées par électroporation avec le nucleofector® (Amaxa). Pour cela nous avons utilisé le protocole préconisé pour le kit de transfection Rat NSC Nucleofector® (Lonza) : 10^6 cellules sont resuspendues dans 100µl de solution Rat NSC Nucleofector® en présence de 1µg de l'un des vecteurs pCAT3®-promoter® contenant un des inserts GXALu (en orientation sens ou antisens) et de 1µg de plasmide pSV-B-galactosidase (Promega) dans des cuvettes d'électroporation, qui sont introduites dans l'appareil. Le plasmide pSV-B-galactosidase nous sert de contrôle de l'efficacité de la transfection. Une transfection est réalisée avec le vecteur pCAT3®-promoter® sans insert. Les cellules transfectées sont ensuite ensemencées à la densité de 10^4 cellules/puit dans des plaques 6 puits pendant 72h puis une extraction des ARN est réalisée.

C. L'extraction d'ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée selon la technique de Chomczynski et Sacchi (1987) à partir de 1 à 5. 10^6 cellules. Pour cela nous avons utilisé un réactif d'extraction rapide : le Trizol (Invitrogen). Ce réactif contient du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine qui en se complexant à l'ARN rompt les interactions ARN- protéines. Les culots cellulaires sont homogénéisés dans 1mL de Trizol avant l'addition de 0,2mL de chloroforme qui dénature les protéines. Après centrifugation (4°C, 12000g, 15min), trois phases sont visibles dans chaque échantillon, une phase supérieure aqueuse contenant les ARN, une phase intermédiaire blanchâtre contenant l'ADN, une phase inférieure organique contenant les protéines, l'ADN, le phénol et le chloroforme. La phase supérieure est prélevée et précipitée avec 500µL d'isopropanol. Après centrifugation (4°C, 12000g, 10min), le culot d'ARN est lavé avec 1mL d'éthanol 70%. Le culot final d'ARN est séché 5min à température ambiante puis dissous dans 50µL d'H_2O DEPC (diéthylpyrocarbonate) 0,1%. Les ARN sont congelés à -80°C avant d'être dosés au Nanodrop® (Labtech). La décongélation permet une meilleure dissolution du culot d'ARN. La qualité des ARN est vérifiée lors du dosage par le rapport 260nm/280nm qui doit être compris entre 1,8 et 2 et lors d'une électrophorèse en gel d'agarose 1,2% TBE 1X au cours de laquelle nous vérifions la présence de 3 bandes correspondant aux ARN 28S, 18S et 5S.

D. La transcription inverse (RT)

Préalablement à l'étape de transcription inverse, les ARN sont traités à la DNAseI (1U/µL) (Invitrogen) afin d'éliminer toute contamination par de l'ADN. Pour cela 1 µg d'ARN est incubé en présence de 1µL de DNAseI dans un volume final de 10µL, pendant 15min, puis on ajoute 1µL d'EDTA qui permet de chelater les ions Mg^{++} contenus dans le tampon de réaction qui pourraient inhiber la RT, avant d'effectuer une étape de dénaturation à 65°C pendant 10min.

La RT est réalisée dans un volume final de 20µL à partir de 500ng d'ARN traités à la DNAseI en présence de 10mM de DTT, 100ng de Random Hexamer, 1mM de dNTP et de 10U/µL de SuperscriptII® (Invitrogen). La réaction de RT est réalisée en un cycle d'hybridation et d'élongation à 42°C pendant 50min puis une étape de dénaturation à 95°C pendant 5min. Les produits de RT sont conservés à -20°C.

E. La RT-PCR quantitative en temps réel (RT-QPCR)

Le principe de cette technique est détaillé dans le paragraphe (IV). Nous avons employé le même mode opératoire que celui utilisé pour la quantification de l'ADN avec cependant quelques modifications : nous avons utilisé le réactif Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), les gènes ont été étudiés à partir de 25ng de cDNA par échantillon et 10pmol de chaque amorce, le gène de la *GAPDH* a été choisi comme gène de référence pour les études d'expression du gène *NLGN4X* et le gène de la betagalactosidase pour les études d'expression du gène chloramphénicol acétyl transférase (*CAT*) en fonction des allèles GXAlu. La méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a été utilisée pour l'analyse des résultats. La séquence des amorces de chaque amplicon est reportée dans le Tableau 14

Tableau 14: Liste des amorces utilisées pour l'analyse par RTqPCR

Amorces (5'-3')	Séquences	Tm °C	Taille produit PCR (bp)
NLGN4X F	CGGTGGATTGAGGAGAATGT	60	214
NLGN4X R	TGTCTGCCAATATCCGAGTG	60	
GAPD F	CTGCACCACCAACTGCTTAG	62	101
GAPD R	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	62	
CAT F	TCCGGCCTTTATTCACATTC	60	168
CAT R	TCGTCGTGGTATTCACTCCA	60	
GAL F	AGCTGGCGTAATAGCGAAGA	60	150
GALR	GACAGTATCGGCCTCAGGAA	60	

F. Le séquençage d'ADN

1. Le principe

Le séquençage d'ADN consiste à déterminer l'enchainement des nucléotides qui le constitue. C'est donc la technique la plus fine pour détecter et qualifier des variations de séquence pouvant exister dans le génome. La technique de séquençage que nous avons utilisé est basée sur une adaptation de la méthode de Sanger. Son principe consiste en une amplification d'un brin matrice par une ADN polymérase initiée par la fixation d'une amorce complémentaire du brin matrice en présence des 4 dNTP et des 4 ddNTP marqués avec un

fluorophore spécifique. Lorsqu'un des ddNTP est incorporé dans la séquence, il y a arrêt d'élongation. Ce blocage de l'élongation est du à l'impossibilité qu'ont les ddNTP à former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide. L'incorporation aléatoire des dNTP et des ddNTP va générer des fragments de différentes tailles. Une électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes va séparer les produits de la réaction de séquence en fonction de leur taille. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique des ddNTP permettra d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice.

2. Le protocole

Le mélange réactionnel contient 2µL de produit de PCR, 1,5µL de tampon BigDye Terminator v1.1,v3.1 5X sequencing buffer (Applied Biosystems®), 1µL de mix BigDye Terminator v1.1 cycle (Applied Biosystems®) et 500nM d'amorce sens ou antisens, dans un volume final de 10µL. La réaction est réalisée dans un thermocycleur GenAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems®) selon le programme suivant : une dénaturation à 96°C pendant 1min puis 25 cycles constitués de 4s à 96°C, 5s à 50°C et 4min à 60°C. Les produits de séquençage sont ensuite purifiés avec le kit SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup (Millipore), cette étape permet l'élimination des sels, des amorces, des dNTP et des ddNTP fluorescents, non utilisés par la réaction de séquençage. La séquence des échantillons est lue après électrophorèse sur un séquenceur 16 capillaires 3130XL (Applied Biosystems®) avec le logiciel Codoncode Aligner®.

G. La dHPLC

1. Le principe

La dHPLC (chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante) est une technique principalement utilisée pour la détection rapide de variations génotypiques telles que des substitutions de nucléotides, des petites insertions ou délétions sur des fragments de PCR. Nous avons utilisé cette technique en conditions non dénaturantes et développé un protocole permettant le génotypage rapide d'un marqueur microsatellite.

La dHPLC est une technique de chromatographie constituée de deux phases :

- Une phase stationnaire constituée par une colonne contenant des particules de polystyrène-divinylbenzène sur lesquelles sont greffées des chaînes de carbone insaturées électriquement neutres. Ces particules sont associées à des ions acétates de triethylamonium (TEAA) chargés positivement.
- Une phase mobile correspondant à un gradient d'acétonitrile. L'ADN chargé négativement interagit avec les ions TEAA. On élue l'ADN en augmentant la concentration d'acétonitrile chargé négativement. Ce dernier va entrer en compétition avec l'ADN pour interagir avec le TEAA. Nous avons travaillé en conditions non dénaturantes à une température de 50°C, donc 100% de l'ADN était double brin. L'ADN va être élué en fonction de sa taille, les fragments les plus courts sont élués en premier. En effet, ces derniers ont une densité de charges négatives plus faibles, ils se décrochent plus facilement des ions TEAA.

Les échantillons sont traités par le système automatisé WAVE System 3500HT (Transgenomic®). Un échantillonneur injecte 7µL d'échantillon dans le circuit qui contient en permanence un mélange de tampon A (0,1M TEAA) et de tampon B (0,1M TEAA, 25% acétonitrile). L'échantillon passe ensuite dans le four chauffé à 50°C afin de maintenir l'ADN sous la forme double brin. L'échantillon passe dans la colonne. Après élution les échantillons sont détectés par mesure de l'absorbance à 260nm grâce au détecteur UV et analysés avec le logiciel Navigator 1.5.3 (Transgenomic).

2. Application au génotypage du microsatellite GXAlu

Une PCR est préalablement réalisée dans un volume final de 25µL sur 25ng d'ADN de patient ou sur 50ng d'ADN de plasmide contenant les allèles 1 à 5 de GXAlu. Le mélange réactionnel est constitué de 10 pmol d'amorces alu-F / alu-R (Tableau 15), 1,5U de taq DNA polymerase (Invitrogen), 125µM de dNTP et 1,5mM de $MgCl_2$. Le cycle d'amplification était le suivant : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 5 min puis 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15s, d'hybridation à 60°C pendant 15s et d'élongation à 72°C pendant 15s. Deux standards de taille externes de 128pb et 156pb ont été réalisés en amplifiant l'insert correspondant à l'allèle 1 (alu 1 : 10 répétitions AAAT) du microsatellite GXAlu avec les amorces alu-F1/alu-R et l'insert correspondant à l'allèle 5 (alu 5 : 6 répétitions AAAT) du microsatellite GXAlu avec les amorces aluF/alu-R1 (Tableau 15). Un standard de taille interne a par ailleurs été généré en mélangeant 10µL des deux standards

précédemment réalisés et 10µL de chaque insert GXAlu (allèles 1 à 5 de GXAlu insérés dans un plasmide) amplifiés séparément avec les amorces alu-F/alu-R.

Tableau 15: Liste des amorces utilisées pour l'analyse par dHPLC

Amorces (5'-3')	Séquences	Tm °C	Taille produit PCR (bp)
aluF	GATCGCACCACTGCATTCTA	60	128 to 156
aluR1	GTTCACTTAGAAACAAGCAA	60	
aluF1	AGCCAAGATCGCACCACTGCATTCTA	60	
aluR	CCTTAAGTTCACTTAGAAACAAGCAA	60	

Chaque échantillon analysé par dHPLC est constitué d'un mélange de 20µL de produit de PCR associé à 10µL de chaque standard de taille externe. 7µL de marqueur de taille interne ou d'échantillon à tester ont été injectés dans le système WAVE (Transgenomic). Les conditions expérimentales de dHPLC sont les suivantes :

- La température du four à 50°C
- Le flux d'élution à 0,9mL/min
- Le gradient d'acétonitrile de 40% à 72%

Après l'analyse des données, tous les chromatogrammes obtenus sont ajustés sur les pics correspondant aux standards de taille externes, ce qui nous permet de déterminer facilement le génotype de chaque patient et témoin. Les fréquences alléliques et génotypiques entre patients et témoins sont comparées par un test de Chi2.

III. Amplification multiples de sondes dépendantes d'une ligation (MLPA) et étude de la région 22q13

A. Le principe

La MLPA ou amplification multiples de sondes dépendantes d'une ligation a été employée pour explorer la région chromosomique 22q13. Cette technique consiste à utiliser des sondes en deux segments de longueur unique qui, lorsqu'elles s'hybrident à des séquences cibles adjacentes sur l'ADN génomique peuvent être liées par une DNA-ligase. Cela permet l'amplification de tous les sites ciblés d'une région chromosomique d'intérêt au moyen d'une seule paire d'amorce (Figure 22). Les deux extrémités libres des sondes possèdent des séquences complémentaires au couple d'amorces. L'une des amorces est marquée avec un fluorophore en 5', ce qui permet la détection des produits amplifiés par électrophorèse capillaire. Les produits sont séparés en fonction de leur taille, ainsi chaque pic de l'électrophorégramme obtenu correspond à une seule et unique sonde. Les aires sous chaque pic sont quantifiées et après normalisation des données, le nombre de copies peut être déterminé pour chacune des séquences cibles et donc pour chacun des gènes criblés dans la région chromosomique étudiée.

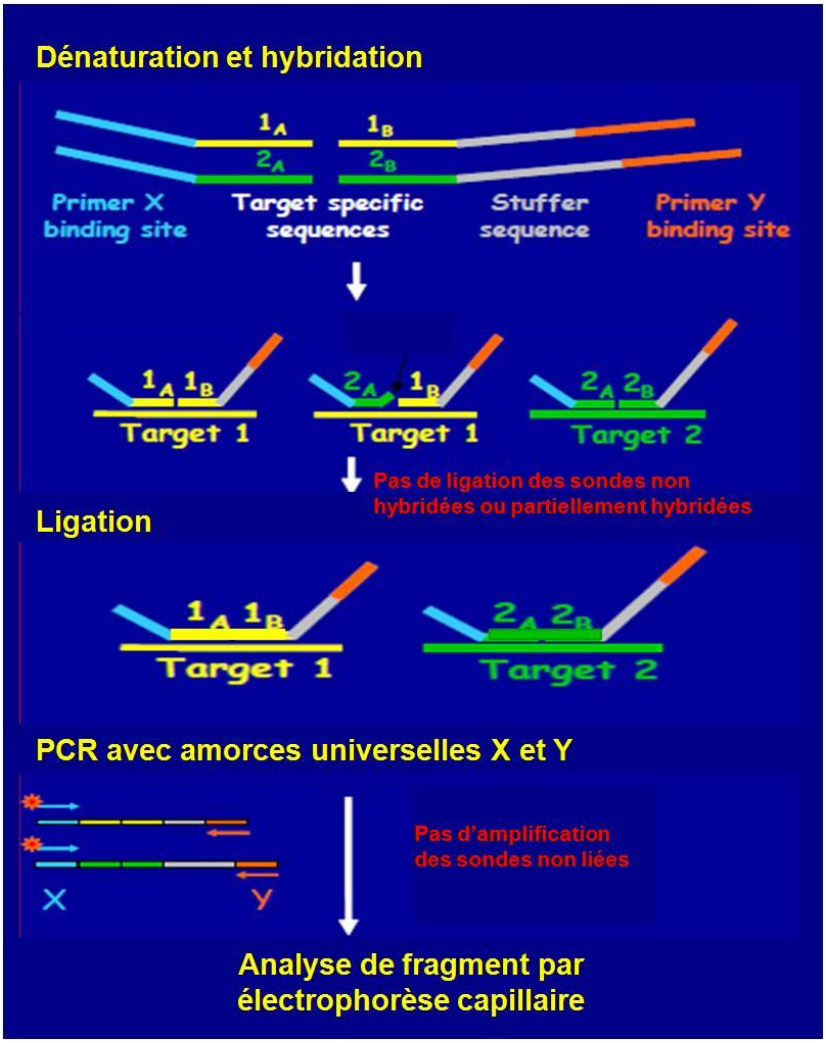


Figure 22: Principe de la technique MLPA

Le kit SALSA MLPA P188 22q13 fourni par MRC-Holland a été utilisé pour l'exploration. Ce kit contient 35 sondes localisées dans la région chromosomique 22q13 et 9 sondes de références situées sur d'autres chromosomes. L'ensemble des sondes couvrent une région d'environ 19Mb, la plupart étant situées dans les 1Mb en q-terminal. Les sondes sont localisées dans 23 gènes différents et plusieurs sondes peuvent s'hybrider sur un même gène.

B. Le protocole

Les ADN (200ng) sont dénaturés 45 minutes à 98°C dans un volume réactionnel de 2,5µL puis hybridés avec 0,75µL du mélange de sondes, à 60°C pendant 16H30. Une ligation est effectuée pendant 15 minutes à 54°C ; elle est stoppée par une incubation à 98°C pendant 5 minutes. Une amplification par PCR de 5µL du produit de ligation est ensuite effectuée dans

un volume final de 25µL en présence des amorces spécifiques (l'amorce sens est marquée en 6-FAM à son extrémité 5') selon le thermocycle suivant : 60°C pendant 30s, puis 35 cycles de 95°C pendant 30s, 60°C pendant 30s, 72°C pendant 1min et enfin un dernier cycle à 72°C pendant 20min. Les produits de PCR peuvent être conservés une semaine à -20°C. 1µL de réaction de PCR est dénaturé pendant 3min à 96°C en présence de formamide et d'un marqueur de taille le G500 ROX (Applied Biosystems), puis l'électrophorèse capillaire est réalisée sur un séquenceur 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Une sonde est assignée à chaque pic obtenu (Figure 23) à l'aide du logiciel Genemapper® (Applied Biosystems).

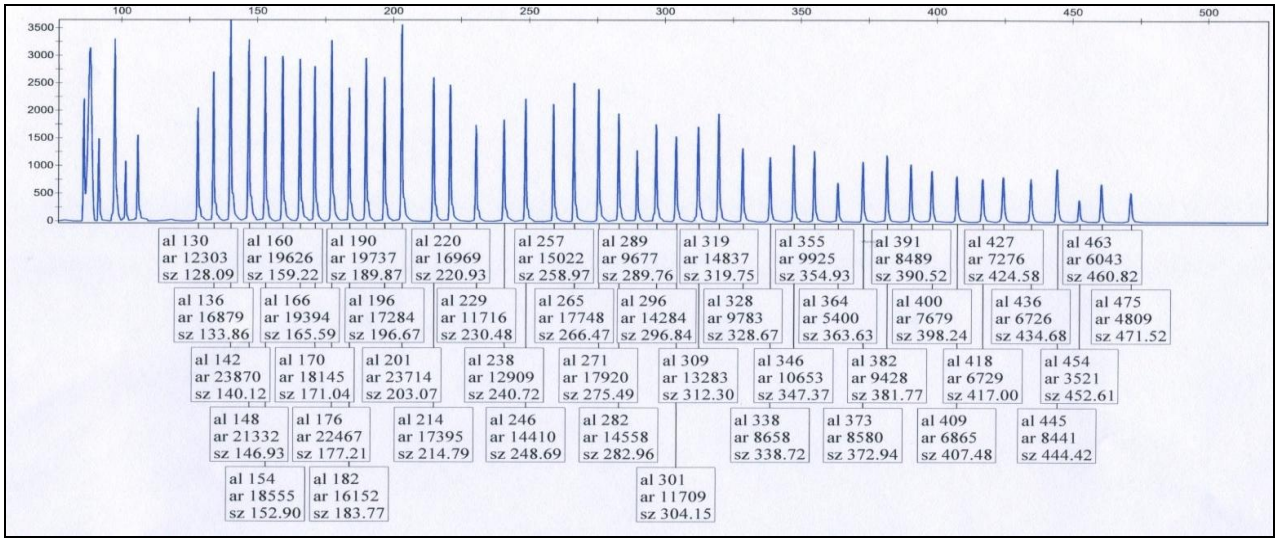


Figure 23 : Exemple d'électrophérogramme obtenu par la technique MLPA pour un échantillon d'ADN.

C. L'analyse des données

Pour chaque sonde, l'aire sous les pics est calculée par le logiciel Genemapper®, puis analysée avec le logiciel Excel. Une première normalisation N1 des données est réalisée en divisant la valeur de l'aire de chaque pic par la moyenne des aires des pics des sondes contrôles. Une deuxième normalisation N2 est calculée en divisant chaque N1 par la moyenne des N1 correspondant à une sonde de tous les échantillons de l'expérience. Une valeur de N2 normale est de 1, sachant qu'il existe toujours des fluctuations entre échantillons, le fournisseur du kit a défini des seuils de normalité compris entre 0,7 et 1,3. Ainsi un échantillon est considéré comme ayant une délétion pour une sonde lorsque N2 est inférieure

à 0,7 et comme ayant une duplication lorsque N2 est supérieure à 1,3. Les ADN pour lesquels des valeurs de N2 sont en dehors de la zone de normalité sont systématiquement ré-analysés afin d'éliminer tout faux positif.

IV. Etude de CNV par PCR quantitative en temps réel (QPCR)

A. Le principe

Nous avons étudié les variations du nombre de copies de plusieurs gènes répartis sur l'ensemble du génome par PCR quantitative en temps réel (QPCR). La technique consiste à réaliser une PCR classique en présence d'un agent fluorescent le plus souvent le Sybrgreen® qui s'intercale exclusivement dans l'ADN double brin. La fluorescence ainsi détectée à chaque cycle de PCR est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Nous avons évalué 3 kits d'agents fluorescents différents, le LightCycler®480 DNA Sybr Green1 Master (Roche), le LightCycler®480 ResoLight Dye (Roche) et le SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). Le premier contient du Sybrgreen 1 qui s'intercale environ toutes les 25 paires de bases, les deux suivants contiennent un fluorophore qui s'intercale entre chaque paire de base. La technique doit être hautement résolutive pour nous permettre de détecter des variations de 1 à 2 voir 3 copies de gène. Les valeurs brutes sont exprimées en Cp (crossing point) qui correspond au point d'intersection entre la droite de la dérivée seconde de la courbe d'amplification de l'ADN étudié et la ligne de bruit de fond, ce qui correspond au nombre de cycles nécessaire pour atteindre une valeur seuil définie.

L'expérimentation s'est réalisée en deux étapes :

- Elaboration des droites standards où une gamme étalon a été effectuée avec un ADN contrôle. Cette méthode nécessite l'établissement d'une droite standard par couple d'amorces à étudier, elle nous permet de contrôler l'efficacité de PCR pour chaque couple d'amorces et de déterminer la gamme de mesure permettant de quantifier tous les échantillons pour un couple d'amorce donné.

- Détermination des ΔΔCp (quantification relative normalisée par un calibrateur). La quantification de gène cible est exprimée par rapport à un gène de référence obtenu à partir du même échantillon d'ADN. La quantité de gène cible et celle de gène de référence est fonction de l'efficacité de la PCR et du Cp enregistré. La méthode des ΔΔCp permet de calculer le rapport normalisé suivant :

$$\textbf{Ratio normalisé} = \frac{\textbf{conc. (gène cible échantillon)}}{\textbf{conc. (gène référence échantillon)}} \Big/ \frac{\textbf{conc. (gène cible calibrateur)}}{\textbf{conc. (gène cible calibrateur)}}$$

En tenant compte des efficacités de PCR ce modèle mathématique devient le suivant :

$$R = \frac{(E_{cible})^{\Delta Cp\ cible(calibrateur\ -\ échantillon)}}{(E_{référence})^{\Delta Cp\ référence(calibrateur\ -\ échantillon)}}$$

Le choix des couples d'amorces pour les amplifications des gènes étudiés a été réalisé en utilisant le logiciel Primer3 (v.0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm) puis la spécificité de chaque amplicon a été contrôlée *in silico* par le programme BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Les amorces choisies répondaient aux critères requis pour une étude par la technique de QPCR : taille des amplicons : comprise entre 100 et 250pb, pas plus de 3 C ou G à l'extrémité 3' de chaque amorce, une température de fusion (Tm) autour de 60°C et des amorces d'environ 20pb (Annexe 1)

B. Les courbes de fusion

La qualité des amplicons spécifiques de chaque couple d'amorces a été contrôlée par analyse de la courbe de fusion réalisée à la fin de la réaction de QPCR. Pour cela l'ADN amplifié est dénaturé à 95°C pendant 15s, la température est ensuite fixée à 65°C pendant

1min puis une dénaturation lente est réalisée en augmentant la température (0,11°C/s) jusqu'à 97°C, pendant cette dénaturation la fluorescence est mesurée en continue. Le logiciel LightCycler®480 permet de tracer une courbe où on observe un pic unique correspondant à la Tm (melting temperature) du produit amplifié.

C. L'efficacité de QPCR

Pour chaque locus étudié, l'efficacité de la QPCR est déterminée sur un échantillon d'ADN en réalisant une QPCR sur une série de dilutions croissantes afin d'obtenir une courbe d'étalonnage. L'échantillon utilisé a été le même pour tous les couples d'amorces testés, il s'agissait d'un mélange de 15 ADN issus de femmes de notre population contrôle. Ce mélange d'ADN nous a permis de nous affranchir des variations inter-génomes qui constituent un paramètre important dans le cadre de notre étude. Une gamme d'ADN de concentrations variant de 0,01ng à 100ng a été testée en QPCR en présence de chaque couple d'amorces. L'efficacité de QCR est déterminée en réalisant une régression linéaire à l'aide du logiciel LightCycler®480 (Roche), elle est calculée par l'équation suivante :

$$\mathbf{E = 10^{-1/pente}}$$

Où **E** représente l'efficacité, elle est égale à 2 lorsque la PCR est efficace à 100%
Où **la pente** est celle calculée pour la droite de régression de la courbe étalon, elle est égale à -3,32 lorsque la PCR est efficace à 100%.

L'efficacité est un facteur important pour la reproductibilité des résultats. Plus elle est grande, plus la PCR est robuste, ce qui est un paramètre important lorsque l'on compare des variations de faibles nombres de copies.

D. L'Analyse des données

Les valeurs brutes sont calculées par le logiciel Light®Cycler480 et sont exprimées en Cp. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport aux deux gènes contrôles précédemment cités. Les données pour lesquelles le Cp est supérieur à 30 ne sont pas traitées, les taux d'amplification sont trop faible pour pouvoir observer une variation de copie de

l'ordre de 1 ou 2. La quantification pour un gène donné est normalisée une première fois par rapport à 2 gènes de référence afin de s'affranchir d'une part de toute variation de copie qui pourrait exister au niveau de l'un de ces gènes contrôles et d'autre part des biais liés au pipetage et à la conservation de l'ADN. Une 2ème normalisation des échantillons est calculée par rapport à un calibrateur (voir paragraphe protocole d'amplification). Les calculs sont effectués par le logiciel selon l'équation mathématique précédemment citée. Une zone de normalité des valeurs a été définie de la façon suivante : moyenne de l'ensemble des valeurs de tous les échantillons +/- 2 écarts types. Les données inférieures au seuil sont dites délétées pour la région étudiée, les données supérieures au seuil sont dites dupliquées.

E. Le protocole de quantification

Les QPCR sont réalisées dans des plaques 384 puits de ce fait la distribution des réactifs dans les plaques a été effectuée par le robot pipeteur epMotion (Eppendorf). Le milieu réactionnel contenait 10ng d'ADN, 500nM d'amorces sens et antisens et 5µL de kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) dans un volume final de 10µL. Les étapes du cycle d'amplification étaient les suivantes : une dénaturation de 5min à 95°C puis 45 cycles composés d'une dénaturation de 10s à 95°C et d'une hybridation/élongation de 10s à 60°C pendant laquelle la fluorescence est mesurée, une étape finale permettant d'obtenir la courbe de fusion était toujours ajoutée en fin de réaction. Les QPCR ont été réalisées en duplicat dans un thermocycleur LightCycler®480 (Roche). Chaque expérience comportait l'étude de deux gènes de références *HEM3* et *ALB* associés à l'étude de 6 gènes cibles ce qui imposait l'étude simultanée de 24 échantillons d'ADN. Parmi les 24 échantillons étudiés, nous avions un ou deux ADN contrôles (calibrateur). Un des ADN contrôle est un mélange de 15 ADN provenant d'hommes de notre population contrôle, il a servi de référence pour l'analyse de nos données. L'autre ADN contrôle est celui que nous avons utilisé pour réaliser nos gammes étalon pour le calcul des efficacités de PCR, ce contrôle a été ajouté pour les études des gènes situés sur le chromosome X.

RESULTATS

I. Etude d'association entre un polymorphisme d'une séquence Alu et la déficience mentale.

Article accepté pour publication dans *Neuroscience letters* (Janvier 2011).

A functional tetranucleotide (AAAT) polymorphism in an *Alu* element in the *NF1* gene is associated with mental retardation.

Sylviane Marouillat Védrine[a], Patrick Vourc'h[a,b] , Refaat Tabagh[a], Laurence Mignon[c], Saskya Höfflin[a], Catherine Cherpi-Antar[a], Olivier Mbarek[a], Agathe Paubel[a], Claude Moraine[a], Martine Raynaud[a] and Christian R. Andres[a,b,*]

Petite introduction sur les séquences Alu

Le marqueur GXALu est constitué d'une séquence *Alu* associée à son extrémité 3' à une série de répétitions de tétranucléotides AAAT. L'insertion d'une séquence *Alu* dans l'intron 6 du gène *NF1* a été montré comme responsable d'un épissage alternatif avec apparition d'une codon stop prématuré (Wallace et al., 1991). Le marqueur GXALu est intronique comme la plupart des séquences *Alu*. Cette particularité a contribuée au fait que les séquences *Alu* ont longtemps été considérées comme des parasites du génome sans effet majeur sur l'expression génique. Actuellement, plusieurs observations ont montré que ces séquences avaient une influence sur le génome humain. Ainsi l'intégration de ces séquences dans les gènes peut provoquer leur inactivation et être délétère. Du fait de leur homologie de séquence, les éléments *Alu* sont à l'origine de recombinaisons homologues non alléliques (NAHR) conduisant à l'apparition de duplications ou de délétions de segments d'ADN. Une autre fonction fréquemment attribuée aux séquences *Alu* est leur capacité à réguler les gènes situés à proximité. Plusieurs études ont démontré que les séquences *Alu* pouvaient réguler la transcription des gènes en agissant sur les séquences enhancer, promotrices ou sur les sites de polyadénylation (pour revue : Tomilin N.V., 1998, Brosius J., 1999). Récemment il a été démontré un effet des séquences *Alu* sur l'expression génique au niveau postranscriptionnel. Ces séquences peuvent agir sur l'épissage des ARNm en créant des exons alternatifs qui peuvent induire la production de protéines aberrantes ou tronquées. Les séquences *Alu*

interviendraient également sur le processus de conversion des cytosines en uracyl au niveau des ARN, une anomalie dans ce processus peut jouer sur la stabilité de l'ARN. Un rôle dans la régulation de la traduction a également été rapporté (pour revue : Häsler J. et Strub K., 2006).

Notre travail

Nous rapportons ici l'étude d'association entre un polymorphisme d'un marqueur *GXAlu* localisé dans l'intron 27b du gène *NF1* et la déficience mentale. Le marqueur *GXAlu* est un microsatellite avec des répétitions AAAT en 3' d'une séquence *Alu*. Les données de la littérature rapportent 6 allèles pour ce marqueur, correspondant à 11, 10, 9, 8, 7 et 6 répétitions AAAT. Notre équipe a montré que l'allèle 5 (6 répétitions) était présent uniquement chez des patients autistes (Mbarek *et al.*, 1999) qui par ailleurs présentaient un retard mental profond et que l'allèle 4 (7 répétitions) de ce marqueur était présent chez des patients autistes ayant un retard mental profond (thèse de Mbarek O., 1999).

Le gène *NF1* est localisé en 17q11.2, région de susceptibilité dans l'autisme et la déficience mentale. Le gène *NF1* code la neurofibromine qui interagit avec les protéines de la famille Ras dont la protéine H-Ras. Un retard mental est associé à la neurofibromatose de type 1 dans 7% des cas et plus particulièrement chez les patients ayant une délétion dans le gène *NF1*.

L'intron 27b du gène *NF1* a la particularité de contenir 3 gènes *EVI-2A*, *EVI-2B* et *OMGP* qui sont transcrits en sens inverse du gène *NF1* (Figure 24). Les gènes *EVI-2A* et *2B* seraient des sites d'intégration de virus écotropes, et le gène *OMGP* est un inhibiteur de la croissance axonale et un régulateur de la neurogénèse (Wang *et al.*, 2002, Martin *et al.*, 2009).

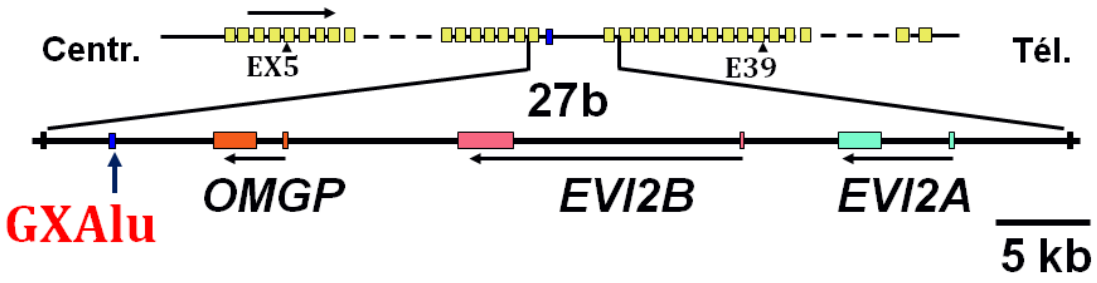


Figure 24 : Schéma du gène *NF1* (haut) et grossissement de l'intron 27b (bas).

Nous avons étudié la répartition allèlique du marqueur *GXAlu* dans une population de 68 patients ayant une déficience mentale non syndromique ainsi que chez 89 sujets sains. Pour cela nous avons développé une méthode de génotypage par dHPLC. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une association positive entre l'allèle 4 du marqueur étudié et la déficience mentale (Chi2=10,34 ; p=0,015). Afin de mettre en évidence un possible effet fonctionnel du polymorphisme de ce marqueur, nous avons cloné chaque allèle dans un vecteur d'expression en amont du promoteur contrôlant l'expression du gène *CAT* (chloramphénicol acétyl transférase). Les analyses fonctionnelles du marqueur *GXAlu* par RT-PCR quantitative ont ainsi révélé une augmentation de l'expression du gène *CAT* en présence des allèles 4 et 5 du marqueur *GXALu*.

Nos résultats montrent une association entre l'allèle 4 du marqueur *GXAlu* et la pathologie, cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Neuroscience letters*. La pathologie semblerait être directement liée à cet allèle cependant des études complémentaires sur un plus grand nombre de patients devront être réalisées pour confirmer ces premiers résultats. Le marqueur *GXAlu* pourrait réguler l'expression des gènes situés à proximité notamment le gène *OMGP*, déjà associé à l'autisme par notre équipe (Vourc'h *et al*., 2003).

A functional tetranucleotide (AAAT) polymorphism in an *Alu* element in the *NF1* gene is associated with mental retardation

Sylviane Marouillat Védrine[a], Patrick Vourc'h[a,b], Refaat Tabagh[a], Laurence Mignon[c], Saskya Höfflin[a], Catherine Cherpi-Antar[a], Olivier Mbarek[a], Agathe Paubel[a], Claude Moraine[a], Martine Raynaud[a], Christian R. Andres[a,b,*]

[a] UMR INSERM U930, CNRS ERL 3106, Université François Rabelais de Tours, Tours, France
[b] Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, CHRU de Tours, Tours, France
[c] Media in Science and Technology, Encinitas, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 November 2010
Received in revised form
30 December 2010
Accepted 6 January 2011

Keywords:
Non-syndromic mental retardation
Association study
Neurofibromatosis type 1
Non-denaturing HPLC
CAT

ABSTRACT

Mental retardation (MR) is frequent in neurofibromatosis type 1 (NF1). Allele 5 of a tetranucleotide polymorphism in an Alu element (GXAlu) localized in intron 27b of the *NF1* gene has previously been associated with autism. We considered that the microsatellite GXAlu could also represent a risk factor in MR without autism. We developed a rapid method for genotyping by non-denaturing HPLC and assayed the allelic variation of GXAlu marker on *in vitro* gene expression in Cos-7 cells. A French population of 157 individuals (68 non syndromic non familial MR (NS-MR) patients diagnosed in the University Hospital of Tours; 89 controls) was tested in a case-control assay. We observed a significant association ($\chi^2 = 7.96$; $p = 0.005$) between alu4 carriers (7 AAAT repeats) and MR (OR: 7.86; 95% C.I.: 2.13–28.9). The relative *in vitro* expression of a reporter gene encoding chloramphenicol acetyl transferase (CAT) was higher for alu4 and alu5, suggesting a regulation effect for these alleles on gene expression *in vivo*. Our results showed an association with a polymorphism regulating the *NF1* gene or other genes during brain development.

© 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Mental retardation (MR) is a neurodevelopmental disorder characterized by an intelligence quotient (IQ) below 70 with impairments in social skills, self-care, and work. Non syndromic-MR (NS-MR) is estimated to affect 2% of the population in developed countries. To date, more than 90 X-linked genes have been implicated in NS-MR and many more genes remain to be identified [5]. It is likely that an important number of autosomal genes are also involved in NS-MR [19]. Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a neurocutaneous disorder with a prevalence of approximately 1 in 3000 people [4]. It is caused by point mutations or deletions of *NF1* (17q11.2), a tumor suppressor gene (Genebank accession number AY7963.05.1). Both nonverbal and verbal learning disabilities are present in 30–65% of children with NF1 [20]. Deficits in IQ, attention, executive function, and motor skills have been well documented in NF1 patients [6]. 5–10% of patients, neurofibromatosis type 1 results from microdeletions that encompass the entire *NF1* gene (containing three small genes: *OMG*, *EVI2A* and *EVI2B* genes) and a variable number of flanking genes [16]. MR is particularly present in *NF1* microdeleted patients. These observations suggest that abnormalities in the expression or function of *NF1* or other genes in the deleted region may be implicated in NS-MR [8]. We have previously shown that a particular allele of a tetranucleotide repeats polymorphism (GXAlu) in an Alu sequence in intron 27b of the *NF1* gene was associated with autism, a neurodevelopmental disorder characterized by MR in 70% of cases [11]. In the present study, we analyzed the distribution of this polymorphism in a French population with NS-MR using a new non-denaturing HPLC (high pressure liquid chromatography) protocol. Human transcription factors binding sites (TFBS) derived from repetitive DNA sequences including Alu sequences could have regulatory effects on the human genome and especially on species-specific regulatory phenotype [18]. Tetranucleotide repeats have been demonstrated to act as a transcriptional regulatory element on the tyrosine hydroxylase gene for example [12]. Thus, we studied a possible effect of the different alleles of the GXAlu polymorphism on the expression of a reporter gene in an *in vitro* system.

Subjects. Patients with NS-MR and aged from 2 to 16 years old at the time of evaluation (ratio male:female, 7:2) were recruited in the genetics unit of the university Hospital of Tours (France) and were diagnosed as NS-MR (DSMIV) by an experimented clinician (C. Moraine). Brunet–Lezine psychomotor development test, behavior rating scale and DSM-IV were used to evaluate develop-

* Corresponding author at: Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, CHRU de Tours, 2 boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel.: +33 2 34 37 89 10; fax: +33 2 34 37 86 13.
E-mail address: andres@med.univ-tours.fr (C.R. Andres).

0304-3940/$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.
doi:10.1016/j.neulet.2011.01.019

UNCORRECTED PROOF

Table 1
List of primers used for cloning, DHPLC and real-time RT-PCR experiments.

Primers (5′–3′)	Sequences (5′–3′)	Tm (°C)	PCR product sizes (bp)
Cloning; sequencing			
GXAlu-F	CAAGAAAAGCTAATATCGGC	52	392–408
GXAlu-R	GGAACCTTAAGTTCACTTAG	52	
DHPLC			
alu-F	GATCGCACCACTGCATTCTA	60	138–154
alu-RI	GTTCACTTAGAAACAAGCAA	60	
alu-F1	AGCCAAGATCGCACCACTGCATTCTA	60	
alu-R	CCTTAAGTTCACTTAGAAACAAGCAA	60	
Real-time RT-PCR			
cat F	TCCGGCCTTTATTCACATTC	60	168
cat R	TCGTCGTGGTATTCACTCCA	60	
gal F	AGCTGGCGTAATAGCGAAGA	60	150
gal R	GACAGTATCGGCCTCAGGAA	60	

mental quotient and autistic behaviors [1,2]. Patients with autism were excluded. All patients showed moderate to severe NS-MR and were submitted to a careful clinical examination searching for signs occurring in known specific syndromic mental retardation. Patients were French Caucasian individuals and had no familial history of MR and were thus considered sporadic. All patients tested negative for fragile X mutation (FRAXA). All patients, or their parents, gave their informed consent. The control group consisted of anonymous and unrelated French Caucasian individuals without MR. DNA was extracted from peripheral blood sample using a standard protocol.

Cloning and sequencing. GXAlu marker was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers GXAlu-F and GXAlu-R (Table 1). PCR products (392–408 bp, depending of the GXAlu alleles) were sub-cloned in a pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) before DNA sequencing on a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) to identify the allelic forms and their orientations (sense or antisense). The pCR2.1-TOPO vectors were double digested (KpnI, XhoI) and the resulting GXalu inserts were cloned in a pCAT3-promoter® vector (Promega, Madison, WI, USA) into a KpnI/XhoI site before sequencing.

Genotyping by non-denaturing HPLC. PCR was performed in 25 µL reaction volume containing 10 pmol of alu-F/alu-R primers (Table 1), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 125 µM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1× buffer, and 25 ng of DNA from patients or 50 ng of plasmids (alu1 to alu5). Amplification included an initial 94 °C denaturation step followed by 35 cycles at 94 °C for 15 s, 60 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. Two external standards (128 bp and 156 bp) were generated by amplification of alu1 (10 repeats) insert (plasmid) with primers alu-F1/alu-R, and alu5 (6 repeats) insert (plasmid) with primers alu-F/alu-R1 (Table 1). An internal sizing standard (ladder; alu5 138 bp to alu1 150 bp) was obtained by mixing 10 µL of both external standards and 10 µL of all alu inserts (plasmids containing alu1 to 5) separately amplified with primers alu-F/alu-R. Samples to be analyzed by non-denaturing HPLC consisted in 20 µL of PCR products mixed with 10 µL of both external standards. Seven µL of ladder or patient samples were injected in the WAVE DHPLC System, DNAsep cartridge and UV measure at 260 nm, (from Transgenomic Inc., Ohama, NE, USA) using a constant oven temperature of 50 °C, which is recommended for double strand DNA analysis in WAVEMAKER software (Transgenomic Inc., Ohama, NE, USA). The mobile phase consisted in Wave Optimised buffer A containing 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) (Transgenomic Inc., Ohama, NE, USA). PCR products were eluted at a flow rate of 0.9 mL/min using a gradient (40–72%; Universal linear program, WAVE System) of buffer B (0.1 M TEAA, 25% acetonitrile). Data were analyzed using the Navigator 1.5.3 software (Transgenomic Inc., Ohama, NE, USA). The adjustment of all chromatograms on the peaks of the external standards enabled easy software evaluation of Alu genotyping. Patients with various genotypes of GXAlu characterized by direct sequencing were used as external controls for non-denaturing HPLC analysis. The χ^2 test was used to analyze data between the control and MR groups

Cell culture and transfection. Cos7 cells (fibroblasts) were cultured in DMEM medium supplement with 10% foetal calf serum. Transfection of Cos7 cells was performed by electroporation using a rat neural stem cells Nucleofector kit® (Lonza, Basel, Swiss) according to the manufacturer protocol. Cells were suspended in Nucleofector solution (10^6 cells/mL) and co-transfected by one of the pCAT3 promoter vectors (1 µg; GXAlu allele in sense or antisense orientation) and a control pSV-B-galactosidase vector (1 µg; Promega, Madison, WI, USA). pCAT3-promoter without insert was used as control. Transfected cells were seeded at 10^4 cells/well in 6-well plates and incubated for 72 h before RNA extraction.

Real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from cell cultures using Trizol. After a DNase I treatment, a reverse transcription was performed on 500 ng of total RNA using Superscript II® (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time PCR amplification was performed on a LightCycler480 (Roche, Basel, Swiss) using 96-well plates. Each sample was analyzed in duplicate in a 25 µL reaction mixture: 25 ng of cDNA template, 12.5 µL Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 400 nM of primers cat-F/cat-R (reporter gene chloramphenicol acetyl transferase: CAT) or gal-F/gal-R (beta-galactosidase gene, Table 1). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used for analysis.

DHPLC is mainly used for rapid DNA mutation analysis. We developed a rapid and simple protocol for microsatellite genotyping by non-denaturing HPLC. We first generated two external

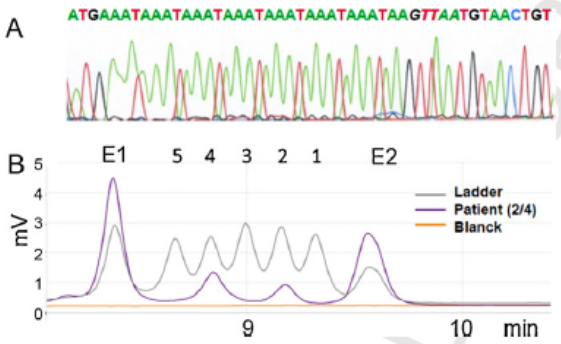


Fig. 1. Analyze of GXAlu alleles by non denaturing HPLC. (A) Electrophoregram of the alu4 sequence (7 AAAT repeats) with a putative binding site (*GTTAA*) for the transcription factor HNF1A. The tetranucleotide repeats of AAAT in the GXAlu sequence start at position 197979 of the NF1 gene (Genebank accession number AY7963.05.1). (B) HPLC chromatogram of the ladder and a patient sample (GXAlu genotype: alu2/alu4). Peaks elution times of GXAlu alleles were normalized using the two external standard peaks E1 (132 bp) and E2 (160 bp).

Table 2
Genotype and allele frequencies of GXAlu in MR and control groups. The χ^2 for the genotypes was calculated for one allele carrier versus the other.

	Controls		MR patients		χ^2	p
	Numbers	Frequencies (%)	Numbers	Frequencies (%)		
Alleles (size, bp)						
Alu1 (154)	17	9.55	17	12.50	12.56	0.005
Alu2 (150)	110	61.80	79	58.09		
Alu3 (146)	49	27.53	28	20.59		
Alu4 (142)	2	1.12	12	8.82		
Genotypes						
Alu1 carriers	16	11.68	17	14.78	0.529	0.467
Alu2 carriers	76	55.47	59	51.30	0.437	0.509
Alu3 carriers	43	31.39	27	23.47	1.949	0.163
Alu4 carriers	2	1.46	12	10.43	7.96	0.005

standards to overcome inappropriate sizing of alleles caused by slight time shifting between HPLC runs (Fig. 1A, B). The sizes of these external standards (PCR products of 128 and 156 bp) were −6 bp compared to alu5 allele and +6 bp compared to alu1 allele. The number of tetranucleotide repeats in PCR products from patients were determined by running a ladder consisting in a mixture of all alu alleles (alu1 to alu5) and external standards in parallel (Fig. 1B).

We used our non-denaturing HPLC protocol to genotype the GXAlu tetranucleotide repeats polymorphism in an MR and control population. We did not observe the alu5 allele (6 AAAT repeats) that we previously described in four autistic patients [11] in either of these two populations. Moreover we did not find the rare alu0 allele (11 AAAT repeats) previously observed in two control individuals and in one MR patient [8]. Distribution of GXAlu alleles followed the Hardy–Weinberg law in the control and NS-MR groups. We compared the GXAlu alleles distribution between controls and NS-MR (Table 2), and observed a significant difference ($\chi^2 = 12.56$; df = 3; $p = 0.005$). Furthermore, we showed an association between carriers of alu4 allele (7 AAAT repeats) (all individuals were heterozygous) and MR ($\chi^2 = 7.96$; $p = 0.005$, with a corrected significance of 0.05/4 = 0.013). The odds ratio (OR) was 7.86 (95% C.I.: 2.13–28.9). Mean developmental quotient of patients carrying GXAlu allele 4 was 43 ± 21.

We assayed the ability of the GXAlu alleles to affect gene expression *in vitro*. GXAlu repeats were inserted, in sense and antisense orientations, upstream of an SV40 promoter of a CAT reporter gene in pCAT3 promoter vector. Theses constructs were transiently transfected into Cos-7 cells. The relative expression of CAT gene measured by real-time RT-PCR 72 h after transfection was higher for alu4 and alu5 alleles both in sense and antisense orientations, although it only reached significance for alu5 in the sense orientation (Fig. 2A). The alu4 reached significance in both orientations (Fig. 2A, B).

In this study, we described a genotyping protocol for microsatellites by non-denaturating HPLC. PCR amplification of short polymorphic repeats often generates artifacts called shadow bands on electrophoresis gel. These artifacts are the consequence of Taq DNA polymerase slippage during DNA amplification [15]. These shadow molecules in our PCR products were not visible on HPLC chromatograms, and thus did not interfere in the determination of the GXAlu alleles. Altogether, the present protocol of microsatellite genotyping by non-denaturing HPLC is rapid, efficient, and cost-effective when compared to the frequently used direct DNA sequencing or DNA sizing using fluorescent primers.

We observed an association between NS-MR and the alu4 carriers. We have previously shown that the distribution of this allele was not different in a French population of control and autistic patients [11]. In the present study on NS-MR, we did not observe the alu5 allele that we had previously found in few autistic patients [11]. MR is frequently associated to autism and several genes are mutated in MR with or without autism [14]. Autistic patients carrying alu5 allele in our previous study displayed development quotients <35. All these data suggest that alu4 allele is a risk factor in MR, and alu5 allele a risk factor in autism associated with MR.

The presence of the alu4 allele in a subgroup of MR patients could result from a linkage disequilibrium between this allele and a mutation in the region of GXAlu, a microsatellite located in intron 27b of the *NF1* gene. The locus associated with MR could either be the *NF1* gene itself or one of the three genes, *OMG*, *EVI2A* and *EVI2B* located within intron 27b and transcribed from the opposite strand [7,22]. Another possibility is that the GXAlu locus might itself modulate the expression of a particular gene in this region.

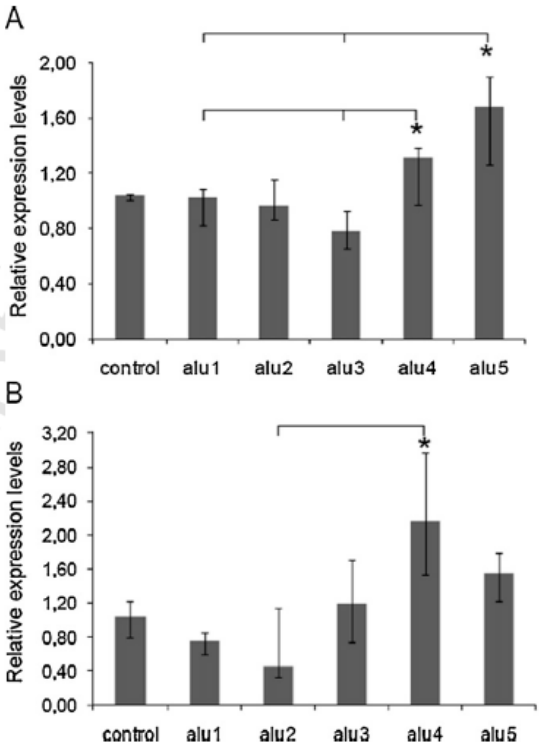


Fig. 2. Effect of GXAlu alleles on CAT gene expression. The relative expression of CAT gene in Cos-7 cells was measured by real time RT-PCR 72 h after a co-transfection by pCAT3 promoter vector (containing one of the GXalu alleles in sense (A) or antisense (B) orientations) and the pSV-B-galactosidase vector (at least six different experiments for all constructs). The expression of beta galatosidase gene was used for standardization. Values were analyzed using a Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test (*$p < 0.05$).

PROOF

Indeed several studies have demonstrated that Alu sequences or tetranucleotide repeats are capable of regulating gene expression [12,13,17]. We searched for transcription factor binding sites in the repeat region of GXAlu using the Match prediction software [9]. A putative binding site for the transcription factor HNF1A (homeodomain containing hepatocyte nuclear factor 1 alpha) starts 3 nucleotides 3′ of the last AAAT repeat (Fig. 1A). This transcription factor is expressed in a large number of tissues including the nervous system (BioGPSportal). Our *in vitro* analysis in a non-human primate cell line (Cos-7) supports an effect of alu4 and alu5 alleles on gene expression, and these two alleles may be able to modify the level of expression of adjacent genes. Thus this is the first demonstration that a tetranucleotide repeat in an Alu sequence could regulate gene expression. Further experiments in human neural cell lines will be necessary to confirm our observation and to precise which gene could be regulated by the Alu sequence. The *OMG* gene is the most interesting gene because three mutations have been found in its coding sequence in Italian patients with NS-MR, and it is the closest gene to GXAlu (3 kb from GXAlu) [21]. *OMG* is a developmentally regulated gene in the brain which encodes the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) [23]. OMgp is linked to the external membrane of neurons and oligodendrocytes and acts as an inhibitor of neural stem cell proliferation and on the inhibition of neurite outgrowth [10,24]. *EVI2A* and *EVI2B* are the human homologs of mouse genes, *Evi-2A* and *Evi-2B*, implicated in retrovirus-induced murine myeloid tumors. They may act as oncogenes [3].

MR is believed to result from several causes including environmental and genetic factors. Non syndromic sporadic cases of MR still represent a challenge for clinicians and researchers. The genetic models commonly proposed in these situations are neomutations (punctual or CNVs), classical mendelian models with low penetrance, or more complex models involving imprinting for example. We explored the hypothesis of a genetic risk factor in a polygenic model and found an association with a potential regulatory polymorphism. While promising, this possibility needs to be replicated on other MR populations.

Acknowledgements

We thank INSERM, Université François Rabelais de Tours and the Fondation Jérôme Lejeune for financial support and PPF "Analyses des Systèmes Biologiques" Université François Rabelais de Tours.

References

[1] C. Barthelemy, S. Roux, J.L. Adrien, L. Hameury, P. Guerin, B. Garreau, J. Fermanian, G. Lelord, Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale, J. Autism Dev. Disord. 27 (1997) 139–153.
[2] O. Brunet, I. Lezine (Eds.), Echelle de developpement psychomoteur de la première enfance, PUF, Paris, 1976.
[3] R.M. Cawthon, L.B. Andersen, A.M. Buchberg, G.F. Xu, P. O'Connell, D. Viskochil, R.B. Weiss, M.R. Wallace, D.A. Marchuk, M. Culver, et al., cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene, Genomics 9 (1991) 446–460.
[4] J.M. Friedman, Epidemiology of neurofibromatosis type 1, Am. J. Med. Genet. 89 (1999) 1–6.
[5] J. Gecz, C. Shoubridge, M. Corbett, The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X, Trends Genet. 25 (2009) 308–316.
[6] S.L. Hyman, A. Shores, K.N. North, The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1, Neurology 65 (2005) 1037–1044.
[7] D.E. Jenne, S. Tinschert, H. Reimann, W. Lasinger, G. Thiel, H. Hameister, H. Kehrer-Sawatzki, Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions, Am. J. Hum. Genet. 69 (2001) 516–527.
[8] L.M. Kayes, W. Burke, V.M. Riccardi, R. Bennett, P. Ehrlich, A. Rubenstein, K. Stephens, Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients, Am. J. Hum. Genet. 54 (1994) 424–436.
[9] A.E. Kel, E. Gossling, I. Reuter, E. Cheremushkin, O.V. Kel-Margoulis, E. Wingender, MATCH: a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences, Nucleic Acids Res. 31 (2003) 3576–3579.
[10] I. Martin, C.R. Andres, S. Vedrine, R. Tabagh, C. Michelle, M.L. Jourdan, N. Heuze-Vourc'h, P. Corcia, A. Duittoz, P. Vourc'h, Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells, Brain Res. 1284 (2009) 22–30.
[11] O. Mbarek, S. Marouillat, J. Martineau, C. Barthelemy, J.P. Muh, C. Andres, Association study of the NF1 gene and autistic disorder, Am. J. Med. Genet. 88 (1999) 729–732.
[12] R. Meloni, V. Albanese, P. Ravassard, F. Treilhou, J. Mallet, A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro, Hum. Mol. Genet. 7 (1998) 423–428.
[13] A.J. Mighell, A.F. Markham, P.A. Robinson, Alu sequences, FEBS Lett. 417 (1997) 1–5.
[14] C. Moraine, F. Bonnet-Brilhault, F. Laumonnier, M. Gomot, Could autism with mental retardation result from digenism and frequent de novo mutations? World J. Biol. Psychiatry 10 (2009) 1030–1036.
[15] M. Olejniczak, W.J. Krzyzosiak, Genotyping of simple sequence repeats—factors implicated in shadow band generation revisited, Electrophoresis 27 (2006) 3724–3734.
[16] E. Pasmant, A. Sabbagh, G. Spurlock, I. Laurendeau, E. Grillo, M.J. Hamel, L. Martin, S. Barbarot, B. Leheup, D. Rodriguez, D. Lacombe, H. Dollfus, L. Pasquier, B. Isidor, S. Ferkal, J. Soulier, M. Sanson, A. Dieux-Coeslier, I. Bieche, B. Parfait, M. Vidaud, P. Wolkenstein, M. Upadhyaya, D. Vidaud, NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype, Hum. Mutat. 31 (2010) E1506–1518.
[17] F.J. Piedrafita, R.B. Molander, G. Vansant, E.A. Orlova, M. Pfahl, W.F. Reynolds, An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element, J. Biol. Chem. 271 (1996) 14412–14420.
[18] N. Polavarapu, L. Marino-Ramirez, D. Landsman, J.F. McDonald, I.K. Jordan, Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA, BMC Genomics 9 (2008) 226.
[19] H.H. Ropers, Genetics of intellectual disability, Curr. Opin. Genet. Dev. 18 (2008) 241–250.
[20] T.L. Rosser, R.J. Packer, Neurocognitive dysfunction in children with neurofibromatosis type 1, Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 3 (2003) 129–136.
[21] M. Venturin, S. Moncini, V. Villa, S. Russo, M.T. Bonati, L. Larizza, P. Riva, Mutations and novel polymorphisms in coding regions and UTRs of CDK5R1 and OMG genes in patients with non-syndromic mental retardation, Neurogenetics 7 (2006) 59–66.
[22] D. Viskochil, R. Cawthon, P. O'Connell, G.F. Xu, J. Stevens, M. Culver, J. Carey, R. White, The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene, Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 906–912.
[23] P. Vourc'h, C. Andres, Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp): evolution, structure and function, Brain Res. Brain Res. Rev. 45 (2004) 115–124.
[24] L. Wang, H. Hu, C. Zhang, X. Li, D. Tao, F. Chen, Isolation, cultivation and identification of neural stem cell from human embryonic CNS, Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 19 (2002) 264–267.

II. Approche gène candidat : NLGN4X et autisme

Article publié dans *Biological Psychiatry* 2009, 66(10): 906-10. (2009)

Autism and nonsyndromic mental retardation associated with a de novo mutation in the NLGN4X gene promoter causing an increased expression level.

Daoud H, Bonnet-Brilhault F, Vedrine S, Demattei MV, Vourc'h P, Bayou N, Andres CR, Barthelemy C, Laumonnier F, Briault S.

Le gène *NLGN4X* localisé en Xp22, a été impliqué dans l'autisme par plusieurs auteurs.

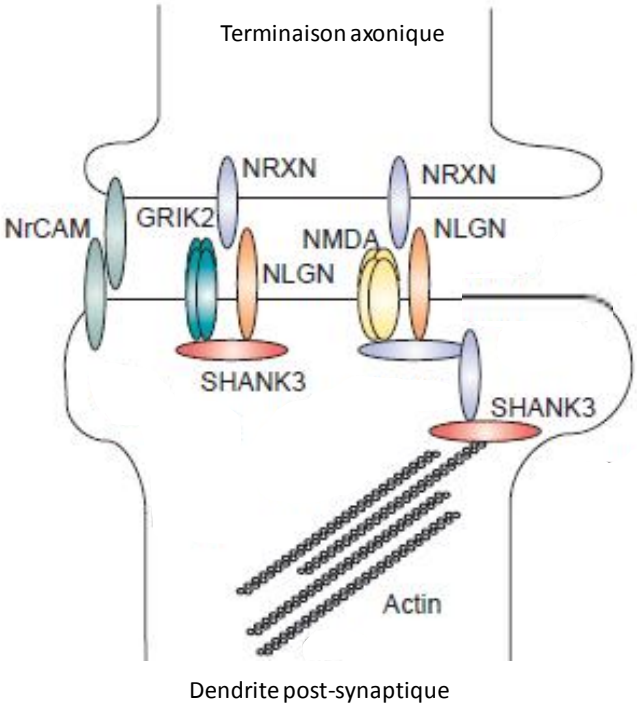


Figure 25 : Localisation des NLGN3 et NLGN4 au niveau d'une synapse glutamatergique. Les neuroliguines (NLGN), neurexines (NRXN) et NrCAM sont des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans la formation des synapses et les interactions cellule/cellule. GRIK2 et NMDA sont des sous-unités du récepteur au glutamate (adapté de Antonio M. Persico et Thomas Bourgeron, 2006).

Ainsi chez deux frères, l'un atteint d'autisme et l'autre du syndrome d'Asperger, une insertion entrainant l'apparition prématurée d'un codon stop dans le gène *NLGN4X* a été identifiée (Jamain *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont également été observés par notre équipe dans une famille multiplexe, où plusieurs garçons autistes avec ou sans retard mental associé présentaient la même mutation dans ce gène (Laumonnier *et al.*, 2004). Les neuroliguines sont des molécules d'adhésion cellulaire localisées au niveau de la membrane post-synaptique des neurones (Figure 25). Ces molécules si elles ne sont pas indispensables à la formation des synapses sont cependant cruciales pour le fonctionnement des réseaux neuronaux. Depuis ces premières études, d'autres mutations ont été identifiées mais ces altérations sont toujours différentes d'une famille à l'autre et restent rares.

Notre équipe s'est intéressée à l'étude de l'effet fonctionnel des mutations dans les régions régulatrices du gène *NLGN4X*. Pour cela l'analyse par séquençage des séquences régulatrices et des séquences codantes du gène *NLGN4X* a été réalisée chez 96 patients autistes.

Une mutation *de novo* (-335G>A) a été identifiée dans la région promotrice chez un patient autiste présentant un retard mental profond.

Ma contribution à ce travail a été d'étudier l'effet fonctionnel de cette mutation, en analysant le taux de transcrit *NLGN4X* par RT-PCR quantitative. Le niveau d'expression du gène a été mesuré par RT-PCR quantitative à partir d'ARNs extraits de lignées lymphoblastoïdes. Les niveaux d'expression du patient, des contrôles et des parents du patient, ont été comparés. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation du taux de transcrit *NLGN4X* chez le patient (x 2,5) par rapport aux contrôles ainsi qu'à son père. Ces résultats ont été confirmés par des tests d'expression et de retard sur gel réalisés au laboratoire. Sous le contrôle du promoteur du gène *NLGN4X* muté l'expression est augmentée de deux fois par rapport à l'effet du promoteur non muté.

Ces résultats impliquent une nouvelle fois le gène *NLGN4X* dans l'autisme et la déficience mentale. Cependant pour la première fois un effet fonctionnel est rapporté en liaison avec la mutation du gène. Les résultats de cette étude suggèrent qu'il pourrait y avoir une surexpression de la protéine NLGN4 au niveau des structures synaptiques. Ces résultats vont dans le sens de plusieurs études relatant qu'une surexpression de NLGN4 pourrait être responsable d'autisme et/ou de déficience mentale et d'altération des fonctions cérébrales.

RESEARCH REPORT

Autism and Nonsyndromic Mental Retardation Associated with a De Novo Mutation in the *NLGN4X* Gene Promoter Causing an Increased Expression Level

Hussein Daoud, Frédérique Bonnet-Brilhault, Sylviane Védrine, Marie-Véronique Demattéi, Patrick Vourc'h, Nadia Bayou, Christian R. Andres, Catherine Barthélémy, Frédéric Laumonnier, and Sylvain Briault

Background: Pathogenic mutations in the X-linked *Neuroligin 4* gene (*NLGN4X*) in autism spectrum disorders (ASDs) and/or mental retardation (MR) are rare. However, nothing is known regarding a possible altered expression level of *NLGN4X* that would be caused by mutations in regulatory sequences. We investigated this issue by analyzing these regions in patients with ASDs and no mutation in the *NLGN4X* coding sequence.

Methods: We studied 96 patients who met all DSM-IV criteria for autism. The entire coding sequence and the regulatory sequences of the *NLGN4X* gene were analyzed by polymerase chain reaction and direct sequencing.

Results: We identified a de novo 1 base pair (−335G>A) substitution located in the promoter region in a patient with autism and nonsyndromic profound MR. Interestingly, this variation is associated with an increased level of the *NLGN4X* transcript in the patient compared with male control subjects as well as his father. Further in vitro luciferase reporter and electrophoretic mobility shift assays confirmed, respectively, that this mutation increases gene expression and is probably caused by altered binding of transcription factors in the mutated promoter sequence.

Conclusions: This result brings further insight about the phenotypic spectrum of *NLGN4X* mutations and suggests that the analysis of the expression level of *NLGN4X* might detect new cases.

Key Words: Autism, mental retardation, *NLGN4X*, overexpression, regulatory sequences

Autism (MIM 209850) is a complex neurodevelopmental disorder characterized by impaired reciprocal social interaction and communication and markedly restricted repertoire of activities and interests (1). Twin and family studies suggested the existence of a strong genetic background for this condition (1). The high frequency of affected male subjects in autism would suggest the involvement of X-linked genes (2). This hypothesis has been reinforced by several observations in which truncating mutations in the *Neuroligin 4X* gene (*NLGN4X*) (MIM 300427) were associated with autism spectrum disorders (ASDs) and/or mild mental retardation (MR) (3,4). These findings indicate that some autism cases might result from mutations with a Mendelian transmission and that similar truncating *NLGN4X* mutations result in a wide variety of phenotypes. Subsequent mutational analyses in more than 400 patients showed that mutations in the coding sequence of the *NLGN4X* gene seem to be rare in the autistic population (5–9).

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U930) (HD, FB-B, SV, PV, CRA, CB, FL, SB); Université François-Rabelais (HD, FB-B, SV, M-VD, PV, CRA, CB, FL, SB); Centre Hospitalier universitaire de Tours (FB-B, PV, CRA, CB); CNRS (M-VD), Tours; Centre Hospitalier Régional (S), Laboratoire de Génétique Chromosomique, Orléans, France; and the Service des maladies congénitales et héréditaires (NB), Hôpital Charles Nicole, Tunis, Tunisia.

Address correspondence to Hussein Daoud, Ph.D., INSERM U930, Université François-Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France; E-mail: daoud_h@med.univ-tours.fr.

Received May 12, 2008; revised May 6, 2009; accepted May 8, 2009.

0006-3223/09/$36.00
doi:10.1016/j.biopsych.2009.05.008

Recently, the phenotypes spectrum associated with *NLGN4X* mutations has been enlarged with the description of a family with autism, severe MR, and Tourette syndrome caused by an interstitial gene deletion probably leading to a truncated protein (10).

To further investigate the potential contribution of *NLGN4X* gene mutations in ASDs, we have screened by direct sequencing the entire coding sequence as well as promoter and 3′ untranslated (3′ UTR) regions in 96 individuals diagnosed with ASDs.

Methods and Materials

Subjects

Autistic patients (80 male subjects and 16 female subjects) were recruited through the Child Psychiatry Center at the University Hospital of Tours (France) by a multidisciplinary team. All patients were Caucasians. Written informed consent was obtained from parents. Exclusion criteria included: severe sensory problems (e.g., visual impairment or hearing loss); significant motor impairments (e.g., failure to sit by 12 months or walk by 24 months); and identified metabolic, genetic, or progressive neurological disorders. Genetic disorders have been excluded by clinics and cytogenetics. Patients with FRAXA mutation were excluded.

Mutation Analysis of *NLGN4X* Gene

Genomic DNA was extracted from lymphoblastoid cell lines (LCLs) with the Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as per manufacturer's instructions. The entire coding sequence as well as 1 kilobase pair of the promoter and 3′ untranslated regions of the *NLGN4X* gene were analyzed (primer sequences and amplification conditions are available upon request). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed with the GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin). The PCR products were verified by agarose gel electrophoresis. Amplifications abnormalities were confirmed in a sec-

© 2009 Society of Biological Psychiatry

ond independent PCR. Purified products were run on an automated sequencer (XL3130 BioAnalyzer; Applied Biosystems, Foster City, California).

Real-Time Reverse Transcription PCR

Total RNA was extracted from LCLs with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California). The RNA concentrations were determined by ultraviolet spectrophotometry, and integrity was verified by agarose gel electrophoresis. One microgram of DNAse-treated RNA from each sample was used to generate complementary DNA (cDNA) with the Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Primers were designed to amplify a 214-base pair (bp) fragment of the *NLGN4X* cDNA with a forward primer in exon 4 and a reverse primer in exon 5. The *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (*GAPDH*) cDNA real-time amplification was used for normalization, and the relative expression levels were calculated with the δ-δ Ct method (11).

Luciferase Assays

To assess the consequence of the 1-bp substitution on gene expression, 715 bp from wild-type and mutated promoter region were subcloned into the HindIII/NheI sites of the pGL4.10(*luc2*) promoter-less vector (Promega), which contains the firefly luciferase gene (F-luc). Human embryonic kidney (HEK) 293T cells plated in 96-well format (2.10^4 cells/well) were transiently transfected with Exgen500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) with 80 ng of pGL4.10(*luc2*) and 40 ng of pGL4.74(*hRluc*/TK) Renilla vector (containing the Renilla luciferase [R-luc]) to serve as an internal control for transfection efficiency. Luciferase assays using the Dual-glo luciferase assay system (Promega) were performed 24 hours after transfection. Sixty microliters of Dual-Glo Luciferase reagent were added to the 60 μL of culture medium and incubated for 30 min. The F-luc luminescence was measured. Before measuring of R-luc, 60 μL of the Stop-and-Glo reagent were added to each well to quench the F-luc reaction. The R-luc luminescence was measured after an incubation of 30 min. Results were expressed as F-luc/R-luc means ± SEM.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

All reactions included double-stranded, ^{32}P-labeled, oligonucleotide probes corresponding to wild-type or mutated *NLGN4X* promoter nucleotides −357 to −30. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed on human adult brain nuclear proteins (Biochain, Hayward, California). Nuclear protein extract (8 μg) was incubated at room temperature with or without 100× molar excess unlabeled competitor probe and bovine serum albumin for 30 min before addition of ^{32}P-labeled probe, then incubated an additional 20 min at room temperature before loading on a 6% nondenaturing acrylamide gel. After migration, the gel was exposed for 10 hours and revealed with the Storm gel imaging system (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom).

Results

We did not detect any mutation or polymorphism in the *NLGN4X* coding sequence of all patients. However, we identified a 1-bp substitution G>A located in the promoter region sequence 335 bp upstream from the transcription initiation site in a boy with autism and profound MR (Figure 1). The sequence variation has been confirmed in a second independent PCR with genomic DNA extracted from peripheral blood. This variation occurred de novo, and a paternity test using different independent and informative markers excluded false paternity (data not shown). Lastly, this variation was absent in 450 normal X chromosomes as well as in the expressed sequence tags or single nucleotide polymorphisms databases.

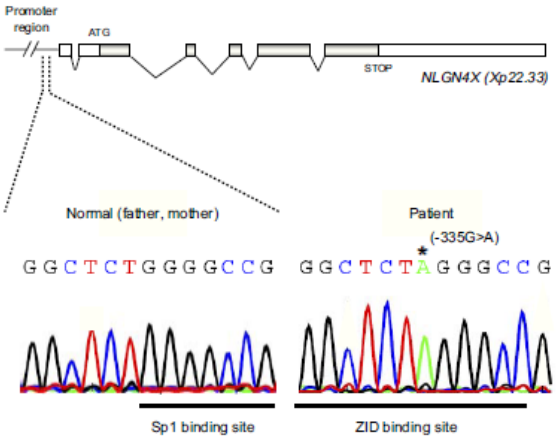


Figure 1. Sequencing analysis of the *NLGN4X* gene promoter region in the patient. Representation of the normal and variant nucleotide sequences between the bases −341 and −329 upstream from the transcription start site of the *NLGN4X* gene (NM_020742). Modifications involving transcription factors binding sites on the promoter region with MatInspector and Match prediction software are indicated (horizontal bars). The −335G>A substitution is predicted to suppress an SP1 binding site (ggGGCCGtgt) and to create a Zing finger protein with Interaction Domain (ZID) binding site (cGGCTCtagggcc). *Identification of a de novo 1-base pair substitution (−335G>A) in the patient; this variation was not found in his parents or 450 control X chromosomes.

This patient has no particular familial history of pervasive developmental disorders or psychiatric history. He had a history of a preterm birth at 36 weeks of amenorrhea with birth weight at 2350 g, height at 47.5 cm, and head circumference at 32 cm (−2 SD). There was an accelerated increase in head circumference with 44 cm at 7 months (+1 SD), 46.5 cm at 1 year (+1 SD), and 50 cm at 23 months (+2 SD). He had normal developmental milestones in his first 2 years with sitting at 6 months and walking at 10 months. Language development and efficient communication and socialization were observed. The first words appeared at 16 months with progression to 2 years. At 2 years old, parents worried about poor eye contact and language stagnation. At 2.5 years old, language regression, absence of communication, restrictive interests, sensory particularities, and behavior disorders happened. Stereotypic movements appeared at 8 years old. Clinical evaluation was conducted at 12 years old. His figures were 40 kg, 152 cm, and 54 cm for head circumference (+.5 SD). He met DSM-IV criteria for autistic disorder. His Autism Diagnostic Interview scores (based on "ever" scores) were 27 in the social domain (cutoff = 10), 14 in the communication (non verbal) domain (cutoff = 7), and 7 in the repetitive/restrictive behaviors domain (cutoff = 3). Developmental abnormalities were identified before 36 months. Developmental ages (Vineland Adaptive Behavior Scale) were 12 months for communication, 24 months for daily living skills, 10 months for socialization, and 24 months for motricity. Childhood autism rating score was 40 (cutoff = 37.5 for severe autism). His intellectual quotient was 11, leading to an associated diagnosis of profound MR. Physical examination revealed normal growth parameters with no dis-

cernible dysmorphic features, but he was often walking on tiptoe. Electroencephalogram at 6 years old showed abnormalities during sleep with posterior spikes and generalized spike waves complexes without clinical seizures. Valproic acid did not improve clinical features. Computed cerebral tomography and morphometric magnetic resonance imaging showed no abnormalities. Standard karyotype was 46 XY, and FRAXA mutation was excluded.

To test whether this mutation could alter the *NLGN4X* transcript level, we performed a real time reverse transcription (RT)-PCR on total RNA extracted from LCLs of the patient, his father, and control subjects (six female subjects and five male subjects). We identified an approximately 2.5-fold increase in the *NLGN4X* transcript level in the patient compared with his father and with male control subjects (Figure 2A).

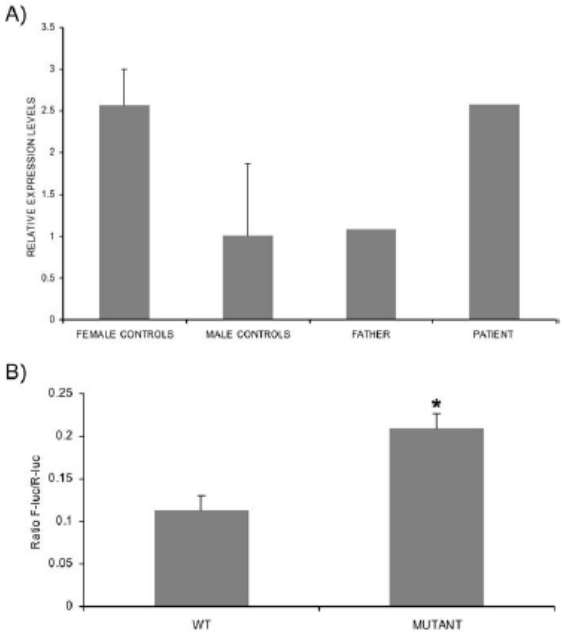


Figure 2. (A) Expression level of *NLGN4X* gene in patient and control subject lymphoblastoid cell lines (LCLs). Specific reverse-transcription polymerase chain reactions (RT-PCRs) were carried out on total RNA from LCLs. The PCR reactions were performed with 1 µg of complementary DNA (cDNA) from patient, his father, five male control subjects, and six female control subjects. Quantitative PCR assays were performed with qPCR Supermix UDG 2X for SYBR Green I detection (Invitrogen, Carlsbad, California) on an iCycler (BioRad, Hercules, California) in accordance with the manufacturer's guidelines. Primers were designed to amplify a 214-base pair (bp) fragment of the *NLGN4X* cDNA with a forward primer in exon 4 (5′-CGGTGGATTGAGGAGAATGT-3′) and a reverse primer in exon 5 (5′-TGTCTGCCAATATCCGAGTG-3′). Specific amplification of *NLGN4X* transcript was verified by sequencing (data not shown). Real-time RT-PCR showed an increased *NLGN4X* transcript level in a boy with autism and nonsyndromic profound mental retardation, compared with male control subjects and with his father. **(B)** Luciferase assay histograms. We subcloned two reporter constructs containing 715 bp of the human *NLGN4X* promoter, differing only at the sequence variation. After transient transfections into human embryonic kidney (HEK) 293T cells, the luciferase assays were performed with the dual-Glo luciferase assay system, and the results gave a significant increase (twofold) of the reporter gene expression under the control of the mutated *NLGN4X* promoter. F-luc, firefly luciferase gene; R-luc, Renilla luciferase. $*p < .05$, Mann–Whitney test for the comparison wild-type (WT)/mutated, two independent transfections with four replicates each.

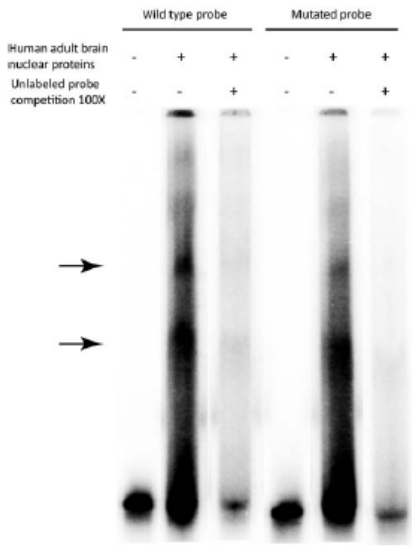


Figure 3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) analysis on nuclear proteins extracted from human adult normal brain tissue. An EMSA has been performed with either wild-type (lanes 1–3) or mutant (lanes 4–6) probe with or without 100× competitor. A difference in the DNA-protein complex migration patterns (arrows), particularly a stronger band intensity in lane 2, is observed with the wild-type probe (upper arrow) compared with the mutated probe in lane 5. We also noticed a shift with the mutated probe in lane 5 (lower arrow) compared with the wild-type probe in lane 2.

To check the impact of the variation on *NLGN4X* expression, we performed in vitro transcription assays and found a significant increase (twofold) of the luciferase gene expression under the control of the mutated *NLGN4X* promoter ($p < .05$) (Figure 2B). These functional analyses suggest that the mutation leads to an increased messenger RNA expression.

We next wondered whether the overexpression caused by the nucleotide substitution was due to an alteration in transcription factors (TF) binding sites located in this region. We searched for potential modifications involving TF binding sites on the promoter region with MatInspector (12) and Match (13) prediction software. The comparative analysis of the normal and variant sequences indicated that the substitution would be associated with the loss of an Sp1 and the formation of a Zing finger protein with Interaction Domain (ZID) binding sites, respectively (Figure 1). Interestingly, ZID protein is highly expressed in brain structures (14).

In parallel, we performed EMSA with human adult brain nuclear proteins extracts. Figure 3 indicates a different migration profile when mutated probe was used, suggesting that DNA/TF complexes are altered in presence of the mutation.

We noticed a less intense band (lane 5, upper arrow) for the heaviest complex when using the mutated probe, suggesting a weaker DNA/protein interaction. We also showed a shift in the lower band of the mutated probe (lane 5, lower arrow) compared with the wild-type one.

In conclusion, our concordant results from quantitative RT-PCR, luciferase, and EMSA assays experiments indicate that the nucleotide variation might be the cause of *NLGN4X* gene overexpression.

Discussion

We report here the first description of a de novo substitution in the promoter region of the *NLGN4X* gene in a patient with autism and nonsyndromic profound MR. This variation is associated with an increased level of the *NLGN4X* transcript in the LCLs of the patient compared with that of male control subjects as well as that of his father. However, we acknowledge that the presence of only one causative variation in our population of 96 autistic patients—the use of the nonneuronal cell line HEK 293T for the luciferase assay—and the lack of functional evidences on brain structures from the patient carrying the mutation constitute limitations of this study.

Although the *NLGN4X* expression level seems to be variable among male control subjects, suggesting a complex regulation of *NLGN4X* expression, the patient still has a significant increased expression (approximately 2.5-fold) compared with his father and with the mean expression of *NLGN4X* in male control subjects. Moreover, although this increased level in the patient seems to be close to the level detected in female control subjects, we should keep in mind the presence of *NLGN4Y* (the Y homologue of the *NLGN4X*), which is normally expressed in male subjects. This suggests that, in the patient carrying the promoter mutation, there is an excess of expression of NLGN4 protein even compared with female subjects.

This result led us to hypothesize that the NLGN4X protein could be overexpressed in synaptic structures. Because no NLGN4X antibody was available to assess the protein level in the LCLs of the patient, we could not verify our proposition.

Yet, several arguments from previous publications suggest that NLGN4X overexpression might lead to autism/MR and have an impact on brain function. Firstly, the recent report of a genomic duplication that involves more than 100 genes, including the *NLGN4X* gene, in a patient with severe MR and general hypotonia highlights that increased gene dosage involving *NLGN4X* can be associated with severe to profound MR as well as autism (15). The comparison of the phenotypes associated with the truncating (loss-of-function) mutations with the phenotypes caused by increased gene dosage (gain-of-function) would indicate that the severity of MR is correlated with the excess of *NLGN4X* gene expression. Secondly, overexpression of several members of the neuroligins family in primary neuronal cultures can cause a significant increase in the numbers of dendritic spines and synapses as well as synaptic responses (16–18). These results suggest that neuroligins might regulate the stabilization and maturation of synapses rather than their initial formation. They also control the formation and functional balance of excitatory/inhibitory synapses in hippocampal neurons, suggesting that an abnormal ratio between these synapses might lead to cognitive and communication alterations (19,20).

Moreover, an interesting parallel exists with the *SHANK3* gene where autistic patients carrying inherited 22q13 deletions involving this gene have siblings with partial 22q13 trisomy affected by Asperger syndrome with early language development (21) and/or attention-deficit/hyperactivity disorder (22). Altogether, these results suggest that all synaptic proteins involved in the neuroligin pathway are sensitive to gene dosage and that overexpression of such genes could be as detrimental as a decreased expression.

In summary, our results indicate that overexpressed *NLGN4X* transcript is associated with autism and nonsyndromic profound MR. Although loss of synaptic function of the NLGN4X protein has been associated with autism and MR, we propose here that an overexpression of NLGN4X leading probably to a potential gain of function is also responsible for autism and MR in some cases and could alter the excitatory/inhibitory balance in neurons. Moreover, our results bring a new insight regarding the phenotypic spectrum of *NLGN4X* mutations and suggest that the systematic analysis of regulatory sequences and transcription level of this gene might reveal more individuals with mutations.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fondation France Telecom and Fondation pour la Recherche Médicale (HD fellowship), and Fondation Jérôme Lejeune. We declare that our experiments comply with the current French law. We deeply thank the patients and their families for their cooperation. We also thank Brigitte Jauffrion for the establishment of lymphoblastoid cell lines and Catherine Antar, Rose-Anne Thépault, and Marie-Pierre Moizard for their technical assistance.

The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Online resources: accession numbers and URLs for data presented herein are as follows:

Ensembl genome browser: (http://www.ensembl.org)
UCSC Genome Browser: (http://genome.ucsc.edu)
GenBank: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/), for NLGN4X *mRNA (accession Number NM_020742 and AF376803)*
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): (http://ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/)

1. Freitag CM (2007): The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: A review of the literature. *Eur J Hum Genet* 14:714–720.
2. Laumonnier F, Cuthbert PC, Grant SG (2007): The role of neuronal complexes in X-linked brain diseases. *Am J Hum Genet* 80:205–220.
3. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, *et al.* (2003): Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34:27–29.
4. Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, *et al.* (2004): X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the Neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74:552–557.
5. Vincent JB, Kolozsvari D, Roberts WS, Bolton PF, Gurling HM, Scherer SW (2004): Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: No mutations in 196 autism probands. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129B:82–84.
6. Gauthier J, Bonnel A, St.-Onge J, Karemera L, Laurent S, Mottron L, *et al.* (2005): NLGN3/NLGN4 gene mutations are not responsible for autism in the Quebec population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132:74–75.
7. Ylisaukko-oja T, Rehnstrom K, Auranen M, Vanhala R, Alen R, Kempas E, *et al.* (2005): Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. *Eur J Hum Genet* 13:1285–1292.
8. Blasi F, Bacchelli E, Pesaresi G, Carone S, Bailey AJ, Maestrini E; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC) (2006): Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4 in individuals with autism from the IMGSAC collection. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141:220–221.
9. Yan J, Oliveira G, Coutinho A, Yang C, Feng J, Katz C, *et al.* (2005): Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Mol Psychiatry* 10:329–332.
10. Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, Picker J (2008): Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet* 16:614–618.
11. Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25:402–408.
12. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, *et al.* (2005): MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21:2933–2942.

13. Kel AE, Goessling E, Reuter I, Cheremushkin E, Kel-Margoulis OV, Wingender E (2003): MATCH™: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 31:3576–3579.
14. Bardwell VJ, Treisman R (1994): The POZ domain: A conserved protein–protein interaction motif. *Genes Dev* 8:1664–1677.
15. Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SG, Vermeesch JR, *et al.* (2007): Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: Important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat* 28:1034–1042.
16. Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Südhof TC (2007): Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54:919–931.
17. Dean C, Scholl FG, Choih J, DeMaria S, Berger J, Isacoff E, Scheiffele P (2003): Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6:708–716.
18. Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM (2004): Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via NLs. *Cell* 119:1013–1026.
19. Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, *et al.* (2006): Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51:741–754.
20. Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005): Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307:1324–1328.
21. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, *et al.* (2007): Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39:25–27.
22. Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, *et al.* (2007): Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 81:1289–1297.

III. Exploration de la région chromosomique 22q13 dans l'autisme

A. Introduction

La région 22q13 est une des régions chromosomiques où des CNV ont été identifiés de manière récurrente. Le syndrome microdélétionnel 22q13 a également été associé à l'autisme. La microdélétion 22q13 correspondant au syndrome de Phelan-McDermid (OMIM ♯ 6060232) est caractérisée par une délétion subtélomérique de 160kb à 9Mb. Un retard de langage ainsi qu'un retard mental modéré sont les caractéristiques cliniques que l'on rencontre fréquemment pour ce phénotype (Phelan *et al.*, 2005). Un comportement de type autistique, notamment avec une faible perception de la douleur ainsi qu'un mouvement de mastication ou de mordillement permanent, est observé chez 50% des patients. Plusieurs gènes sont localisés dans cette région et notamment le gène *SHANK3* pour lequel des mutations ont été identifiées chez des patients autistes (Moessner *et al.*, 2007, Durand *et al.*, 2007).

Nous avons utilisé la technique de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) pour explorer la région 22q13 chez des patients autistes. Le kit que nous avons utilisé était constitué de 35 sondes couvrant une région de 19Mb et réparties dans 23 gènes (Figure 26).

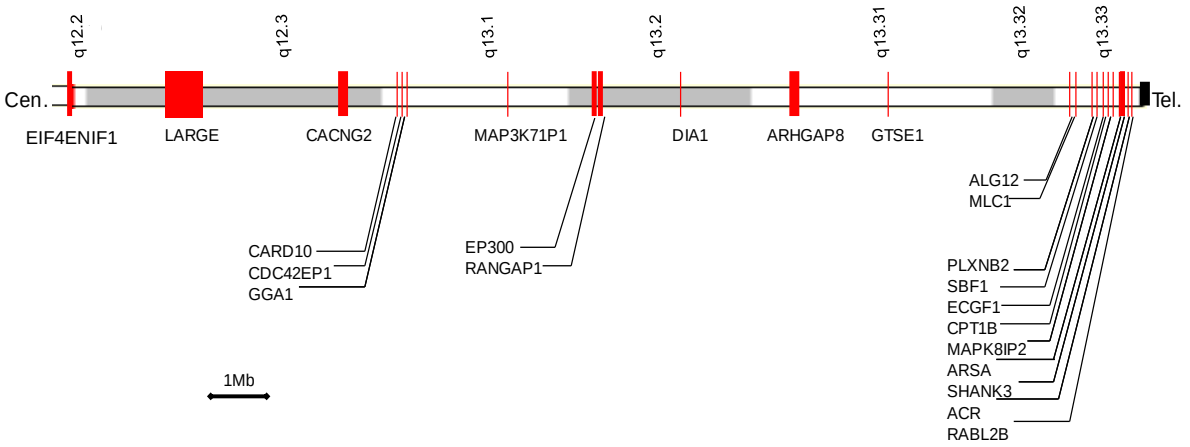


Figure 26 : Schéma de la région 22q13. Gènes de la région 22q13 étudiés dans l'autisme par MLPA

Parmi les 23 gènes étudiés dans la région 22q13, certains ont déjà été associés à des troubles neurologiques (Tableau 16).

Tableau 16 : Liste des gènes de la région 22q13 étudiés par MLPA.

Gènes	Fonction	Remarques	Taille du gène	Références
EIF4ENIF1	Facteur d'initiation de la traduction		57kb	
LARGE	Glycosyltransférase, intervient dans la glycosylation des protéines	Mutations du gène liées à une forme de dystrophie congénitale associée à un retard mental sévère	757kb	Longman *et al*., 2003
CACNG2	Sous unité γ d'un canal calcique voltage dépendant	Protéine similaire à la stargazine murine pour laquelle des mutations ont été associées aux troubles bipolaires. Association avec la schizophrénie	140kb	Liu *et al*.,2008, Silberberg *et al.*, 2008
CARD10	Caspase	active la voie NF-kappa-B	29kb	Wang *et al*., 2001
CDC42EP1	Rho GTPase		9kb	
GGA1	Protéine de l'appareil de Golgi		25kb	
MAP3K7IP1	Protéine régulatrice de MAP kinase kinase kinase MAP3K7/TAK1	Intéragit avec la voie de signalisation du TGF beta	37kb	
EP300	Protéine régulatrice de la transcription	Action sur la prolifération et la différenciation cellulaire. Anomalies du gène EP300 responsable du syndrome Rubinstein-Taybi. Rôle dans les cancers épthéliaux	88kb	Bartsch *et al*., 2010,
RanGap1	Polypeptide qui induit l'activité GTPase de la protéine Ran		57kb	
DIA1	Cytochrome b5 réductase		31kb	
ARHGAP8	Protéine de la famille Rho-GAP		110kb	
GTSE1	Protéine intervenant en association avec p53 sur le cycle cellulaire		37kb	
ALG12	Glycosyltransférase		15kb	
MLC1	Possible canal cationique neuronal	Mutations associées à une leucoencéphalopathie, maladie autosomale récessive avec troubles neurologiques	26kb	Shukla *et al.*, 2008
PLXNB2	Plexine de classe B, récepteur transmembranaire qui participe à la guidance axonale		33kb	
SBF1	Probable pseudophosphatase		28kb	
ECGF1	Facteur angiogénique	Stimule in vitro la croissance des cellules endothéliales. Mutations associées à une encéphalomyopathie gastrointestinale mitochondriale	4kb	Taanman *et al.*, 2009
CPT1B	Carnitine/choline acétyltransférase		14kb	
MAPK8IP2	Régulateur de signal de transduction de la voie c-Jun		11kb	
ARSA	cérébroside sulfatase	Mutations responsables de leucodystrophie métachromatique : démyélinisation progressive	3kb	Lugowska *et al.*, 2009
SHANK3	Organisation structurelle et fonctionnelle des synapses et des dendrites	CNV del, mutations, association avec l'autisme	59kb	Szatmari *et al*. 2007; Sebat *et a*l. 2007; Durand *et al.* 2007; Marshall *et al*. 2008; Sykes *et al*. 2009
ACR	Sérine protéase, acrosine, protéine de l'acrosome des spermatozoïdes		7kb	
RABL2B	Protéine de la famille des Ras GTPases		16kb	

B. Résultats des analyses par MLPA

Nous avons analysé la région 22q13 chez 131 patients autistes (dont 86 étaient issus de la banque d'ADN de notre équipe et 45 étaient issus de la banque de la Fondation Autisme) ainsi que dans un échantillon ADN témoin (mélange de 15 ADN « hommes » issus de notre banque d'ADN témoins). Les résultats sont reportés sur la Figure 27.

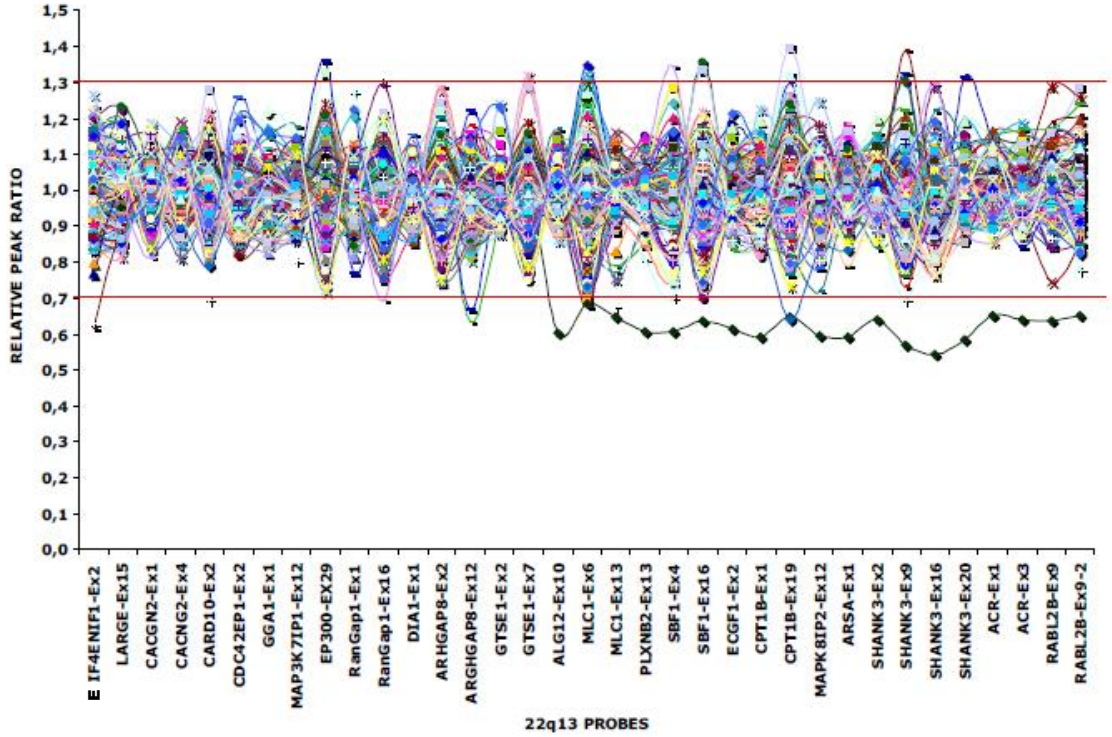


Figure 27 : Graphique montrant les données normalisées de MLPA. La zone de normalité est encadrée par les lignes rouges, les seuils inférieur et supérieur (0,7 et 1,3) (SALSA P188, MRC-Holland).

Les patients dont les données normalisées présentaient un écart type supérieur à 0,2 ont été retirés de l'étude car ils reflètent une hétérogénéité entre les sondes probablement due à un problème de qualité de l'ADN. Plusieurs patients ont des valeurs en dehors de la zone de normalité, seules les variations sur au moins deux sondes consécutives ont été considérées comme pertinentes. Un patient (ligne verte foncée en dessous du seuil minimal sur la figure 27) présente une délétion pour les sondes ALG12-EX10 à RABL2B-EX9-2 (Figure 28). Aucune des autres variations visibles sur la Figure 27 ne s'est révélée significative chez les autres patients autistes.

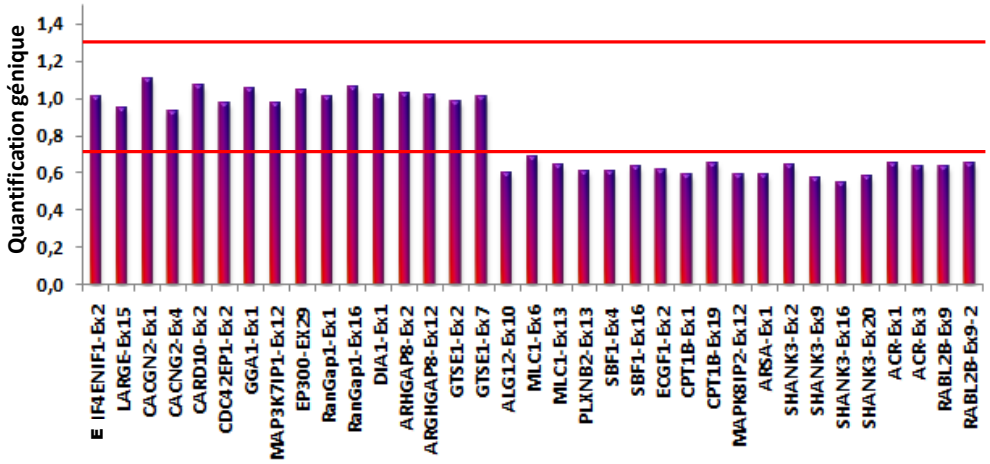


Figure 28 : Histogramme représentant les données de MLPA du patient ayant une délétion dans la région 22q13. Les lignes rouges délimitent l'intervalle de normalité.

C. Analyse par QPCR

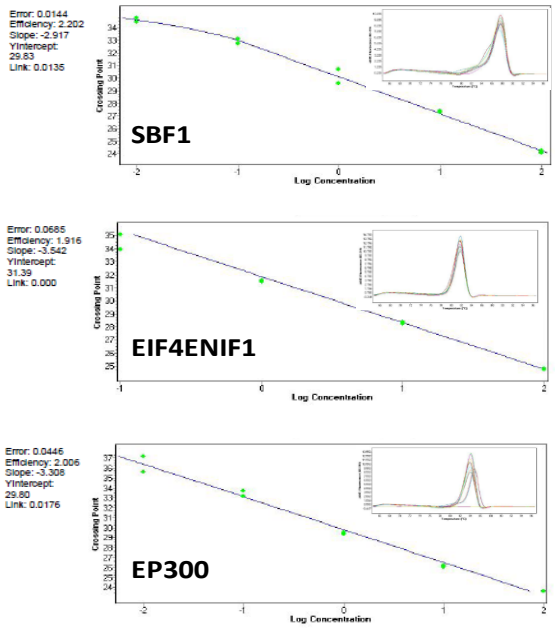
La QPCR a été utilisée comme seconde technique pour la validation des résultats pertinents obtenus par la technique de MLPA. Sur l'ensemble de la région 22q13 nous avons étudié 5 gènes : *EIF4ENIF1*, *EP300*, *MLC1*, *SBF1* et *SHANK3*. Parmi ces 5 gènes, seuls 2 gènes n'ont pas montré de délétion par les analyses MLPA (*EIF4ENIF1* et *EP300*). Les amorces de QPCR sont localisées dans les mêmes exons que ceux étudiés par MLPA, excepté pour les gènes *EP300* et *SHANK3* (Tableau 17).

Tableau 17 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de QPCR

Amorces (5'-3')	Séquences (5'-3')	Tm °C	Tailles des amplicons (bp)	localisation des amorces QPCR	localisation des sondes MLPA
EIF4ENIF1 F	ATCTTCCAGGTGCAGAGCAT	60	103	Exon 2	Exon 2
EIF4ENIF1 R	CAGGAGGCTTCTTCAGGTCA	60			
EP300CNVf	CAAGCGGCCTAAACTCTCAT	60	120	Exon 1	Exon 29
EP300CNVr	ATAAAGGCGCACCGAGTAGA	60			
MLC1 F	CCCCTTGGCAGATCAACTT	60	122	Exon 6	Exon 6 et 13
MLC1 R	TGCACCCACCTTCTTTTTCT	60			
SBF1 F	GTGGAGGATGCCACAGAGAG	60	119	Exon 4	Exon 4 et 16
SBF1 R	GACACCAGTACCAGCGTCTTC	60			
SHANK3 F	CAGGGATGTCCGCAACTAC	60	234	Exon 8	Exon 2, 9, 16 et 20
SHANK3 R	ACGAAGGGAACATCAACACC	60			

Nous avons déterminé les conditions optimales de QPCR pour les couples d'amorces correspondant aux gènes *EIF4ENIF1*, *EP300* et *SBF1* (Figure 29). Les efficacités de QPCR

ainsi que les courbes de fusion correspondant aux gènes *MLC1* et *SHANK3* sont présentées dans le chapitre « Etude de polymorphismes de nombre de copie par PCR quantitative en temps réel dans l'autisme » et en Annexe 3.



GÈNES	EFFICACITÉ QPCR
EIF4NI1F	1,92
EP300	2,01
MLC1	2,04
SBF1	2,20
SHANK3	1,97

Figure 29 : Paramètres de QPCR pour les gènes étudiés dans la région 22q13. Détermination des efficacités de QPCR avec 5 dilutions d'ADN témoin de 0,01ng à 100ng. En encart les courbes de fusion des produits d'amplification de chaque gène. Le tableau reprend les valeurs d'efficacité calculées.

Le patient pour lequel nous avions observé une délétion pour une partie des sondes MLPA dans la région 22q13 a été analysé par QPCR parallèlement à 20 autres patients autistes, aux parents de ce patient et à nos ADN témoins (cité précédemment dans ce paragraphe).

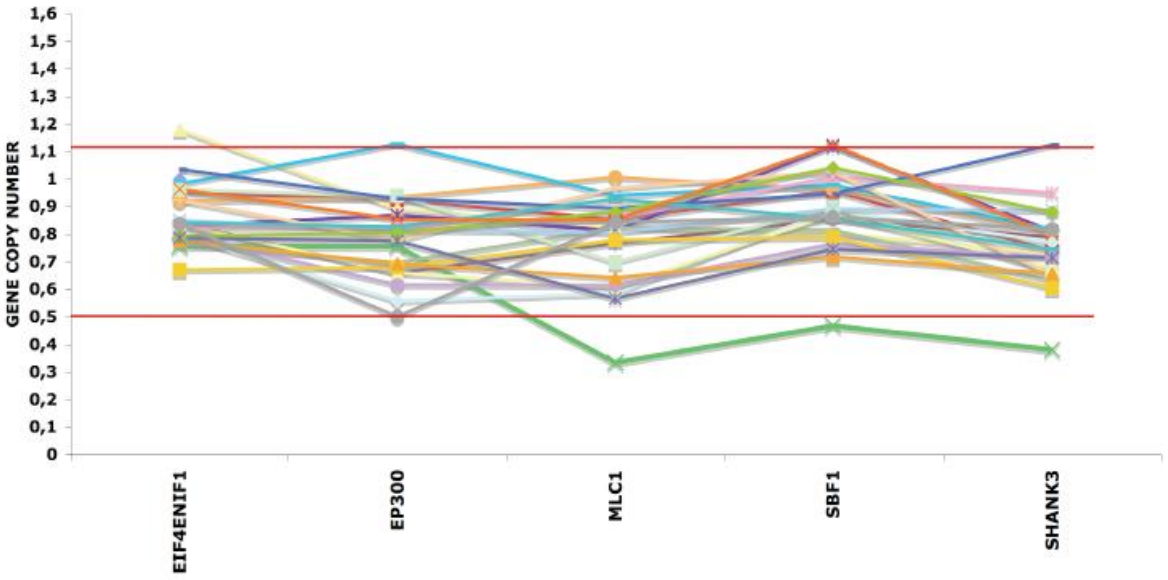


Figure 30 : Analyse de la région 22q13 par QPCR chez des patients autistes. Les données correspondant aux produits d'amplification des gènes *EIF4ENIF1, EP300, MLC1, SBF1* et *SHANK3* ont été normalisées par rapport aux gènes de référence *HEM3* et *ALB*. Les lignes rouges délimitent la zone de normalité. La courbe verte correspond au patient pour lequel les analyses par MLPA avaient révélé une délétion dans cette région chromosomique.

Les données de la Figure 30 confirment les résultats que nous avions précédemment observés par MLPA. Un des patients autistes étudiés présente une délétion dans la région 22q13 incluant les gènes *ALG12* à *RABL2B*. Cette délétion n'a en revanche pas été observée chez les parents de ce patient.

En conclusion nous avons pu identifier un patient présentant une délétion dans la région 22q13 par MLPA et QPCR. La taille de la zone de délétion est d'environ 1Mb, mais les techniques employées ne permettent pas de le déterminer avec précision. Le patient pour lequel cette délétion a été identifiée appartenait à la banque d'ADN provenant de la banque de la Fondation Autisme, laquelle est utilisée pour d'autres études et parallèlement à notre découverte, une autre équipe à mis en évidence une délétion en utilisant la méthode CGH-array (Guilmatre *et al.*, 2009).

IV. Etude des variations de nombre de copies par PCR quantitative en temps réel chez une population d'autistes.

A. Introduction

Nous avons sélectionné une trentaine de gènes candidats pour notre étude (30 gènes autosomiques et 6 gènes du chromosome X). Ces gènes ont été choisis pour trois raisons, soit parce que des CNV y avaient déjà été observés chez des patients autistes, soit parce que ces gènes étaient localisés dans une région chromosomique associée à l'autisme ou encore parce que ces gènes étaient eux-mêmes directement associés à l'autisme ou au retard mental (Figure 31).

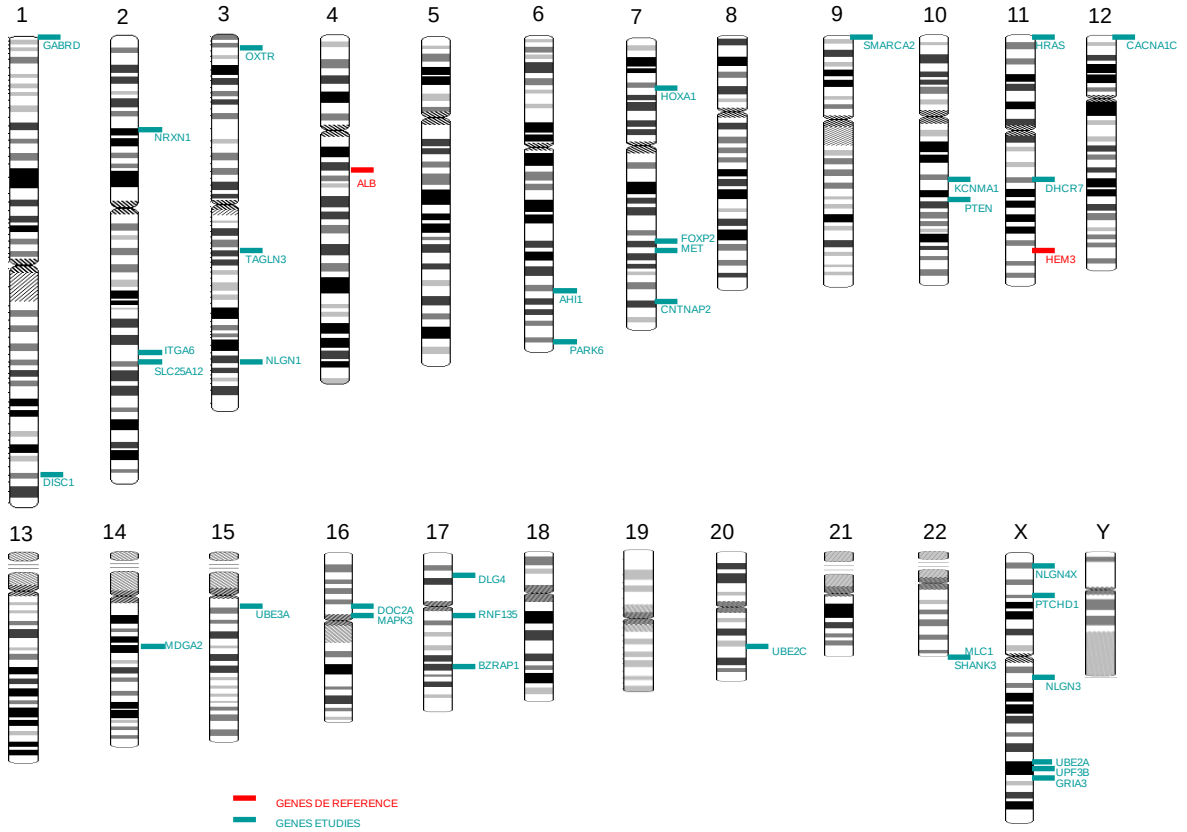


Figure 31 : Cartographie des gènes étudiés par QPCR.

Tableau 18 : Liste des gènes étudiés en QPCR et leur fonction

Gènes	Locus	Fonction/rôle	Variation génomique	Références
DISC1	1q42	Croissance des neurites et développement cortical	CNV del, association	Kilpinen *et al*. 2008; Williams *et al*., 2009
GABRD	1p36	Sous unité delta du récepteur GABA	del 1p36	Jacquemont *et al.* 2006
NRXN1	2p16	Molécule d'adhésion cellulaire, jonction synaptique	CNV del, mutations, association, liaison	Szatmari *et al*. 2007; Marshall *et al*. 2008; Kim *et al*. 2008
ITGA6	2q31	Adhésion cellulaire	association région 2q24-q33	Ramoz *et al*. 2008
SLC25A12	2q24	Transporteur mithochondriale Ca2+	association région 2q24-q33	Ramoz *et al*. 2008, Silverman *et al.* 2008
OXTR	3p25	Récepteur à l'ocytocine	association	Wu *et al*. 2005
TAGLN3	3q13	Protéine neuronale associée au cytosquelette	CNV dup région 3q13	Marshall *et al*. 2008
NLGN1	3q26-q27	Neuroliguine, interaction cellulaire, régulation synaptique	CNV dup	Glessner *et al*. 2009
AHI1	6q23	Développement du cortex et du cervelet	association, CNV dup	Alvarez Retuerto *et al*. 2008; Marshall *et al*. 2008
PARK2	6q26	Ubiquitine ligase	liaison, association, CNV dup	Szatmari *et al*. 2007; Glessner *et al*. 2009
HOXA1	7p15	Facteur de transcription	association	Ingram *et al*. 2000; Gallagher *et al*. 2004
FOXP2	7q31	Répresseur de transcription	CNV del, association	Gong *et al*. 2004; Vernes *et al*. 2008; Marshall *et al*. 2008
MET	7q31	Récepteur, proto-oncogène,prolofération cellulaire, morphogénèse	CNV del, association	Campbell *et al.* 2006; Marshall *et al*. 2008; Sousa *et al.* 2009
CNTNAP2	7q35-q36	Molécule d'adhésion cellulaire	CNV del, association	Rossi *et al*. 2008; Arking *et al*. 2008; Alarçon *et al.* 2008
SMARCA2	9p24	Facteur de transcription	liaison région 9p24	Szatmari *et al.* 2007
KCNMA1	10q22	Canal potassique BKCa	mutations, CNV del	Laumonnier *et al*. 2006; Balciuniene *et al.* 2007
PTEN	10q23	Supresseur de tumeur	mutations, association	Buxbaum *et al*. 2007
HRAS	11p15	Oncogène à activité GTPase	association	Hérault *et al.* 1993
DHCR7	11q13	7-dehydrocholesterol reductase, métabolisme du cholestérol	association	Sikora *et al*. 2006
CACNA1C	12p13	Canal calcique	association	Splawski *et al.* 2004
MDGA2	14q21	Interactions cellulaires	association	Bucan *et al*. 2009
UBE3A	15q11	Ubiquitine ligase	CNV dup, liaison	Nurmi *et al*. 2001; Jacquemont *et al*. 2006; Szatmari *et al*. 2007; Christian *et al*. 2008; Glessner *et al*. 2009
DOC2A	16p11	Libération de neurotransmeteurs Ca2+ dépendant	CNV del/dup	Sebat *et al*. 2007; Kumar *et al.* 2008; Weiss *et al*. 2008; Marshall *et al*. 2008; Christian *et al.* 2008
MAPK3	16p11	MAP kinase, régulation du cycle cellulaire	CNV del/dup	Sebat *et al*. 2007; Kumar *et al.* 2008; Weiss *et al*. 2008; Marshall *et al*. 2008; Christian *et al.* 2008
DLG4	17p13	Plasticité synaptique	CNV	ClineH. 2005
RNF135	17q11	Interactions protéine/protéine et protéine/ADN	liaison	Abrahams B.S. *et al*. 2008
BZRAP1	17q22-q23	Récepteur périphérique aux benzodiazépines	association	Bucan *et al*. 2009
UBE2C	20q11-q13	Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine	CNV dup	Marshall *et al.* 2008
MLC1	22q13	Transporteur ou canal cationique neuronal	CNV del	Szatmari *et al*. 2007; Sebat et al. 2007; Marshall *et al*. 2008
SHANK3	22q13	Organisation structurelle et fonctionnelle des synapses et des dendrites	CNV del, mutations, association	Szatmari *et al*. 2007; Sebat *et a*l. 2007; Durand *et al.* 2007; Marshall *et al*. 2008; Sykes *et al*. 2009
PTCHD1	Xp22	Récepteur à activité hedgehog	CNV del	Marshall *et al.* 2008
NLGN4X	Xp22	Neuroliguine, interaction cellulaire, régulation synaptique	mutations, CNV del	Jamain *et al*. 2003; Marshall *et al.* 2008; Zhang *et al*. 2009
NLGN3	Xq13	Neuroliguine, interaction cellulaire, régulation synaptique	mutations, association	Jamain *et al*. 2003; Ylisaukko-oja *et al.* 2005
GRIA3	Xq25	Récepteur 3 au glutamate	liaison	Liu *et al*. 2001
UBE2A	Xq25-q26	Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine	liaison	Liu *et al*. 2001
UPF3B	Xq25-q26	Appartient au complexe de dégradation des ARNm aberrants (à codon stop prématuré)	liaison, mutations	Liu *et al*. 2001; Tarpey *et al*. 2007

Les gènes étudiés ont été choisis par rapport aux loci d'intérêt dans l'autisme et référencés par Abrahams et Geschwind (2008). Nous avons également ajouté les gènes *MDGA2* et *BZRAP1* suite à la publication de Bucan (2009). Les gènes *KCNMA1* et *HRAS* associés à l'autisme par

notre équipe (Laumonnier *et al.*, 2006, Hérault *et al.*, 1995), ainsi que les gènes *UBE3A*, *UBE2C*, et *PARK2* de la voie de l'ubiquitine ont aussi été étudiés (Tableau 18).

B. L'optimisation de la méthode

1. Le choix du kit de QPCR

Un grand nombre de mélanges réactionnels (kit) à base de Sybrgreen existe actuellement sur le marché. Avant de démarrer notre étude nous avons testé 3 kits : un kit classique contenant du Sybrgreen (LightCycler®480 DNA Sybr Green 1 Master, Roche), et deux kits composés d'intercalants nouvelle génération (LightCycler®480 High Resolution Melting Master ou Resolight, Roche et le SsoFast™EvaGreen®Supermix, BioRad) ayant la propriété de s'intercaler entre chaque paire de base de l'ADN double brin. Ces agents intercalants liés à l'ADN sont capables d'émettre une fluorescence à 520nm après excitation à 490nm.

Une première étape dans le choix du kit a consisté à analyser les courbes d'amplification et les courbes de fusion obtenues pour 2 gènes qui ont été utilisés par la suite comme référence dans nos expériences (Figure 32), les gènes *HEM3* (dont le nom officiel est *HMBS*) et *ALB*. Ces gènes ont été sélectionnés comme gènes de références pour normaliser nos données de QPCR. Les gènes *HEM3* (code l'hydroxyméthylbilane synthase) et *ALB* (code l'albumine) sont localisés respectivement en 11q23.3 et 4q13.3. Ces gènes ont été choisis en tant que gènes de références pour deux raisons : aucun CNV englobant ces gènes n'a été décrit à ce jour dans l'autisme, d'après la base de données DGV et ces gènes ont été préalablement utilisés comme références dans d'autres études rapportées dans la littérature (Weksberg *et al.*, 2005, Rouleau *et al.*, 2009).

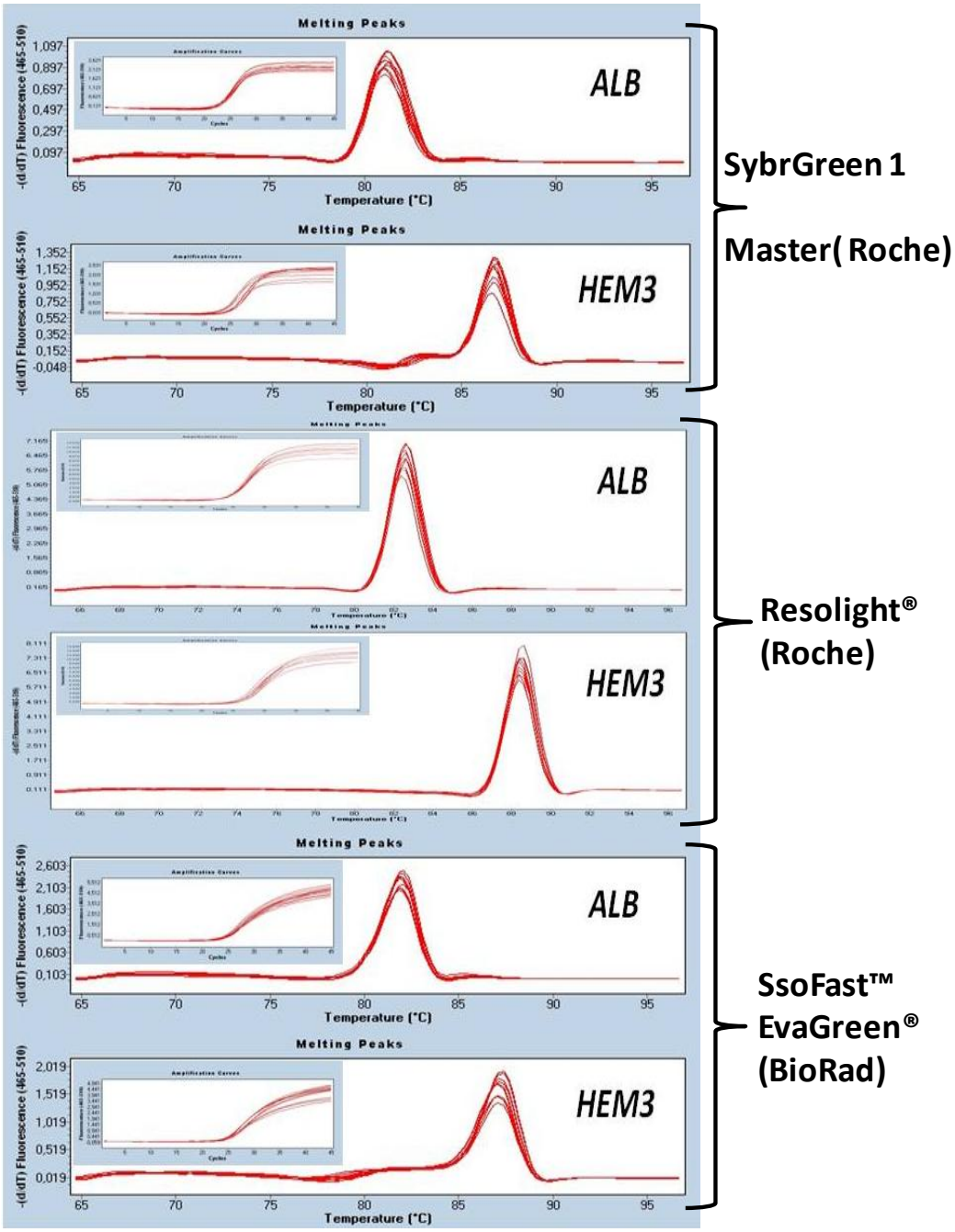


Figure 32 : Analyses QPCR des gènes *HEM3* et *ALB*. Courbes de fusion des 2 gènes de référence selon le kit utilisé, en encart les courbes d'amplification.

Les courbes de fusion mettent en évidence un produit d'amplification unique pour chaque couple d'amorces de chaque gène quelque soit le kit utilisé, avec toutefois des pics de fusion plus étroits en présence du kit Resolight®, de même, en présence de ce kit, la fluorescence émise est plus importante ce qui est important lorsque l'on veut déterminer de faible variation entre deux échantillons.

La deuxième étape d'évaluation à consisté à étudier le nombre de copies de deux gènes *GRIA3* et *NLGN4X* situés sur le chromosome X après normalisation, par rapport à nos deux gènes de référence.

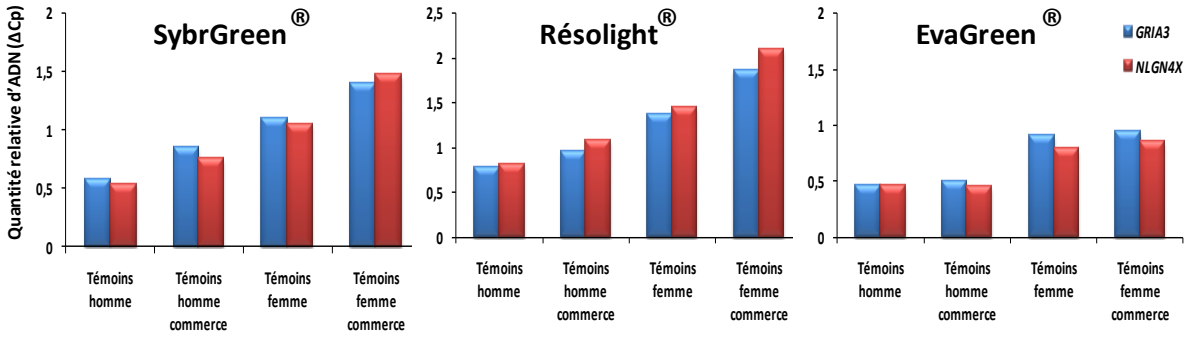


Figure 33 : Quantité relative d'ADN (ΔCp = Cp gène d'intérêt-Cp moyen des 2 gènes de référence) évaluée par QPCR pour les gènes *GRIA3* et *NLGN4X*. Les données évaluées chez 4 échantillons témoins ont été normalisées par rapport à deux gènes de référence (*HEM3* et *ALB*). L'échantillon « Témoins homme » correspond à un mélange de 15 ADN témoins masculin, L'échantillon « Témoins femme » correspond à un mélange de 15 ADN témoins féminin, l'échantillon témoins homme commerce est un ADN masculin fourni par la société Promega, l'échantillon témoins femme commerce est un ADN féminin fourni par la société Promega.

Les variations du nombre de copies des gènes *GRIA3* et *NLGN4X*, nous permettaient, en absence de témoins positifs, de discriminer des nombres de copies de 1 à 2 en comparant des échantillons d'ADN d'hommes et de femmes (1 copie de ces deux gènes chez l'homme et 2 copies chez la femme) (Figure 33). Les trois kits permettent de distinguer 1 à 2 copies d'un amplicon, cependant la variabilité entre échantillons du laboratoire et commerciaux est moins importante avec le kit EvaGreen®

En conclusion les kits Resolight® et EvaGreen® nous ont paru les plus approprié à notre étude en terme de spécificité, d'émission de fluorescence, de discrimination du nombre de copie d'amplicons. Le kit EvaGreen® a eu notre préférence du point de vue d'une moins grande variabilité entre échantillons ainsi que d'une meilleure discrimination entre un « état » une copie (homme) et un « état » 2 copies (femme) des gènes du chromosome X. De plus ce kit présentait une plus grande facilité d'utilisation (contrairement au Resolight®, le fluorophore est inclus directement dans le mélange commercialisé).

2. Validation méthodologique de la QPCR pour la recherche de polymorphismes de nombre de copies.

a) Recherche de CNV dans 6 gènes localisés sur le chromosome X.

Les polymorphismes de nombre de copies ont été explorés dans les gènes *GRIA3*, *NLGN3*, *NLGN4X*, *UPF3B* *PTCHD1* et *UBE2A*. La fonction de ces gènes est référencée dans le Tableau 18.

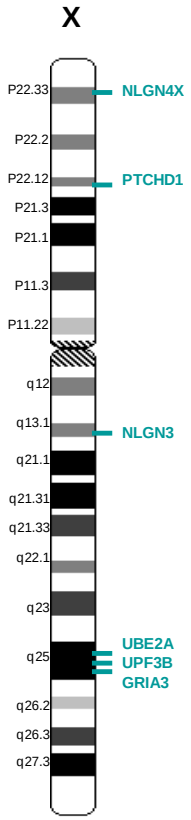


Figure 34 : Localisation des gènes étudiés par QPCR sur le chromosome X.

La taille et la séquence des produits d'amplification sont vérifiées par une électrophorèse en gel d'agarose 1,5% TBE 1X ainsi que par séquençage en électrophorèse capillaire. Puis la qualité des amplicons spécifiques à chaque couple d'amorces ainsi que les efficacités des PCR ont été évaluées respectivement à partir des courbes de fusion et des courbes de dilution de matrice d'ADN (droites de mesure d'efficacité) (Figure 35).

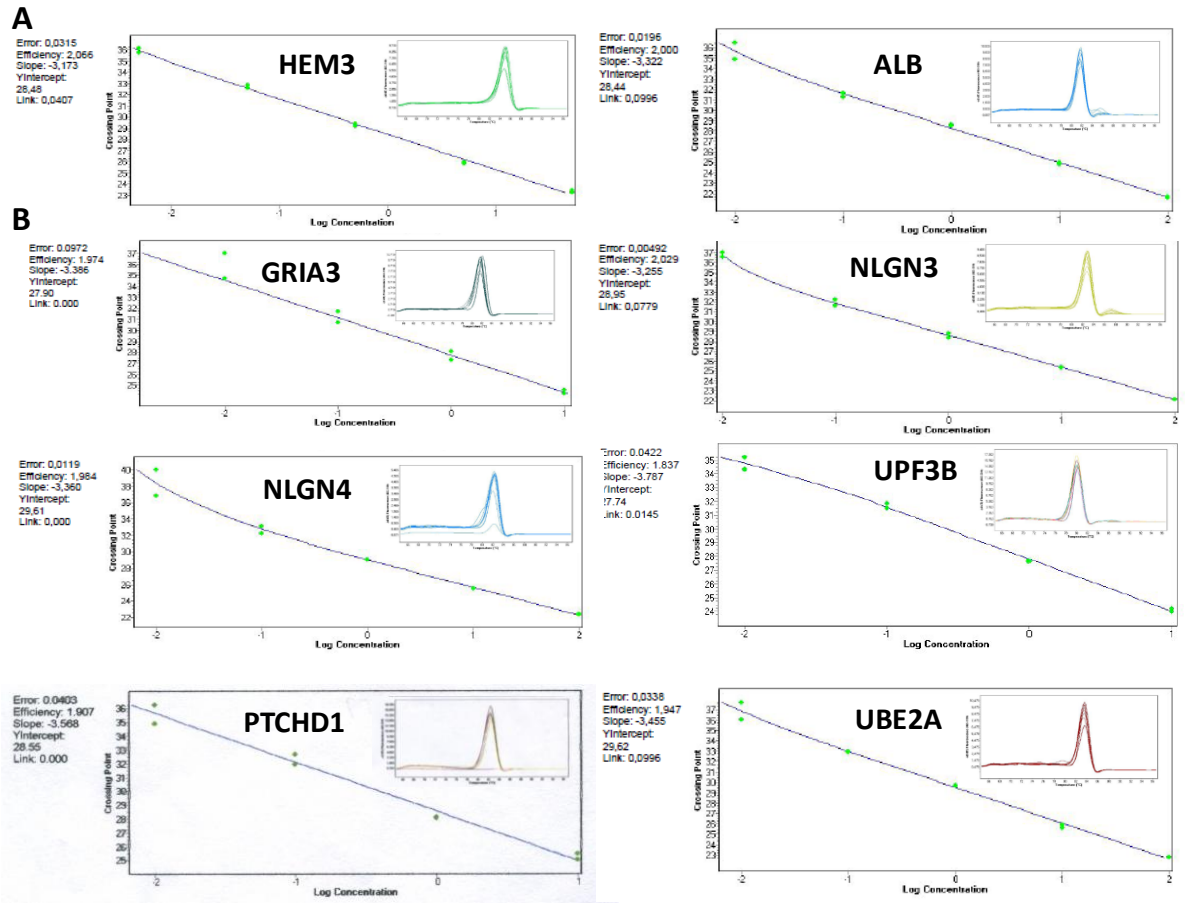


Figure 35 : Analyse des paramètres de QPCR. Détermination des efficacités de QPCR pour les gènes de référence (**A**) et les gènes cible localisés sur le chromosome X (**B**) avec 5 dilutions de l'ADN « Témoins femme » de 0,01ng à 100ng. En encart les courbes de fusion des produits d'amplification de chaque gène.

Les courbes de fusion de chaque produit d'amplification montrent un seul pic de fusion synonyme d'une pureté des produits de PCR (absence d'amplification contaminante et de dimères d'amorces). Les efficacités de PCR se situent entre 1,837 et 2,066 soit entre 92 et 103% ce qui est satisfaisant, la tolérance étant entre 80 et 110%. Nous avons choisi de travailler avec 10ng d'ADN car cette quantité d'ADN nous permettait d'être situé dans la zone de plus grande linéarité des droites standards de mesure d'efficacité de QPCR pour la majorité des gènes, c'est d'ailleurs la quantité rapportée par la plupart des publications.

Parmi les ADN de patients autistes étudiés 79 échantillons d'origine masculine et 27 échantillons d'origine féminine ont pu être analysés.

Les valeurs de quantification génique rapportées pour les 6 gènes étudiés ont été normalisées par rapport au « Témoin homme » (aussi bien chez les filles que chez les garçons). On observe une certaine variabilité des valeurs normalisées pour chaque gène (Figure 36). Plusieurs échantillons présentent des valeurs en dehors de la zone de normalité

définie par la moyenne de l'ensemble des échantillons ± 2 écarts types (une zone de tolérance est ainsi définie pour le groupe fille et une autre pour le groupe garçon), cependant après vérification ces échantillons se sont avérés normaux.

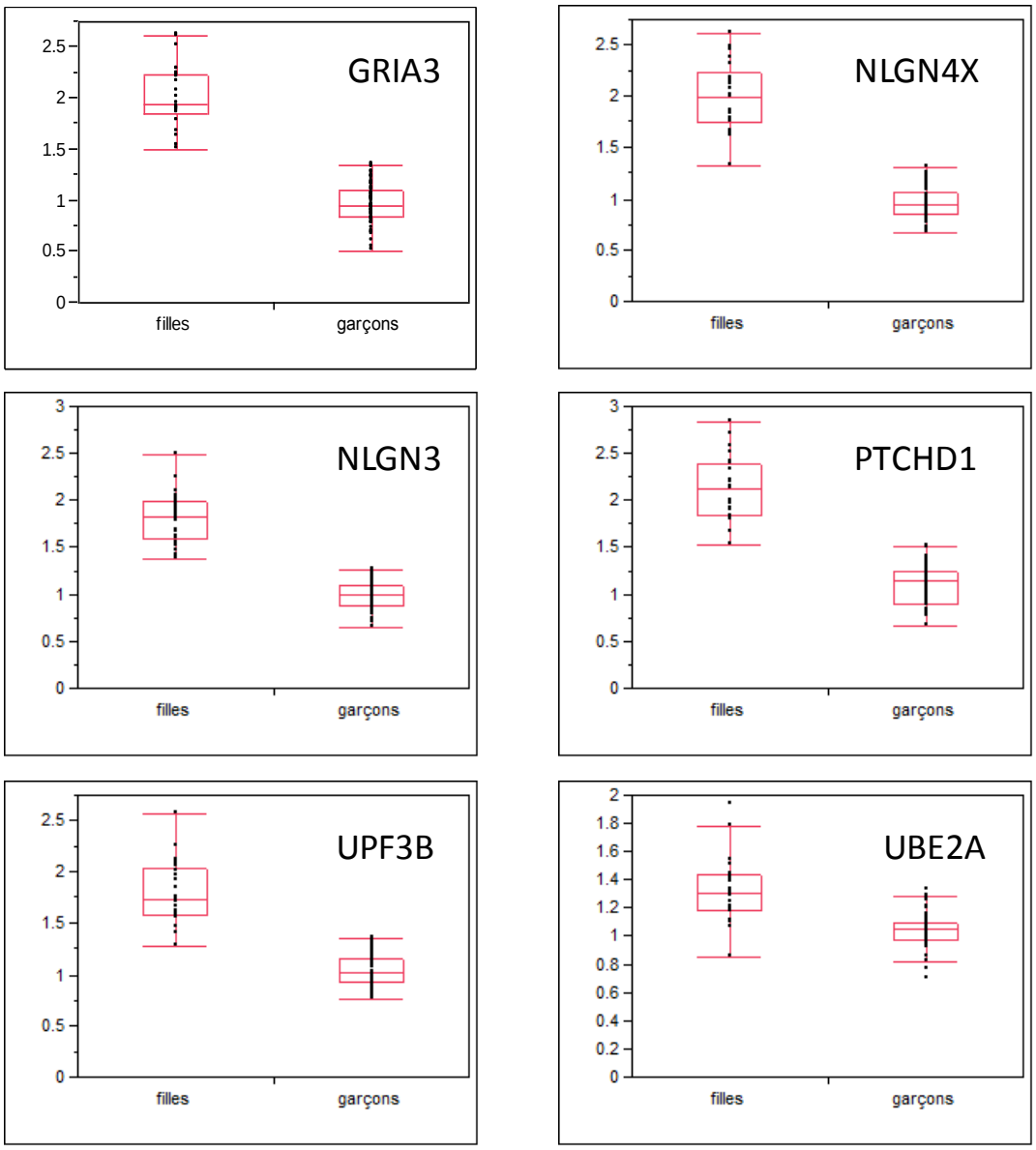


Figure 36 : Analyse de CNV par QPCR pour les gènes *GRIA3*, *NLGN4X*, *NLGN3*, *PTCHD1*, *UPF3B* et *UBE2A* chez 106 patients autistes (filles et garçons). Le nombre de copies des fragments d'ADN étudiés a été comparé entre le groupe de filles et le groupe de garçons par un test de Wilcoxon ($p<0,0001$ pour les 6 gènes).

Tableau 19 : Analyse statistique par le test de Wilcoxon des données normalisées de QPCR des gènes localisés sur le chromosome X.

		Valeur minimale	Médiane	Valeur maximale	Moyenne	Ecart type	*p*
GRIA3	Filles	1,5000	1,9340	2,6173	2,0215	0,3043	0,0001
	Garçons	0,5017	0,9617	1,3413	0,9663	0,1892	
NLGN4X	Filles	1,3190	1,9791	2,6175	1,9732	0,3233	0,0001
	Garçons	0,6725	0,9480	1,3005	0,9638	0,1485	
NLGN3	Filles	1,3620	1,8243	2,4876	1,8125	0,2703	0,0001
	Garçons	0,6504	0,9955	1,2665	0,9971	0,1455	
PTCHD1	Filles	1,5103	2,1143	2,8270	2,1233	0,3319	0,0001
	Garçons	0,6718	1,1418	1,5050	1,0944	0,2099	
UPF3B	Filles	1,2755	1,7298	2,5640	1,7943	0,2988	0,0001
	Garçons	0,7623	1,0145	1,3425	1,0399	0,1468	
UBE2A	Filles	0,8544	1,3007	1,9313	1,3159	0,2221	0,0001
	Garçons	0,6965	1,0440	1,3243	1,0348	0,1111	

L’analyse des données par le test de Wilcoxon (

Tableau 19) met en évidence pour chacun des 6 gènes étudiés que nous sommes en présence de deux populations significativement distinctes ($p<0,0001$) de patients : une population d’échantillons présentant des valeurs de nombre de copies proche de 2 correspondant à nos patients autistes filles et une population d’échantillons présentant des valeurs proches de 1 correspondant à nos patients masculins. La valeur médiane de la population féminine pour le gène *UBE2A* est faible par rapport à celle obtenue pour les autres gènes, cependant l’ensemble des données de la population correspondant aux filles sont significativement différentes de celles correspondant aux garçons.

b) Recherche de CNV dans le gène SOD.

Nous avions dans le laboratoire un patient non autiste mais atteint d’une sclérose latérale amyotrophique (SLA) pour lequel un polymorphisme de nombre de copies était connu dans le gène *SOD1* (superoxyde dismutase 1, 21q22). Nous avons voulu vérifier si nos conditions de QPCR permettaient de détecter la délétion *SOD1* de ce patient.

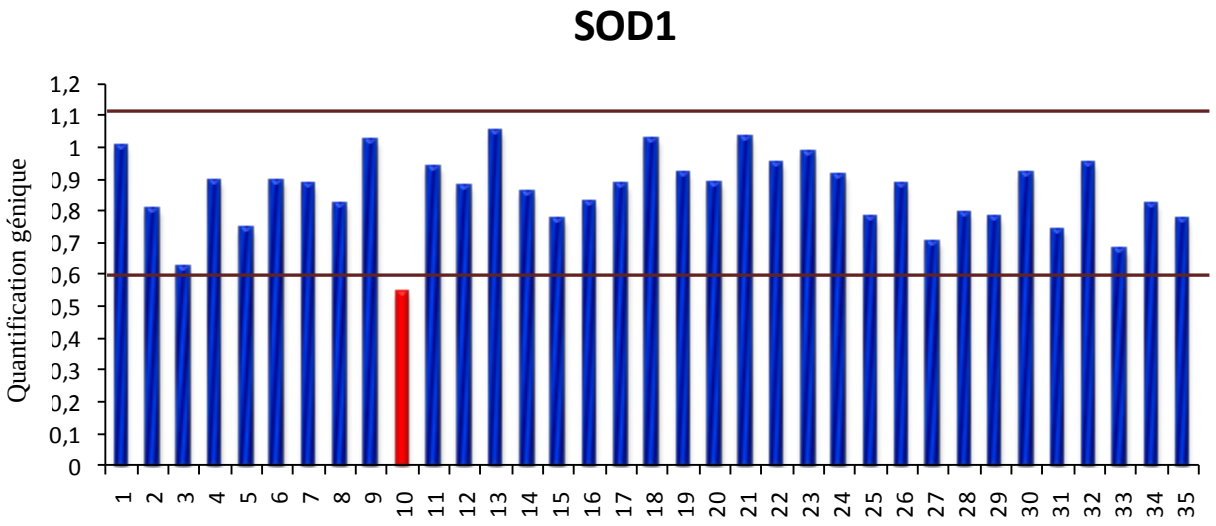


Figure 37 : Analyse de CNV dans le gène *SOD1* par QPCR. Les données brutes ont été normalisées par rapport aux deux gènes de référence *HEM3* et *ALB*, puis par rapport à l'échantillon n°1 (« Témoins Homme »). La barre d'histogramme en rouge représente le patient SLA présentant une délétion d'une région du gène *SOD1*. Les lignes marron délimitent la zone de normalité (moyenne des échantillons +/- 2 écarts types).

Une analyse QPCR du gène SOD1 a été réalisée chez 32 patients autistes, chez le patient n°10 ayant une délétion connue dans le gène SOD1 ainsi que chez 2 échantillons témoins déjà utilisés pour les expériences précédentes. Le graphique de la Figure 37 montre une délétion dans le gène *SOD1* chez le patient pour lequel elle était connue.

Les expériences réalisées sur les gènes du chromosome X chez les hommes versus les femmes ainsi que l'étude sur le gène *SOD1* chez un patient SLA, nous ont permis de mettre en évidence des variations de 1 à 2 copies de segments d'ADN et donc de pouvoir valider notre protocole de QPCR pour la recherche de CNV dans des gènes répartis sur l'ensemble du génome.

L'analyse des données de l'ensemble des échantillons ne nous a pas permis de mettre en évidence de CNV dans notre population de patients autistes pour les 6 gènes étudiés du chromosome X (Figure 38).

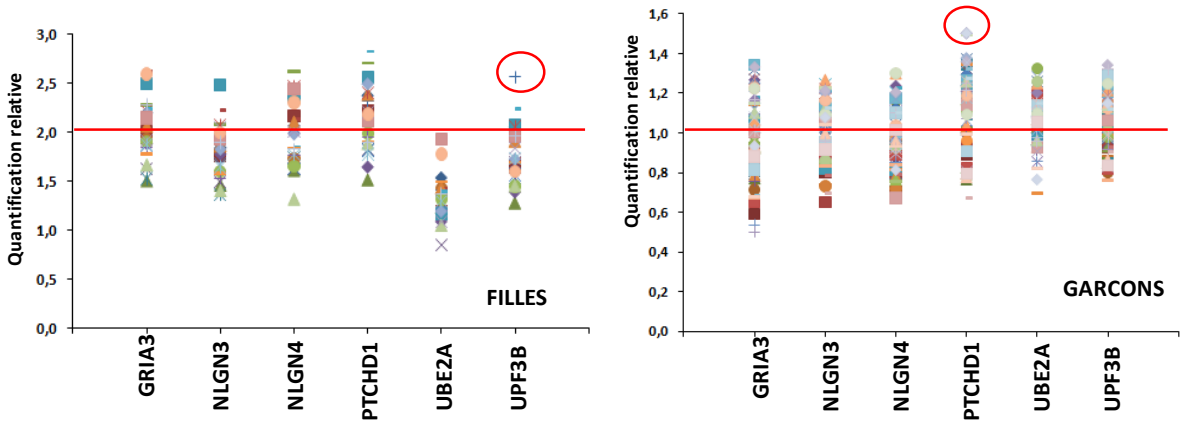


Figure 38 : Analyse des CNV par QPCR dans 6 gènes du chromosome X chez 106 patients autistes (27 filles et 79 garçons). Les lignes rouges représentent les valeurs théoriques de nombre de copies : 2 chez les filles et 1 chez les garçons. Les cercles rouges entourent les valeurs anormales.

Nous avons observé chez un patient fille et chez un patient garçon une valeur aberrante respectivement pour les gènes *UPF3B* et *PTCHD1*. Des expériences complémentaires de QPCR n'ont pas confirmé ces premiers résultats.

C. Etude de CNV chez des patients autistes

Tableau 20 : Efficacités de QPCR des gènes étudiés

GÈNES	EFFICACITÉ amorces 1	EFFICACITÉ amorces 2	Taille du gène en kb
AHI1	1,94	2,04	214
ALB	2,00		17
BZRAP1	2,10		28
CACNA1C	1,83	1,923	249
CNTNAP2	2,08	2,081	2300
DHCR7	1,94		14
DISC1	1,81	2,106	414
DLG4	2,04		30
DOC2A	2,10		6
FOXP2	1,88	2,172	276
GABRD	1,93		11
HEM3	2,07		9
HOXA1	2,08		3
HRAS	2,05		3
ITGA6	2,06	2,203	79
KCNMA1	2,00		760
MAPK3	1,99		9
MDGA2	1,94	2,164	835
MET	2,01		124
MLC1	2,04		27
NLGN1	1,94	2,189	888
NRXN1	2,01		1110
OXTR	2,05		19
PARK2	2,03		1380
PTEN	2,11	1,894	109
RFN135	1,91		29
SCL25A12	1,92		110
SHANK3	1,97		59
SMARCA2	2,00	2,331	178
TAGLN3	1,98		15
UBE2C	2,01		4
UBE3A	2,00	1,935	102

Les analyses par QPCR de 30 gènes localisés sur les autosomes ont été réalisées sur un panel de 106 individus autistes (hommes et femmes). Les « témoins homme » et « femme » précédemment cités ont été analysés simultanément. Le « témoin » homme a été utilisé pour la normalisation des données. Les gènes pour lesquels la taille est supérieure à 50kb ont été étudiés avec deux couples d'amorces.

Les efficacités de QPCR ont été déterminées pour chaque couple d'amorces (Tableau 20), elles se situent entre 80 et 110%. La pureté des produits d'amplification a été vérifiée par analyse des courbes de fusion correspondant à chaque amplicon (Annexe 3).

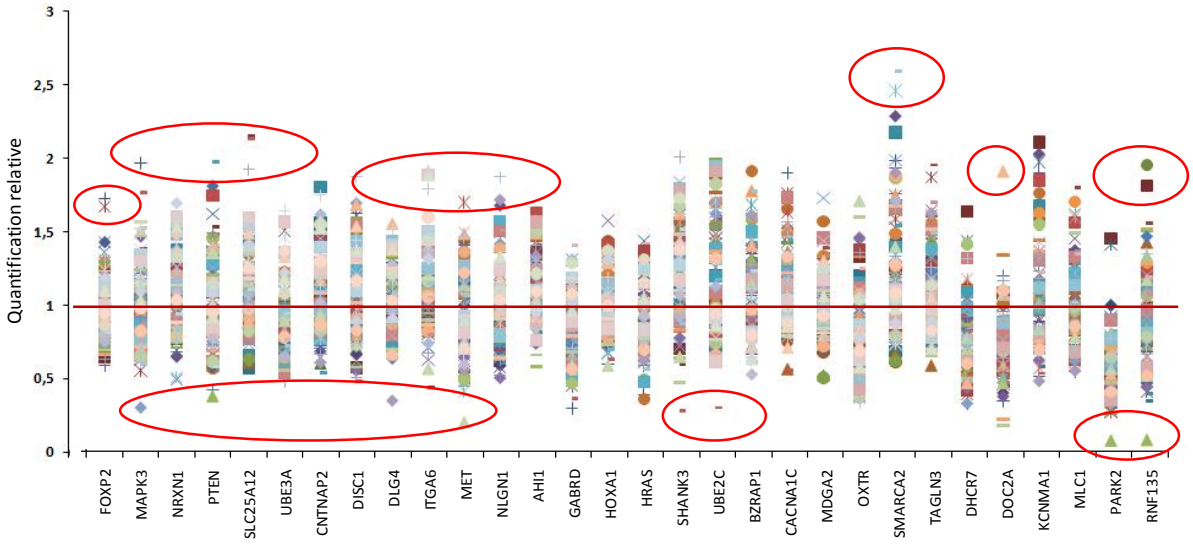


Figure 39 : Analyse des CNV par QPCR dans 30 gènes autosomiques chez 106 patients autistes. La valeur théorique correspondant à 2 copies de gène correspond à une quantification relative égale à 1 (ligne rouge). Les cercles rouges entourent des exemples de données qui sortent de la zone de normalité (moyenne des échantillons +/- 2 écarts types).

L'ensemble des résultats visibles sur la Figure 39 permet de mettre en évidence des variations du nombre de copies (à la fois des gains et des pertes de matériel génomique) dans la plupart des gènes étudiés et chez plusieurs patients. Ainsi 50 patients présentaient des CNV dans 1, 2 voir plus de 5 gènes. L'analyse précise de ces données a révélé un certain nombre de faux positifs. Il nous est apparu peu vraisemblable que certains échantillons présentent des variations dans plusieurs gènes. Nous avons décidé de conserver pour vérification et ré-analyse uniquement les échantillons qui ne présentaient qu'une seule et unique variation dans l'ensemble des gènes étudiés. Les Tableau 21 et Tableau 22 dressent le bilan des CNV que nous avons identifiés dans notre population de patients autistes.

Tableau 21 : Analyse de CNV et valeurs de QPCR. En bleue les ratios correspondant à une perte de matériel génomique, en rouge les ratios correspondant à un gain.

Gènes	Patients	Ratio Normalisé	Intervalle de tolérance minimum	Intervalle de tolérance maximum	MOYENNE	ECART TYPE
GABRD	154	0,298	0,39	1,29	0,843	0,225
	263.3	1,310				
NRXN1	162	0,495	0,58	1,61	1,091	0,258
	2A	1,692				
ITGA6	5A	1,886	0,53	1,68	1,106	0,289
	7A	1,914				
	8A	1,792				
OXTR	216	1,465	0,25	1,39	0,820	0,286
TAGLN3	184	1,955	0,55	1,70	1,127	0,287
AHI1	215	0,579	0,65	1,52	1,085	0,220
HOXA1	180	1,574	0,58	1,39	0,986	0,201
	27	1,432				
KCNMA1	168	1,900	0,34	1,81	1,078	0,367
PTEN	204	1,977	0,44	1,60	1,020	0,288
	174	1,809				
HRAS	75	1,436	0,43	1,40	0,915	0,242
	120	0,393				
CACNA1C	231	1,735	0,62	1,68	1,149	0,265
	123	1,715				
MDGA2	164	0,508	0,63	1,47	1,049	0,212
	219	1,727				
MAPK3	3A	1,570	0,41	1,54	0,975	0,283
DLG4	249	1,554	0,60	1,49	1,041	0,223
RNF135	119	1,956	0,26	1,57	0,916	0,329
BZRAP1	218	1,779	0,49	1,69	1,089	0,298
UBE2C	187	1,993	0,43	1,89	1,160	0,366
	247	1,943				

Les gains de matériels génomiques apparaissent majoritaires avec 22 duplications contre 5 délétions. Ces variations génomiques sont réparties sur 17 gènes parmi les 30 étudiés. Elles concernent 9 sur 24 patients féminins et 18 sur 82 patients masculins. La proportion de patients avec un autisme nu est équivalente à celle de patients avec autisme associé à un retard mental (16 vs 11) (Tableau 22).

Les valeurs d'écart type sont parfois élevées, reflétant une variabilité entre les échantillons. La plupart des moyennes sont proches de 1, ce qui correspond à deux copies de fragment d'ADN, excepté pour les gènes *GABRD* et *OXTR* où elles sont proches de 0,8 et pour les gènes *UBE2C*, *CACNA1C*, *TAGLN3* et *ITGA6* où elles sont supérieures à 1,1 (Tableau 21). Les ratios de QPCR de chaque échantillon sont normalisés par rapport au « témoin homme ». Une moyenne inférieure à 1 reflète une majorité d'échantillons pour lesquels les valeurs brutes de QPCR sont plutôt inférieures à celle du témoin. A l'inverse une moyenne supérieure à 1 reflète une majorité d'échantillons pour lesquels les valeurs brutes de QPCR sont supérieures à celle du témoin. Les valeurs théoriques de ratios normalisés voudraient que l'on ait deux copies de gène avec un ratio de 1, une copie avec un ratio de 0,5

(délétion) et 3 copies avec un ratio de 1,5 (duplication). Les valeurs expérimentales (qui tiennent compte de la variabilité de nos échantillons) de nos intervalles de tolérance sont situées au-delà de ces valeurs théoriques.

Tableau 22 : Bilan des analyses de CNV par QPCR dans notre banque de patients autistes (A=autisme, RM=retard mental, dup=duplication, del=délétion)

Patients	diagnostique	Prélèvement	Sexe	Gènes	Locus	CNV
263.3	A	sang	M	GABRD	1p36	dup
154	A/RM sévère	sang	F			del
2A	A	sang	M	NRXN1	2p16	dup
162	A/RM modéré	lignée	M			del
5A	A	sang	M	ITGA6	2q31	dup
7A	A	sang	M			dup
8A	A	sang	F			dup
216	A	lignée	M	OXTR	3p25	dup
184	A/RM modéré	sang	M	TAGLN3	3q13	dup
215	A	lignée	M	AHI1	6q23	del
180	A/RM modéré	sang	M	HOXA1	7p15	dup
27	A/RM sévère	sang	M			dup
168	A/RM sévère	sang	F	KCNMA1	10q22	dup
174	A/RM modéré	sang	M	PTEN	10q23	dup
204	A	lignée	M			dup
75	A/RM sévère	sang	F	HRAS	11p15	dup
120	A/RM modéré	sang	F			del
123	A/RM sévère	sang	F	CACNA1C	12p13	dup
231	A	lignée	M			dup
219	A	lignée	M	MDGA2	14q21	dup
164	A	sang	M			del
3A	A	sang	F	MAPK3	16p11	dup
249	A	lignée	M	DLG4	17p13	dup
119	A/RM sévère	sang	F	RNF135	17q11	dup
218	A	lignée	M	BZRAP1	17q22-q23	dup
187	A	lignée	F	UBE2C	20q11-q13	dup
247	A	lignée	M			dup

En conclusion, ce travail reste une première approche, il nécessite des expériences complémentaires afin de valider les résultats observés notamment en réalisant de nouvelles QPCR avec des couples d'amorces différents et en utilisant une autre technique d'exploration.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail nous avons cherché à mettre en évidence des régions de susceptibilités et des gènes candidats dans l'autisme et la déficience mentale. Un point crucial pour ce travail était de réunir des groupes de patients pour lesquels nous avions à la fois des données cliniques précises et pour lesquels nous avions un ADN de bonne qualité. Les prélèvements de nos banques de patients sont issus des services de génétique et de pédopsychiatrie du CHRU de Tours où le diagnostic est réalisé par des cliniciens spécialistes de la déficience mentale et de l'autisme. Les prélèvements de nos banques (témoins et patients) ont été réalisés au cours des 15 dernières années. Certains ADN n'étaient pas de qualité suffisante pour réaliser une étude de CNV, d'autres n'étaient plus en quantité suffisante et nous n'avions pas la lignée cellulaire de tous les patients pour pouvoir ré-extraire l'ADN. Enfin, pour certains patients les données cliniques n'étaient pas complètes. Ainsi nous avons dû éliminer un certain nombre de prélèvements. Il serait intéressant de poursuivre ces études sur d'autres prélèvements afin d'accroitre le nombre d'échantillons pour réaliser des tests statistiques plus robustes.

La première partie de notre travail concerne une étude d'association entre un polymorphisme d'une séquence *Alu* et la déficience mentale.

Nous avons exploré un marqueur microsatellite GXALu situé dans l'intron 27b du gène NF1 chez des individus déficients mentaux sans syndrome associé et chez des contrôles d'origine caucasienne. Nous avons ainsi pu démontrer une association entre l'allèle 4 du marqueur (chi2=10,34 ; p=0,015) et la déficience mentale non syndromique. Ce marqueur polymorphe est constitué d'une série de répétitions AAAT à l'extrémité 3' d'une séquence Alu. Le génotype des patients et des témoins a été déterminé par dHPLC. L'amplification par PCR de séquences de courtes répétitions polymorphes génère outre le produit d'amplification, des produits surnuméraires liés au glissement de la taq polymérase lors de l'amplification l'ADN (Olejniczak et Krzyzosiak, 2006). Ces artéfacts de PCR rendent le génotypage plus compliqué lorsqu'il est réalisé à partir d'échantillons d'ADN issus d'électrophorèses en gel d'agarose ou de polyacrylamide. L'exploration par la technique de dHPLC évite ce problème car ces molécules « fantômes » ne sont pas visibles. Habituellement la technique de dHPLC est employée pour la détection de mutation ou de SNP par la formation d'hétéroduplex (Xiao et Oefner 2001). Nous avons développé notre protocole à partir des expérimentations réalisées par plusieurs auteurs pour la détection de microsatellites notamment pour ceux impliqués dans le cancer (Kim *et al*, 2003, Kleibl *et al*, 2007). Les profils d'élution des produits de PCR permettent d'attribuer un pic d'élution spécifique par allèle. La dHPLC permet aisément de

discriminer des fragments différents de seulement 3pb. Par ailleurs la technique de dHPLC offre l'avantage d'être rapide (10min par échantillon) et peu coûteuse par rapport à l'étude par séquençage direct ou par rapport à l'analyse de fragment à l'aide d'amorces fluorescentes. Antérieurement, notre équipe a étudié l'association entre le marqueur GXAlu, les marqueurs Ex5 et E39, (marqueurs RFLP) situés respectivement dans l'exon 5 et l'intron 39 du gène *NF1* et l'autisme (Mbarek *et al*, 1999). Aucune association n'a été observée pour ces marqueurs. Cependant un nouvel allèle (allèle 5) constitué de 6 répétitions AAAT a été observé chez quatre patients autistes qui présentaient tous un retard mental associé. L'allèle 4 (7 répétitions AAAT) a également été observé chez des témoins et chez des patients autistes (au nombre de 4, thèse de Olivier Mbarek, 1999), les autistes porteurs de l'allèle 4 avaient tous un quotient de développement faible (1 patient avec un QD de 45 et les 3 autres avec un QD de 19 à 25). Par ailleurs, le marqueur GXAlu est localisé dans l'intron 27b du gène *NF1* ; la plupart des patients *NF1* ayant une délétion du gène présentent un retard mental ; ces deux observations font qu'il était intéressant d'étudier la variation de cette région chromosomique dans une population d'individus déficients mentaux. Aucun individu porteur de l'allèle 5 n'a été identifié dans notre étude. Les allèles 2 et 3 sont les plus fréquents dans les deux populations (témoins et déficients). Deux autres études de ce marqueur ont mis en évidence une répartition similaire aux nôtres des allèles 2 et 3 dans des populations contrôles d'origine caucasienne, africaine et japonaise (Plank *et al*, 2001, Marui *et al*, 2004). L'association entre l'allèle 4 et un groupe de patients déficients mentaux ne semble pas corrélée avec la sévérité du retard mental, entre autre, les quotients de développements sont très hétérogènes, ils varient de 20 à 70. L'association de l'allèle 4 avec la déficience mentale pourrait provenir d'un déséquilibre de liaison entre cet allèle et une mutation localisée dans la région du marqueur GXAlu puisque ce marqueur est intronique non codant. Un biais de recrutement peut difficilement être incriminé car les patients porteurs de l'allèle 4 ne proviennent pas d'un même foyer géographique. Une autre possibilité serait que le locus GXAlu lui-même interagisse sur la régulation de l'expression des gènes situés dans la région, sur le gène *NF1* mais aussi sur les gènes situés dans l'intron 27b : *OMGP*, *EVI2A* et *EVI2B*. Les analyses *in vitro* que nous avons menées montrent une augmentation de l'expression du gène rapporteur *CAT* en présence des allèles 4 et 5. L'effet est significativement présent quelque soit le sens d'insertion pour l'allèle 4. Concernant l'allèle 5 l'orientation antisens du marqueur par rapport au gène rapporteur augmente l'expression de ce dernier mais de façon non significative par rapport aux contrôles. Ces résultats vont dans le sens d'une augmentation de l'expression d'un gène en présence des allèles 4 et 5. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Meloni et *al*.

(1998) qui a montré que des répétitions de tétranucléotides situées dans le gène de la tyrosine hydroxylase augmentaient l'expression du gène de la luciférase *in vitro*. Par ailleurs il a été démontré que les séquences *Alu* pouvaient réguler l'expression de gènes (Mighell et *al*., 1997, Piedrafita *et al*. (1996). L'analyse *in silico* via le serveur TRANSFAC, du locus incluant les répétitions AAAT nous a permis d'identifier un site potentiel de fixation pour un facteur de transcription HNF1A (TRANSFAC T00368) localisé 3 paires de bases après la dernière répétition AAAT. Les allèles GXAlu pour lesquels nous avons observé une augmentation de l'expression de gène *in vitro* sont les allèles les plus courts (6 et 7 répétitions AAAT). Il est possible que la fixation d'un facteur de transcription dans la région soit perturbée en présence d'un faible nombre de répétions AAAT ou qu'un facteur nouveau puisse se fixer dans ce cas. Les séquences *Alu* elle mêmes possèdent également des sites de fixation de facteurs de transcription (Polak P. et Domany E., 2006). On peut imaginer un encombrement stérique au niveau de ce locus, le faible nombre de répétition AAAT responsable d'une séquence plus courte induirait une perturbation dans la liaison des facteurs de transcription et par voie de conséquence l'expression des gènes les plus proches pourrait être modifiée. Le gène *OMG* situé à 3kb du marqueur GXAlu pourrait voir son niveau d'expression perturbé en présence des allèles 4 ou 5 du marqueur GXALu. Le gène *OMG* est un bon candidat de par sa proximité avec le marqueur GXALu mais aussi de part son rôle au cours du développement du système nerveux central (Vourc'h P. et Andres C.R., 2004). Une des fonctions connues de la protéine OMgp est de contribuer au processus de myélinisation du système nerveux central. La protéine OMgp agit en tant qu'inhibiteur de la prolifération et inhibiteur de la croissance axonale (Wang *et al*., 2002, Martin *et al*., 2009).

En conclusion, nous émettons l'hypothèse d'un modèle polygénique d'approche de la déficience mentale non syndromique où le facteur de risque représenté par l'allèle 4 du marqueur GXALu, associé à des modifications d'expression de gène pourrait contribuer à la pathologie, avec un odds ratio de 7,86 (95% CI : 2,13 à 28,9).

La deuxième partie de ce travail a consisté à participer à l'étude du gène *NLGN4X* dans l'autisme.

Le sex ratio en faveur des garçons dans l'autisme a constitué un argument en faveur de l'implication des gènes situés sur le chromosome X dans cette pathologie. Deux études indépendantes ont renforcé cette hypothèse. Des mutations dans les gènes *NLGN3* et *NLGN4X* ont été décrites chez des patients Asperger et autistes d'une part et chez des patients déficients mentaux avec ou sans autisme d'autre part (Jamain *et al*., 2003, Laumonnier *et al*.,

2004). Ces deux études ont montré que des mutations tronquantes du gène *NLGN4X* pouvaient être associées à un large spectre phénotypique incluant le syndrome d'Asperger, l'autisme et la déficience mentale. Par la suite d'autres études ont montré que les mutations de la séquence codante du gène *NLGN4X* étaient rares chez les patients autistes (Vincent *et al*., 2004, Gauthier *et al*., 2005, Ylisaukko-oja *et al*., 2005, Blasi *et al*., 2006).

Dans cette étude notre équipe a montré pour la première fois qu'une mutation *de novo* de la région promotrice était associée à un effet fonctionnel chez un patient autiste présentant un retard mental sévère. Une augmentation d'expression (2,5 fois), par rapport aux contrôles, du gène *NLGN4X* a été observée par QPCR à partir des ARN extraits de la lignée lymphoblastoïde d'un patient. Cette observation a été renforcée par les tests d'expression de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur sauvage ou muté et par les expériences de retard sur gel en présence de sondes d'ADN portant la mutation du promoteur et de sondes non mutées.

Les résultats de cette étude suggèrent qu'une surexpression du gène *NLGN4X* peut être responsable de cas d'autisme. Une étude récente rapportant une duplication génomique de plus de 100 gènes dont le gène *NLGN4X* chez un patient atteint de retard mental, souligne qu'une augmentation de dosage génique du gène *NLGN4X* peut jouer un rôle important aussi bien dans la déficience mentale que dans l'autisme (Froyen *et al*., 2007). Des variations de l'expression du gène *NLGN4X* conduisant aussi bien à une perte qu'à un gain de fonction de la protéine, peuvent entraîner un déséquilibre des synapses excitatrices/inhibitrices conduisant ainsi à des anomalies cognitives et ou comportementales (Chih *et al*., 2005). Ainsi la comparaison des phénotypes associant une perte ou un gain de fonction, corrèle la sévérité du retard mental à une augmentation d'expression du gène. Il a par ailleurs été montré que le gène *SHANK3* dont la protéine interagit avec les neuroliguines au niveau des synapses glutamatergiques, était également sensible au dosage génique. Au sein d'une même famille, des gains ou des pertes de fonction du gène *SHANK3* peuvent induire de l'autisme, un syndrome d'Asperger ou un déficit de l'attention et de l'hyperactivité (Durand *et al*., 2007, Moessner *et al*., 2007).

Ces résultats ont mis en évidence une nouvelle mutation du gène *NLGN4X* au niveau des séquences régulatrices, dans l'autisme associé à la déficience mentale. Ceci élargit le spectre et la fréquence des mutations de ce gène dans l'autisme.

La troisième partie de notre travail a consisté à explorer la région chromosomique 22q13 dans l'autisme. La délétion 22q13 représente l'un des réarrangements les plus

fréquemment associés à des déficits cognitifs. Les réarrangements chromosomiques représentent environ 10% des cas d'autisme. La région 22q13 représente, avec les régions 15q, et 7q, des zones de CNV récurrents dans l'autisme (Vorstman et *al*., 2006, Marshall et *al*., 2008).

Plusieurs études ont rapporté que des haploinsuffisances du gène *SHANK3*, localisé dans la zone subterminale de la région 22q13, seraient responsables des déficits neurologiques rencontrés dans le syndrome délétionnel 22q13 (Wilson H.L., 2003, Bonaglia MC, 2001). Des délétions de novo du gène *SHANK3* ont été décrites dans des familles d'autistes (Durand *et al*., 2007, Moessner *et al*., 2007). Pour cette étude, nous avons choisi la technique de MLPA associée à la QPCR. La MLPA est une méthode alternative à la CGH-array permettant un pré-criblage de CNV. C'est une méthode peu coûteuse, rapide à mettre en œuvre, qui permet l'analyse simultanée de plusieurs patients au niveau de régions ciblées du génome, candidates dans l'autisme. Les 35 sondes MLPA couvrant la région 22q13 nous ont permis d'explorer les CNV de la région avec une résolution moyenne de 570kb à 50kb pour la partie q terminale. L'association de la QPCR et de la MLPA permet de mettre en évidence des CNV de petite taille par rapport à la technique de FISH. Nous avons ainsi recherché des CNV dans la région 22q13 chez 131 patients autistes. Nous avons pu détecter une délétion de la région subtélomérique 22q13, correspondant à une région couverte par les sondes MLPA ALG12-EX10 à RABL2B-EX9-2, c'est-à-dire au moins 1,1 Mb chez un patient. Ces résultats ont été confirmés par une QPCR réalisée sur les gènes *MLC1*, *SBF1* et *SHANK3*. Cette délétion est *de novo*, nous ne l'avons pas observée chez les parents de ce patient. Le patient pour lequel nous avons identifié une délétion dans la région 22q13 est issu de la banque d'ADN de la Fondation Autisme. Cette cohorte de patients autistes est utilisée en recherche par plusieurs équipes de la communauté scientifique française. Conjointement à notre recherche, une étude de CNV a été réalisée et publiée par l'équipe de D. Campion (Guilmatre *et al*., 2009) sur les patients de cette cohorte. Les auteurs ont rapporté une délétion *de novo* dans la région 22q13 pour le même patient, confirmant ainsi ce que nous avions observé, ils n'ont pas observé par CGH-array d'autres CNV chez ce patient, ceci suggère que ce CNV puisse être causal dans la pathologie. Afin de définir un rôle potentiel des gènes situés dans la région délétée, il serait nécessaire de faire une recherche de mutation dans ces gènes par séquençage. Une étude d'expression permettrait également de mettre en évidence une éventuelle haploinsuffisance de certains d'entre eux.

Aucun CNV dans la région 22q13 n'a été identifié sur les ADN de notre banque (86 patients). Le faible nombre de patients inclus dans cet étude pourrait en être la cause et ne

permettait peut être pas d'identifier des CNV dans cette région contrairement à d'autres études menées sur de plus grandes cohortes (Sebat *et al*., 2007, Moessner *et al*., 2007, Durand *et al*., 2007, Christian *et al*., 2008, Marshall *et al.*, 2008, Guilmatre *et al.*, 2009).

Tableau 23 : Fréquence des CNV dans la région 22q13

Références	ASD	CNV 22q13 de novo		CNV 22q13 hérité		Fq %
		Nombre	Taille	Nombre	Taille	
Marshall 2008	427	2	del 3Mb, dup 1,4Mb	2	del 80kb, dup 600kb	0,94
Christian 2008	397 (agre)			1	dup 570kb	0,25
Sebat 2007	264 (agre)	1	del 4,3Mb			0,38
Moessner 2007	400	2	del 277kb et 4,4Mb			0,5
Durand 2007	227	1	del 142kb			0,44
Sykes 2009	76	0		0		0
Guilmatre 2009	260	2	del 2,26Mb et ND			0,77

D'après ces études, on peut estimer une fréquence moyenne de CNV dans cette région à 0,47% (la fréquence la plus élevée est celle de l'étude de Marshall avec 0,94%). Une étude de CNV de la région 22q13 et du gène *SHANK3* réalisée chez 76 patients autistes italiens n'a pas permis d'identifier de CNV ni de mutation du gène *SHANK3* (Sykes *et al*., 2009). Ceci suggère que les variants identifiés dans cette région restent rares. Les CNV rapportés au niveau du gène *SHANK3* ont principalement été observés chez des autistes présentant un retard mental sévère. Nous envisageons de poursuivre cette étude en augmentant le nombre de patient et en identifiant des sous groupes de patients en fonction de leur QI. Il serait également intéressant d'étendre cette étude à notre cohorte de patients déficients mentaux ceci permettrait de mieux comprendre le rôle de *SHANK3* dans la physiopathologie de l'autisme et de la déficience mentale.

La dernière partie de notre travail a consisté en l'étude de polymorphismes de nombre de copie par PCR quantitative en temps réel dans l'autisme.

A l'ère de la CGH-array, nous avons choisi d'explorer le génome de nos patients autistes par QPCR. Plusieurs raisons ont dicté ce choix, tout d'abord l'absence sur site de plateforme CGH-array, ensuite la spécificité et la sensibilité de la technique de QPCR, son coût et sa rapidité de mise en œuvre. La CGH-array permet de balayer l'ensemble du génome pour la recherche de CNV, cependant les sondes ne sont pas systématiquement localisées dans les régions géniques d'intérêt. L'avantage de la QPCR est de pouvoir rechercher des CNV directement au niveau des gènes d'intérêt mais aussi de pouvoir rechercher dans des régions

de susceptibilité des CNV de petites tailles (<50kb) qui restent actuellement peu explorés par la CGH-array. Il est difficile de comparer les deux techniques en termes de coût, on peut cependant estimer que l'analyse par CGH-array des variations de plus de deux millions de marqueurs, chez un patient, revient à 500 euros. Le protocole de QPCR employé dans ce travail nous permet d'estimer que l'analyse de 30 gènes chez 24 patients revient à 220 euros, par ailleurs celle-ci peut être réalisée en une journée. Une étude par CGH-array nécessite trois jours d'expérimentation. Les coûts de ces techniques sont modulés en fonction du nombre de patients à analyser et diffèrent selon le fabricant de réactifs. La CGH-array est une technique qui génère très rapidement un grand nombre de données et qui nécessitent un traitement informatique et statistique approprié. Enfin un des avantages de la QPCR est que la recherche de gènes candidats est directement ciblée dans des régions liées à la pathologie. L'exploration du génome entier par CGH-array peut révéler des CNV dans plusieurs régions du génome et le lien avec la pathologie n'est pas toujours aisé à établir.

Après le choix de la technique d'exploration des CNV, nous avons été confrontés au choix des gènes contrôles, indispensables pour la normalisation des données de QPCR. Plusieurs gènes de référence ont été préconisés par la littérature le plus souvent dans le cadre d'études d'expression par RT-QPCR, ainsi un guide des bonnes pratiques en matière d'expérimentation par QPCR (le MIQE) a été publié (Bustin *et al*., 2009). Certaines consignes de ce guide peuvent être utilisées dans la cadre d'une recherche de CNV par QPCR, mais concernant le choix du ou des gènes de référence, la plupart des gènes contrôles recommandés par le MIQE sont localisés dans des régions connues de CNV d'après la base de donnée des variants génomiques (DGV). Il en est de même pour les gènes publiés dans la plupart des études de recherche de CNV par QPCR, cependant la majorité de ces études ne sont pas réalisées pour une recherche en aveugle de CNV mais pour la validation des données de CGH-array. Notre choix s'est porté sur le gène *HEM3* localisé en 11q23 qui a été publié par Weksberg (2005) lors d'une étude de CNV de la région 22q11 par QPCR. Le gène *HEM3* code une hydroxyméthylbilane synthase qui intervient dans la production de l'hème des érythrocytes. Ce gène n'est pas dans une région génomique où des CNV ont été référencés par la DGV, il n'est pas non plus dans une région de susceptibilité de l'autisme. Nous avons par ailleurs suivi les recommandations du MIQE, qui préconise l'utilisation de deux gènes de référence pour la validation des données de QPCR. Nous avons donc choisi un deuxième gène, *ALB*, localisé en 4q13 et publié par Rouleau (2009), car lui non plus n'est pas situé dans une région chromosomique liée à l'autisme.

Lors de notre approche de recherche de CNV par QPCR, nous avons été confrontés à un autre problème qui était l'absence de témoins positif pour les gènes étudiés. C'est pour cette raison que dans un premier temps, notre recherche a porté sur des gènes localisés sur le chromosome X. Notre méthode devait au moins nous permettre de discriminer les patients masculins (ayant une copie de gène) des patients féminins (ayant deux copies de gènes), afin que lorsque l'étude porterait sur des gènes autosomiques, nous puissions faire la différence entre 1, 2 et 3 copies de gène.

L'étude réalisée sur le chromosome X a porté sur 6 gènes : *NLGN4X, PTCHD1, NLGN3, GRIA3, UPF3B* et *UBE2A*. Nous avons choisi ces gènes parce que certains des CNV avaient déjà été décrits dans l'autisme ou la déficience mentale (Laumonnier *et al*, 2004, Marshall *et al*., 2008, Chiyonobu *et al*., 2007). Pour les autres, des mutations avaient été décrites chez des patients autistes ou déficients mentaux (Nascimento *et al*., 2006, Tarpey *et al*., 2007). Parmi ces 6 gènes, 4 étaient déjà étudiés au laboratoire (*NLGN4X, PTCHD1, UPF3B* et *UBE2A*), notamment pour la recherche de mutation chez des patients autistes et déficients mentaux ; ainsi les gènes *NLGN4X* et *UPF3B* ont fait l'objet de publications (Laumonnier *et al.*, 2004, 2010).

Certains patients présentaient des valeurs normalisées extrêmes de QPCR souvent difficiles à interpréter ; c'est le cas lorsque, par exemple, des filles ont un nombre de copie proche de celui des valeurs maximales des garçons ou vice versa. La QPCR est une technique très sensible à la qualité de l'ADN utilisé dans les analyses. La variabilité des données observées pourrait provenir d'une dégradation de certains ADN notamment parmi les plus anciens, ceci malgré une sélection qualitative rigoureuse. De plus, nous avons travaillé sur de faibles dilutions, elles ont été refaites régulièrement au cours de l'étude, les ADN dilués restent plus sensibles à la dégradation que des solutions plus concentrées. La fiabilité des QPCR nécessite que tous les ADN aient été extraits selon le même protocole, ce qui a été le cas des ADN de notre banque, cependant ils n'ont pas tous été extraits simultanément, ceci peut aussi induire un biais. Enfin nous avons travaillé avec des QPCR ayant une efficacité comprise entre 80 et 110%. Nous avons pu observer de légères variations d'efficacité de QPCR d'un échantillon à l'autre, ce qui peut également expliquer la variabilité des résultats. Afin de nous affranchir au mieux des faux positifs, nous avons décidé de fixer un intervalle de tolérance correspondant à la moyenne des valeurs de l'ensemble des échantillons ± 2 écarts types (adaptée de Kindich *et al.*, 2005). Dans le cas des gènes situés sur le chromosome X un intervalle a été déterminé pour les deux populations, garçons et filles.

Ainsi les données normalisées obtenues avec notre protocole expérimental nous ont permis de distinguer sans ambiguïté 2 populations de patients pour les gènes *NLGN4X, PTCHD1, NLGN3, GRIA3 UPF3B et UBE2A.* Notre approche méthodologique de recherche de CNV par QPCR nous permet de pouvoir distinguer des variations de 1 à 2 copies d'un fragment d'ADN. Aucun variant suspect de CNV n'a été détecté dans notre cohorte sur ces 6 gènes.

Nous avons ensuite étudié un premier gène autosomique chez une trentaine de patients et ainsi pu mettre en évidence une délétion dans le gène *SOD1* chez un patient du service de neurologie du CHRU de Tours pour lequel cette délétion avait déjà été identifiée par le service de biochimie du CHRU de Tours pour le diagnostic de sclérose latérale amyotrophique.

Notre travail nous permet donc de proposer une approche méthodologique par QPCR pour la détection de CNV dans des régions ciblées du génome. Cette approche présente un certain nombre d'avantages :

- Sa flexibilité, un criblage de plusieurs gènes est possible dans des expériences indépendantes.
- Sa rapidité de mise en œuvre, une expérience dure moins d'1 heure.
- Sa sensibilité, des variations de 1, 2 ou 3 copies de fragments d'ADN peuvent être détectées.
- Son coût.

Cette méthode pourrait être une bonne alternative à la CGH-array en pré-exploration, pour des gènes candidats dans l'autisme ou la déficience mentale. En effet, compte tenu de son coût, il semble difficile de proposer une étude systématique du génome complet de chaque patient par CGH-array. En revanche, en présence d'un CNV, la CGH-array permet une caractérisation plus fine de ce dernier.

Au cours de ce travail nous avons recherché des CNV par QPCR sur 30 gènes répartis sur l'ensemble du génome. Ces gènes ont été choisis essentiellement par rapport à la publication d'Abrahams et Geschwind (2008) qui ont référencés des régions chromosomiques et des gènes impliqués dans l'étiologie de cette pathologie. Par la suite nous avons ajouté les gènes *MDGA2* et *BZRAP1* suite à la publication de Bucan (2009). Les gènes *KCNMA1* et *HRAS* avaient déjà été associés à l'autisme par notre équipe (Laumonnier *et al*., 2006, Hérault *et al.*, 1995). Par ailleurs la voie de l'ubiquitine semble se dessiner comme une voie importante dans l'étiologie de l'autisme (Glessner *et al*., 2009, Tai H.C. et Schumann E.,

2008, Vourc'h *et al.*, 2003), c'est pourquoi les gènes *UBE3A, UBE2C,* et *PARK2* ont été étudiés.

L'étude de CNV sur les autosomes nous a permis de mettre en évidence 27 CNV répartis en 22 duplications et 5 délétions sur 17 gènes localisés sur 15 chromosomes. Au cours de cette étude, nous avons été confrontés, comme pour l'étude précédente sur les gènes du chromosome X, à une variabilité entre échantillons rendant souvent les données difficiles à interpréter. Les ADN à partir desquels nous avons travaillé étaient issus soit de prélèvements sanguins soit de lignées lymphoblastoïdes, or ces dernières sont susceptibles d'induire des faux positifs (Craddock *et al*., 2010), ceci a peut être contribué à la variabilité constatée. Compte tenu du faible nombre d'échantillons et de locus étudiés, plusieurs résultats ne semblaient pas cohérents, en effet des patients présentaient des variations de copies pour plusieurs gènes étudiés. Comparés aux résultats décrits dans la littérature sur de grandes cohortes par CGH-array, il paraissait peu vraisemblable que nous puissions détecter par QPCR un patient présentant plusieurs CNV. Afin d'éviter les faux positif, seul les patients présentant une variation de copie unique pour l'ensemble des gènes étudiés ont été conservés pour des explorations plus approfondies. Seulement 27 CNV sur les 50 préalablement observés ont ainsi été conservés dans le bilan final.

Plusieurs études ont rapporté l'importance des CNV dans l'étiologie de l'autisme. La majorité des auteurs s'accordent sur une proportion d'environ 10% de CNV *de novo* impliqués dans les cas d'autisme sporadique et de 2% de CNV dans les cas familiaux (Sebat *et al*., 2007, Marshall *et al*., 2008, Morrow *et al*., 2008). Si nous faisons le parallèle avec notre étude, nos données rendent compte d'une fréquence plus élevée. Les observations que nous avons faites ne sont que préliminaires et nous ne savons pas si les variations décrites sont *de novo.* Nous avons travaillé dans des régions chromosomiques déjà identifiées comme des zones de CNV impliquées dans l'autisme. Plusieurs auteurs pensent que le nombre de CNV serait supérieur à celui qui est actuellement rapporté, notamment le nombre de CNV de petite taille (<50kb) serait sous évalué (Lupski 2010). Notre étude fait état d'un nombre de duplications plus important que celui de délétions. Cook E.H. et Scherer S.W. (2008) ont rapporté que la plupart du temps les délétions étaient associées à des caractéristiques cliniques, notamment à des dysmorphies, facilement identifiables. Vraisemblablement les caractéristiques phénotypiques des individus porteurs de duplications seraient plus subtiles et entraîneraient une sous-estimation des syndromes micro-duplicationnels. De ce fait, les CNV associés à des duplications seraient moins soumis à la pression de sélection que ceux liés à

des délétions et pourraient donc se maintenir au cours des générations (Cook E.H. et Scherer S.W., 2008).

Parmi les CNV répertoriés dans notre étude, il est intéressant de noter que plusieurs sont portés par des gènes dans lesquels aucun CNV n'a été référencé par la base de données des variants génomiques (DGV, mise à jour de 2009). Ainsi aucun CNV n'a été décrit dans la population générale pour les gènes *ITGA6, TAGLN3, HOXA1, DLG4* et *UBE2C*. Ces gènes constituent des gènes candidats intéressants pour la poursuite de notre étude. Des mutations homozygotes du gène d'*HOXA1* sont responsables du syndrome de Bosley-Salih-Alorainy (BSA) caractérisé entre autre par un strabisme, des malformations cardiovasculaires et parfois des signes autistiques (Bosley et al., 2008). Le gène *HOXA1* appartient à la famille des homéogènes, ces gènes sont extrêmement conservés au cours de l'évolution. Ils ont une importance primordiale au cours du développement embryonnaire. Le gène *ITGA6* codant l'intégrine alpha 6 est impliqué dans 5% des cas d'épidermolyse bulbeuse (Pfender E.G. et Lucky A.W., 2008), maladie rare caractérisée par une peau extrêmement fragile. Le gène *ITGA6* est localisé dans la région 2q31 qui a été liée à l'autisme (Buxbaum J.D., 2001). Le gène *TAGLN3* ou *NP22* code la transgeline 3, qui est une protéine neuronale associée au cytosquelette ; une diminution d'expression de cette protéine a été observée chez des patients atteints de schizophrénie (Masayuki Ito *et al.*, 2005), pathologie partageant des gènes communs avec l'autisme (Guilmatre *et al.*, 2009). Le gène *DLG4* ou *PSD95* code une guanylate kinase qui intervient notamment au niveau des synapses glutamatergiques, cette protéine interagit avec les neuroliguines et les neurexines qui ont été associées à l'autisme et à la déficience mentale (Cline H., 2005). Le gène *UBE2C* qui code une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine est localisé dans une région de liaison à l'autisme (Marshall *et al.*, 2008), par ailleurs d'autres membres de cette famille de protéines (UBE2A et UBE2H) ont été associés à l'autisme et à la déficience mentale (Nascimento *et al.*, 2006, Vourc'h *et al.*, 2003). La protéine UBE2C jouerait également un rôle dans le développement de plusieurs cancers.

Cette étude de CNV par QPCR menée sur 30 gènes localisés sur l'ensemble du génome reste préliminaire. Les variations observées sont situées dans une des extrémités des gènes étudiés de part le choix des amorces de QPCR. Après confirmation de ces premiers résultats, en réalisant de nouvelles expériences de QPCR avec de nouveaux couples d'amorces, nous envisageons une étude par CGH-array pour les patients pour lesquels un CNV est confirmé. Ceci nous permettra de valider les CNV observés mais aussi rechercher la présence éventuelle de nouveaux CNV.

L'objectif principal de cette étude de CNV était de rechercher de nouveaux gènes candidats dans l'autisme. Pour les raisons évoquées précédemment les gènes *ITGA6, TAGLN3, HOXA1, DLG4* et *UBE2C* nous paraissent intéressants. Nous envisageons une étude de ces gènes sur une nouvelle cohorte de patients recrutés au laboratoire. L'évaluation clinique plus détaillée de ces nouveaux patients nous permettrait de travailler sur des groupes d'échantillons plus homogènes et peut être d'associer une anomalie à un profil phénotypique. Une recherche de CNV sera faite au niveau de ces gènes. Si une anomalie est constatée elle pourra être complétée par une étude d'expression par RT-QPCR sur la lignée lymphoblastoïde du patient que nous avons à disposition, ce qui n'était pas systématique pour les patients de la cohorte précédente. Les modèles de culture de cellules souches neurales et de culture de neurones embryonnaires murins développés au laboratoire nous permettent d'envisager des explorations fonctionnelles de ces gènes afin de mieux comprendre leur rôle dans la physiopathologie de l'autisme. Des expériences de surexpression ou d'inhibition de ces gènes dans ces modèles *in vitro* nous renseigneraient sur leur implication dans croissance et la maturation neuronale. La prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire ou la croissance des neurites pourraient être évaluées.

Le deuxième objectif de notre étude de CNV était de proposer une alternative à la CGH-array pour la détection rapide de CNV récurrents dans l'autisme.. Nous proposons de réduire le nombre de locus explorés mais pour chacun d'eux d'étudier au moins 5 gènes. Ainsi pourraient être analysés chez chaque nouveau patient les régions 15q11-13, 16p11.2, 22q13, 7q31, 2p16 et Xp22 qui apparaissent être les plus fréquentes dans la littérature.

CONCLUSION

Les études portant sur la composante génétique de l'autisme se sont multipliées au cours de ses dix dernières années, elles ont mis en relief la complexité de ce syndrome. Les études de liaisons et les études d'association ont contribué à identifier des régions du génome susceptibles de jouer un rôle dans la pathologie. La communauté scientifique a d'abord émis l'hypothèse de gènes ou d'allèles fréquents dans l'autisme. Or actuellement avec le développement des nouvelles techniques d'exploration de l'ensemble du génome a permis l'identification de nombreuses variations rares impliquées dans l'étiologie de l'autisme. Chacun de ces évènements n'est présent que chez un petit nombre d'individus mais la somme de ces variations expliquerait la fréquence élevée de causes génétiques.

L'autisme peut également être lié à des modifications génétiques présentes chez des sujets sains, mais plus fréquentes chez les patients et dans ce cas un deuxième évènement voir un troisième serait nécessaire au développement de la pathologie. Plusieurs études ont démontré que des variations génomiques couvraient un large spectre phénotypique. Ainsi l'autisme, la déficience mentale, le syndrome d'Asperger et la schizophrénie partagent certains facteurs de susceptibilité. La notion de continuum est largement évoquée entre l'autisme et la déficience mentale. Sachant que 70% des autistes ont un QI<70, il est vraisemblable que ces deux pathologies soient liées à des gènes ou des variants qu'ils partagent comme le démontrent les études réalisées sur les gènes *NLGN4X, UPF3B* et *SHANK3*.

Plusieurs familles de gènes intervenant dans certaines voies biologiques sont actuellement mises en cause dans l'autisme et la déficience mentale. Ainsi plusieurs études ont impliqué des gènes de la synapse glutamatergique notamment les gènes *NLGN4X, NLGN3, SHANK3* et *NRXN1*. La voie de l'ubiquitine est également souvent mise en cause dans l'autisme notamment avec les gènes *UBE3A, UBE2H* et *PARK2*. Les gènes *NF1* et *HRAS* intervenant dans la voie GTPase/Ras ont également été associés à l'autisme ou à des déficits intellectuels ; une étude récente du consortium européen sur l'autisme a souligné l'importance de cette voie dans l'autisme.

Les résultats de notre travail s'intègrent dans les concepts actuellement développés dans la physiopathologie de l'autisme et de la déficience mentale. Il semble maintenant admis que l'impact des variants rares soit prépondérant dans les maladies complexes. L'expressivité de ces variants conduirait à une variabilité phénotypique englobant l'autisme, la déficience mentale, la schizophrénie ou encore les troubles de l'attention et de l'hyperactivité (ADHD). Nous avons montré que de rares variants impliqués dans les voies biologiques précédemment citées, pouvaient être associés à la déficience mentale et à l'autisme.

Nos travaux ont mis en évidence une association entre un polymorphisme AAAT d'une séquence *Alu* et une population de patients atteints de déficience mentale non syndromique. Ce polymorphisme pourrait réguler le locus du gène *NF1* ou d'autres loci au cours du développement cérébral. Néanmoins ces travaux suscitent des questions et méritent de plus amples investigations. Quel est le rôle de l'allèle 4 du marqueur GXAlu en tant que facteur de risque dans la déficience mentale ? Comment peut-il agir sur la régulation de l'expression génique et sur quels gènes agit-il ? Existe-t-il une autre anomalie génétique chez les porteurs de l'allèle 4 qui puisse expliquer l'effet observé ? Une exploration du génome des patients et des témoins, porteurs de cet allèle, par CGH-array permettrait de savoir si d'autres variations pourraient être impliquées. L'effet régulateur du marqueur GXAlu sur l'expression génique pourrait être évalué par une étude avec des puces d'expression sur les lignées des patients.

Les mutations du gène *NLGN4X* identifiées chez des patients autistes ou déficients mentaux sont généralement associées à une perte de fonction de la protéine. Nous avons montré qu'une mutation de ce gène était associée à un gain de fonction chez un patient autiste avec retard mental. Quelles peuvent être les conséquences fonctionnelles des mutations *NLGN4X* ? Quel phénomène va faire pencher la balance perte/gain de fonction de la protéine dans un sens ou dans l'autre ? Comment des déficits cognitifs peuvent ils être liés à la fois à des gains et des pertes de fonction de la même protéine ? Le séquençage du génome complet de ce patient permettrait de savoir s'il existe d'autres variants. Cela permettrait de renforcer ou non notre hypothèse selon laquelle la mutation du promoteur seul suffit à provoquer une variation d'expression du transcrit. Des expériences de doubles hybrides nous permettraient d'identifier les facteurs se fixant préférentiellement sur le promoteur *NLGN4X* muté. Elles nous informeraient sur la voie de régulation de la protéine mise en jeu chez ce patient.

Nous avons exploré la région 22q13 liée à l'autisme chez 131 patients. Nos travaux ont mis en évidence une délétion *de novo* chez un patient. Bien que inférieures à 1%, les délétions de la région 22q13 apparaissent parmi les plus fréquentes dans l'autisme et la déficience mentale. C'est une région qui mérite d'être étudiée de manière plus approfondie, afin de comprendre l'implication des gènes de cette zone dans la pathologie et de pouvoir par la suite proposer aux familles de patients des stratégies de diagnostic voire de traitement. Nos travaux même s'ils n'ont révélé pour le moment qu'une délétion dans la région q terminale du chromosome 22 chez un seul patient, vont nous permettre de poursuivre notre recherche sur les gènes touchés par cette délétion. Une exploration par des techniques de reséquençage des gènes délétés reste nécessaire avant de pouvoir affirmer si ce CNV est causal. Nous allons

également poursuivre l'exploration chez de nouveaux patients recrutés au laboratoire. En associant les données cliniques aux données génétiques, nous espérons pouvoir mieux définir un profil phénotypique des patients présentant une délétion 22q13.

Nous avons également développé une méthodologie de recherche de CNV par QPCR ciblée sur des gènes candidats dans l'autisme. Vingt sept variants concernant 17 gènes ont été identifiés. Une étude plus approfondie des régions portant ces anomalies par CGH-array nous renseignerait sur la taille de ces CNV, leur localisation et nous indiquerait s'ils contiennent les gènes entiers voir plusieurs gènes. Le caractère *de novo* de ces CNV reste également à confirmer. Nos travaux ont mis en évidence des variations dans les gènes *ITGA6, TAGLN3, HOXA1, DLG4* et *UBE2C* chez lesquels, à ce jour, aucun CNV n'est référencé dans les données de la base des variants génomiques (DGV). Ces gènes pourraient être alors de bons candidats dans l'autisme.

L'identification de nouveaux CNV fait progresser les connaissances sur la structure du génome des patients autistes, la neurobiologie moléculaire et les causes éventuelles de la pathologie. Il ne faut cependant pas perdre de vue que cette identification ne suffit pas à prouver leur implication, elle n'est qu'une première étape vers la compréhension de la maladie et dans les réponses à donner au patient et à sa famille pour la compréhension de sa maladie. Des explorations plus poussées sont nécessaires pour savoir s'ils sont *de novo* ou pas, s'ils sont récurrents dans la population étudiée, s'ils ne sont pas associés à un syndrome monogénique, s'ils existent dans la population générale, s'ils contiennent des gènes candidats pour la pathologie étudiée. La clinique apporte des éléments importants qui permettent avec la corrélation des données génomiques de définir des sous-groupes de patients plus homogènes et ainsi de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

Des avancées considérables ont été réalisées dans la génétique de l'autisme et de la déficience mentale. Elles ont permis de lancer les premières pistes pour une meilleure compréhension de ces deux maladies complexes. Il reste cependant un immense travail d'exploration et de validation à poursuivre, dans la perspective de proposer des stratégies de prévention et des traitements aux patients et à leur famille.

BIBLIOGRAPHIE

Abell F, Krams M, Ashburner J, Passingham R, Friston K, Frackowiak R, Happe F, Frith C, Frith U (1999) The neuroanatomy of autism: a voxel-based whole brain analysis of structural scans. Neuroreport 10:1647-1651

Abrahams BS, Geschwind DH (2008) Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. Nat Rev Genet 9:341-355

Acacio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino-Bizzacchi JM, Junior WP (2005) Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. Prenat Diagn 25:1196-1199

Agostini G, Mancini J, Chabrol B, Villeneuve N, Milh M, George F, Maurel BB, Girard N [Language disorders in children with morphologic abnormalities of the hippocampus.]. Arch Pediatr

Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH (2008) Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. Am J Hum Genet 82:150-159

Aldred S, Moore KM, Fitzgerald M, Waring RH (2003) Plasma amino acid levels in children with autism and their families. J Autism Dev Disord 33:93-97

Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Boudos R, DuBray MB, Oakes TR, Miller JN, Lu J, Jeong EK, McMahon WM, Bigler ED, Lainhart JE (2007) Diffusion tensor imaging of the corpus callosum in Autism. Neuroimage 34:61-73

Allen-Brady K, Miller J, Matsunami N, Stevens J, Block H, Farley M, Krasny L, Pingree C, Lainhart J, Leppert M, McMahon WM, Coon H (2009) A high-density SNP genome-wide linkage scan in a large autism extended pedigree. Mol Psychiatry 14:590-600

Alvarez Retuerto AI, Cantor RM, Gleeson JG, Ustaszewska A, Schackwitz WS, Pennacchio LA, Geschwind DH (2008) Association of common variants in the Joubert syndrome gene (AHI1) with autism. Hum Mol Genet 17:3887-3896

Amir RE, Zoghbi HY (2000) Rett syndrome: methyl-CpG-binding protein 2 mutations and phenotype-genotype correlations. Am J Med Genet 97:147-152

Andari E, Duhamel JR, Zalla T, Herbrecht E, Leboyer M, Sirigu A Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. Proc Natl Acad Sci U S A 107:4389-4394

Andersen IM, Kaczmarska J, McGrew SG, Malow BA (2008) Melatonin for insomnia in children with autism spectrum disorders. J Child Neurol 23:482-485

Anderson GM, Hoshino, Y. (1997) Neurochemical studies of autism. In: Cohen DJV, F.R. (ed) Handbook of autism and pervasive developmental disorders. Vol 2nd ed. Wiley, New York, pp 325-343

Anderson I, Mortimore C (1997) Discontinuation rates of SSRI's and tricyclic antidepressants. Br J Psychiatry 171:87; author reply 87-88

Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, Rea A, Guy M, Lin S, Cook EH, Chakravarti A (2008) A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. Am J Hum Genet 82:160-164

Aronson M, Hagberg B, Gillberg C (1997) Attention deficits and autistic spectrum problems in children exposed to alcohol during gestation: a follow-up study. Dev Med Child Neurol 39:583-587

Ashwood P, Wills S, Van de Water J (2006) The immune response in autism: a new frontier for autism research. J Leukoc Biol 80:1-15

Aylward EH, Minshew NJ, Field K, Sparks BF, Singh N (2002) Effects of age on brain volume and head circumference in autism. Neurology 59:175-183

Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M (1995) Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. Psychol Med 25:63-77

Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P (1998) A clinicopathological study of autism. Brain 121 (Pt 5):889-905

Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW (2008) Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. Am J Hum Genet 82:165-173

Balciuniene J, Feng N, Iyadurai K, Hirsch B, Charnas L, Bill BR, Easterday MC, Staaf J, Oseth L, Czapansky-Beilman D, Avramopoulos D, Thomas GH, Borg A, Valle D, Schimmenti LA, Selleck SB (2007) Recurrent 10q22-q23 deletions: a genomic disorder on 10q associated with cognitive and behavioral abnormalities. Am J Hum Genet 80:938-947

Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E, Madan-Khetarpal S, Surti U, Jackson KE, Asamoah A, Brock PL, Gowans GC, Conway RL, Graham JM, Jr., Medne L, Zackai EH, Shaikh TH, Geoghegan J, Selzer RR, Eis PS, Bejjani BA, Shaffer LG (2007) Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. Nat Genet 39:1071-1073

Bandim JM, Ventura LO, Miller MT, Almeida HC, Costa AE (2003) Autism and Mobius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil. Arq Neuropsiquiatr 61:181-185

Barbouti A, Stankiewicz P, Nusbaum C, Cuomo C, Cook A, Hoglund M, Johansson B, Hagemeijer A, Park SS, Mitelman F, Lupski JR, Fioretos T (2004) The breakpoint region of the most common isochromosome, i(17q), in human neoplasia is characterized by a complex genomic architecture with large, palindromic, low-copy repeats. Am J Hum Genet 74:1-10

Barkovich AJ, Lindan CE (1994) Congenital cytomegalovirus infection of the brain: imaging analysis and embryologic considerations. AJNR Am J Neuroradiol 15:703-715

Barthelemy C, Roux S, Adrien JL, Hameury L, Guerin P, Garreau B, Fermanian J, Lelord G (1997) Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale. J Autism Dev Disord 27:139-153

Bartsch O, Labonte J, Albrecht B, Wieczorek D, Lechno S, Zechner U, Haaf T (2010) Two patients with EP300 mutations and facial dysmorphism different from the classic Rubinstein-Taybi syndrome. Am J Med Genet A 152A:181-184

Basel-Vanagaite L (2008) Clinical approaches to genetic mental retardation. Isr Med Assoc J 10:821-826

Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, Ferland RJ, Anteki L, Walsh CA, Olender T, Straussberg R, Magal N, Taub E, Drasinover V, Alkelai A, Bercovich D, Rechavi G, Simon AJ, Shohat M (2006) The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. J Med Genet 43:203-210

Bauman M, Kemper TL (1985) Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. Neurology 35:866-874

Bauman ML (1996) Brief report: neuroanatomic observations of the brain in pervasive developmental disorders. J Autism Dev Disord 26:199-203

Bauman ML, Kemper, T.L. (1994) Neuroanatomical observations of brain in autism. In: Bauman MLK, T.L. (ed) The Neurobiology of Autism. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 119-145

Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Ignatius J, Raynaud M, Hollanders K, Govaerts K, Vandenreijt K, Niel F, Blanc P, Stevenson RE, Fryns JP, Marynen P, Schwartz CE, Froyen G (2008) Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. Genome Res 18:847-858

Beleza-Meireles A, Kockum I, Yuan QP, Picelli S, Wetterberg L, Gustavson KH, Schalling M (2008) Complex aetiology of an apparently Mendelian form of mental retardation. BMC Med Genet 9:6

Belik J (2008) Fetal and neonatal effects of maternal drug treatment for depression. Semin Perinatol 32:350-354

Benvenuto A, Manzi B, Alessandrelli R, Galasso C, Curatolo P (2009) Recent advances in the pathogenesis of syndromic autisms. Int J Pediatr 2009:198736

Berg JS, Brunetti-Pierri N, Peters SU, Kang SH, Fong CT, Salamone J, Freedenberg D, Hannig VL, Prock LA, Miller DT, Raffalli P, Harris DJ, Erickson RP, Cunniff C, Clark GD, Blazo MA, Peiffer DA, Gunderson KL, Sahoo T, Patel A, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW (2007) Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. Genet Med 9:427-441

Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? Brain Res Brain Res Rev 28:309-369

Bethea TC, Sikich L (2007) Early pharmacological treatment of autism: a rationale for developmental treatment. Biol Psychiatry 61:521-537

Bettelheim B (1969) La forteresse vide, Paris

Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T, Shinder V, Peiffer DA, Gunderson KL, Nezarati MM, Shotts VA, Amato SS, Savage SK, Harris DJ, Day-Salvatore DL, Horner M, Lu XY, Sahoo T, Yanagawa Y, Beaudet AL, Cheung SW, Martinez S, Lupski JR, Reiner O (2009) Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. Nat Genet 41:168-177

Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G, Bahi N, Beaumont D, Fauchereau F, Ben Jeema L, Zemni R, Vinet MC, Francis F, Couvert P, Gomot M, Moraine C, van Bokhoven H, Kalscheuer V, Frints S, Gecz J, Ohzaki K, Chaabouni H, Fryns JP, Desportes V, Beldjord C, Chelly J (2002) ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. Hum Mol Genet 11:981-991

Biselli JM, Machado FB, Zampieri BL, Alves da Silva AF, Goloni-Bertollo EM, Haddad R, Eberlin MN, Vannucchi H, Carvalho VM, Medina-Acosta E, Pavarino-Bertelli EC (2009) Double aneuploidy (48,XXY,+21) of maternal origin in a child born to a 13-year-old mother: evaluation of the maternal folate metabolism. Genet Couns 20:225-234

Bittigau P, Ikonomidou C (1997) Glutamate in neurologic diseases. J Child Neurol 12:471-485

Blasi F, Bacchelli E, Pesaresi G, Carone S, Bailey AJ, Maestrini E (2006) Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4 in individuals with autism from the IMGSAC collection. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 141B:220-221

Bocian E, Helias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska-Kazmierczak A, Stankiewicz P, Kostyk E, Mazurczak T (2004) Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. Med Sci Monit 10:CR143-151

Boddaert N, Chabane N, Belin P, Bourgeois M, Royer V, Barthelemy C, Mouren-Simeoni MC, Philippe A, Brunelle F, Samson Y, Zilbovicius M (2004a) Perception of complex sounds in autism: abnormal auditory cortical processing in children. Am J Psychiatry 161:2117-2120

Boddaert N, Chabane N, Gervais H, Good CD, Bourgeois M, Plumet MH, Barthelemy C, Mouren MC, Artiges E, Samson Y, Brunelle F, Frackowiak RS, Zilbovicius M (2004b) Superior temporal sulcus anatomical abnormalities in childhood autism: a voxel-based morphometry MRI study. Neuroimage 23:364-369

Bolton PF, Park RJ, Higgins JN, Griffiths PD, Pickles A (2002) Neuro-epileptic determinants of autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. Brain 125:1247-1255

Bosley TM, Alorainy IA, Salih MA, Aldhalaan HM, Abu-Amero KK, Oystreck DT, Tischfield MA, Engle EC, Erickson RP (2008) The clinical spectrum of homozygous HOXA1 mutations. Am J Med Genet A 146A:1235-1240

Bower P, Sibbald B (2000) Systematic review of the effect of on-site mental health professionals on the clinical behaviour of general practitioners. Bmj 320:614-617

Brambilla P, Hardan A, di Nemi SU, Perez J, Soares JC, Barale F (2003) Brain anatomy and development in autism: review of structural MRI studies. Brain Res Bull 61:557-569

Brennan FX, Albeck DS, Paylor R (2006) Fmr1 knockout mice are impaired in a leverpress escape/avoidance task. Genes Brain Behav 5:467-471

Brosius J (1999) RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements. Gene 238:115-134

Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. Cell 107:477-487

Brune CW, Korvatska E, Allen-Brady K, Cook EH, Jr., Dawson G, Devlin B, Estes A, Hennelly M, Hyman SL, McMahon WM, Munson J, Rodier PM, Schellenberg GD, Stodgell CJ, Coon H (2008) Heterogeneous association between engrailed-2 and autism in the CPEA network. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B:187-193

Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben-Shushan A, Ford I (2005) Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. Sleep Med Rev 9:41-50

Bucan M, Abrahams BS, Wang K, Glessner JT, Herman EI, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, et al. (2009) Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. PLoS Genet 5:e1000536

Buitelaar JK, Willemsen-Swinkels SH (2000) Medication treatment in subjects with autistic spectrum disorders. Eur Child Adolesc Psychiatry 9 Suppl 1:I85-97

Bulayeva KB, Leal SM, Pavlova TA, Kurbanov RM, Glatt SJ, Bulayev OA, Tsuang MT (2005) Mapping genes of complex psychiatric diseases in Daghestan genetic isolates. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 132B:76-84

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55:611-622

Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C (2005) Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. J Med Genet 42:318-321

Buxbaum JD, Cai G, Chaste P, Nygren G, Goldsmith J, Reichert J, Anckarsater H, Rastam M, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, Leboyer M, Gillberg C, Verloes A, Betancur C (2007) Mutation screening of the PTEN gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B:484-491

Buxbaum JD, Silverman JM, Smith CJ, Kilifarski M, Reichert J, Hollander E, Lawlor BA, Fitzgerald M, Greenberg DA, Davis KL (2001) Evidence for a susceptibility gene for autism on chromosome 2 and for genetic heterogeneity. Am J Hum Genet 68:1514-1520

Campbell DB, Buie TM, Winter H, Bauman M, Sutcliffe JS, Perrin JM, Levitt P (2009) Distinct genetic risk based on association of MET in families with co-occurring autism and gastrointestinal conditions. Pediatrics 123:1018-1024

Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S, Elia M, Schneider C, Melmed R, Sacco R, Persico AM, Levitt P (2006) A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. Proc Natl Acad Sci U S A 103:16834-16839

Canitano R (2007) Epilepsy in autism spectrum disorders. Eur Child Adolesc Psychiatry 16:61-66

Cantor RM, Kono N, Duvall JA, Alvarez-Retuerto A, Stone JL, Alarcon M, Nelson SF, Geschwind DH (2005) Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21. Am J Hum Genet 76:1050-1056

Carlson BX, Elster L, Schousboe A (1998) Pharmacological and functional implications of developmentally-regulated changes in GABA(A) receptor subunit expression in the cerebellum. Eur J Pharmacol 352:1-14

Carper RA, Moses P, Tigue ZD, Courchesne E (2002) Cerebral lobes in autism: early hyperplasia and abnormal age effects. Neuroimage 16:1038-1051

Carter CS (2003) Developmental consequences of oxytocin. Physiol Behav 79:383-397

Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, Henrique R, Zhang Z, Hoque MO, Chang S, Brait M, Nayak CS, Jiang WW, Claybourne Q, Tokumaru Y, Lee J, Goldenberg D, Garrett-Mayer E, Goodman S, Moon CS, Koch W, Westra WH, Sidransky D, Califano JA (2008) Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 14:97-107

Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E (2002) Minicolumnar pathology in autism. Neurology 58:428-432

CFTMEA-R (2000) Centre technique national d'études et de recherches sur les handicaps et les inadaptations (CTNHRI). La classification française des troubles mentaux de l'enfants et de l'adolescent (CFTMEA). Paris

Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY (2008) MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. Science 320:1224-1229

Chamberlain RS, Herman BH (1990) A novel biochemical model linking dysfunctions in brain melatonin, proopiomelanocortin peptides, and serotonin in autism. Biol Psychiatry 28:773-793

Chao HT, Zoghbi HY, Rosenmund C (2007) MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number. Neuron 56:58-65

Chelly J, Khelfaoui M, Francis F, Cherif B, Bienvenu T (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. Eur J Hum Genet 14:701-713

Chess S (1971) Autism in children with congenital rubella. J Autism Child Schizophr 1:33-47

Chess S (1977) Follow-up report on autism in congenital rubella. J Autism Child Schizophr 7:69-81

Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. Science 307:1324-1328

Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G (2008) XLMR genes: update 2007. Eur J Hum Genet 16:422-434

Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A, Nishimoto A, Ito C, Imoto I, Sugimoto T, Jia Z, Inazawa J, Toda T (2007) Partial tandem duplication of GRIA3 in a male with mental retardation. Am J Med Genet A 143A:1448-1455

Choy KW, Setlur SR, Lee C, Lau TK (2010) The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. BJOG 117:391-398

Christian SL, Brune CW, Sudi J, Kumar RA, Liu S, Karamohamed S, Badner JA, Matsui S, Conroy J, McQuaid D, Gergel J, Hatchwell E, Gilliam TC, Gershon ES, Nowak NJ, Dobyns WB, Cook EH, Jr. (2008) Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. Biol Psychiatry 63:1111-1117

Chugani DC, Muzik O, Behen M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J, Chugani HT (1999) Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. Ann Neurol 45:287-295

Chugani DC, Muzik O, Rothermel R, Behen M, Chakraborty P, Mangner T, da Silva EA, Chugani HT (1997) Altered serotonin synthesis in the dentatothalamocortical pathway in autistic boys. Ann Neurol 42:666-669

Chuzhanova NA, Anassis EJ, Ball EV, Krawczak M, Cooper DN (2003) Meta-analysis of indels causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. Hum Mutat 21:28-44

Ciardo F, Salerno C, Curatolo P (2001) Neurologic aspects of adenylosuccinate lyase deficiency. J Child Neurol 16:301-308

Cline H (2005) Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. Curr Biol 15:R203-205

Cohen D, Pichard, N., Tordjman, S., Baumann, C., Burglen, L., Excoffier, E., Lazar, G., Mazet, P., Pinquier, C., Verloes, A., Héron, D. (2005) Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. J Autism Dev Disord Feb; 35:103-116

Constantino JN, Zhang Y, Frazier T, Abbacchi AM, Law P (2010) Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. Am J Psychiatry 167:1349-1356

Cook EH, Jr., Leventhal BL, Heller W, Metz J, Wainwright M, Freedman DX (1990) Autistic children and their first-degree relatives: relationships between serotonin and norepinephrine levels and intelligence. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2:268-274

Cook EH, Jr., Scherer SW (2008) Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. Nature 455:919-923

Cook EH, Leventhal BL (1996) The serotonin system in autism. Curr Opin Pediatr 8:348-354

Cote F, Fligny C, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J, Vodjdani G (2007) Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. Proc Natl Acad Sci U S A 104:329-334

Courchesne E, Karns CM, Davis HR, Ziccardi R, Carper RA, Tigue ZD, Chisum HJ, Moses P, Pierce K, Lord C, Lincoln AJ, Pizzo S, Schreibman L, Haas RH, Akshoomoff NA, Courchesne RY (2001) Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. Neurology 57:245-254

Courchesne E, Townsend J, Saitoh O (1994) The brain in infantile autism: posterior fossa structures are abnormal. Neurology 44:214-223

Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, Vukcevic D, et al. (2010) Genome-wide association study of CNV in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. Nature 464:713-720

Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL (2001) FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. Genet Med 3:359-371

Crino PB, Nathanson KL, Henske EP (2006) The tuberous sclerosis complex. N Engl J Med 355:1345-1356

Croonenberghs J, Wauters A, Devreese K, Verkerk R, Scharpe S, Bosmans E, Egyed B, Deboutte D, Maes M (2002) Increased serum albumin, gamma globulin, immunoglobulin IgG, and IgG2 and IgG4 in autism. Psychol Med 32:1457-1463

Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S (2008) Tuberous sclerosis. Lancet 372:657-668

Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jr., Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. Am J Med Genet 72:468-477

Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Brugues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA (2008) Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. Genome Res 18:683-694

DA. A (1988) Autistic spectrum disorders: clinical presentation in preschool children. J Child Neurol 3

Daoud H, Bonnet-Brilhault F, Vedrine S, Demattei MV, Vourc'h P, Bayou N, Andres CR, Barthelemy C, Laumonnier F, Briault S (2009) Autism and nonsyndromic mental retardation associated with a de novo mutation in the NLGN4X gene promoter causing an increased expression level. Biol Psychiatry 66:906-910

Dapretto M, Davies MS, Pfeifer JH, Scott AA, Sigman M, Bookheimer SY, Iacoboni M (2006) Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. Nat Neurosci 9:28-30

De Giacomo A, Fombonne E (1998) Parental recognition of developmental abnormalities in autism. Eur Child Adolesc Psychiatry 7:131-136

de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM (2001) Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. J Med Genet 38:145-150

De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C (2003) Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. J Med Genet 40:385-398

del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, Neul JL, Patel A, Lee JA, Irons M, Berry SA, Pursley AA, Grebe TA, Freedenberg D, Martin RA, Hsich GE, Khera JR, Friedman NR, Zoghbi HY, Eng CM, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW, Roa BB (2006) Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. Genet Med 8:784-792

Derti A, Roth FP, Church GM, Wu CT (2006) Mammalian ultraconserved elements are strongly depleted among segmental duplications and copy number variants. Nat Genet 38:1216-1220

DeStefano F (2007) Vaccines and autism: evidence does not support a causal association. Clin Pharmacol Ther 82:756-759

Devlin B, Cook EH, Jr., Coon H, Dawson G, Grigorenko EL, McMahon W, Minshew N, Pauls D, Smith M, Spence MA, Rodier PM, Stodgell C, Schellenberg GD (2005) Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. Mol Psychiatry 10:1110-1116

Di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. Curr Opin Pharmacol 7:69-76

Doja A, Roberts W (2006) Immunizations and autism: a review of the literature. Can J Neurol Sci 33:341-346

Dooley AE, Pappas IS, Parnavelas JG (1997) Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons in vitro. Exp Neurol 148:205-214

DSM-IV-TR (2003) Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, Paris

Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. Nat Genet 39:25-27

Dutta S, Chatterjee A, Sinha S, Chattopadhyay A, Mukhopadhyay K (2009) Correlation between cystathionine beta synthase gene polymorphisms, plasma homocysteine and idiopathic mental retardation in Indian individuals from Kolkata. Neurosci Lett 453:214-218

Dutta S, Das Bhowmik A, Sinha S, Chattopadhyay A, Mukhopadhyay K (2008) Screening for methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms in Indian patients with idiopathic mental retardation. Nutr Neurosci 11:18-24

Duvall JA, Lu A, Cantor RM, Todd RD, Constantino JN, Geschwind DH (2007) A quantitative trait locus analysis of social responsiveness in multiplex autism families. Am J Psychiatry 164:656-662

Egaas B, Courchesne E, Saitoh O (1995) Reduced size of corpus callosum in autism. Arch Neurol 52:794-801

EURO-MRX EUROPEAN MENTAL RETARDATION CONSORTIUM. In: Brouwer DAPMd (ed), Nijmegen

Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, Carver V, Benke P, Mundy P, Elsas LJ (2007) Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. Hum Mutat 28:1124-1132

Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist DA, Thuras P, Merz A (2002) Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. Cell Mol Neurobiol 22:171-175

Feingold J (2005) [Multifactorial diseases: a nightmare for the geneticist]. Med Sci (Paris) 21:927-933

Filipek PA, Accardo PJ, Baranek GT, Cook EH, Jr., Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin S, Tuchman RF, Volkmar FR (1999) The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. J Autism Dev Disord 29:439-484

Fiumara A, Sciotto A, Barone R, D'Asero G, Munda S, Parano E, Pavone L (1999) Peripheral lymphocyte subsets and other immune aspects in Rett syndrome. Pediatr Neurol 21:619-621

Flores M, Morales L, Gonzaga-Jauregui C, Dominguez-Vidana R, Zepeda C, Yanez O, Gutierrez M, Lemus T, Valle D, Avila MC, Blanco D, Medina-Ruiz S, Meza K, Ayala E, Garcia D, Bustos P, Gonzalez V, Girard L, Tusie-Luna T, Davila G, Palacios R (2007) Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome. Proc Natl Acad Sci U S A 104:6099-6106

Folstein S, Rutter M (1977) Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. J Child Psychol Psychiatry 18:297-321

Folstein SE, Rosen-Sheidley B (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. Nat Rev Genet 2:943-955

Folstein SE, Santangelo SL, Gilman SE, Piven J, Landa R, Lainhart J, Hein J, Wzorek M (1999) Predictors of cognitive test patterns in autism families. J Child Psychol Psychiatry 40:1117-1128

Fombonne E (2003) The prevalence of autism. Jama 289:87-89

Fombonne E (2009) Epidemiology of pervasive developmental disorders. Pediatr Res 65:591-598

Freedman DX, Belendiuk K, Belendiuk GW, Crayton JW (1981) Blood tryptophan metabolism in chronic schizophrenics. Arch Gen Psychiatry 38:655-659

Freitag CM (2007) The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. Mol Psychiatry 12:2-22

Freitag CM, Staal W, Klauck SM, Duketis E, Waltes R (2010) Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. Eur Child Adolesc Psychiatry 19:169-178

Friedman JM (1999) Epidemiology of neurofibromatosis type 1. Am J Med Genet 89:1-6

Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP (2002) X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. Clin Genet 62:423-432

Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, et al. (2008) Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. Am J Hum Genet 82:432-443

Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SG, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P (2007) Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. Hum Mutat 28:1034-1042

Gallagher L, Hawi Z, Kearney G, Fitzgerald M, Gill M (2004) No association between allelic variants of HOXA1/HOXB1 and autism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 124B:64-67

Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F, Tzschach A, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW (2008) A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. Am J Hum Genet 82:1158-1164

Gauthier J, Bonnel A, St-Onge J, Karemera L, Laurent S, Mottron L, Fombonne E, Joober R, Rouleau GA (2005) NLGN3/NLGN4 gene mutations are not responsible for autism in the Quebec population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 132B:74-75

Gauthier J, Spiegelman D, Piton A, Lafreniere RG, Laurent S, St-Onge J, Lapointe L, Hamdan FF, Cossette P, Mottron L, Fombonne E, Joober R, Marineau C, Drapeau P, Rouleau GA (2009) Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 150B:421-424

Gervais H, Belin P, Boddaert N, Leboyer M, Coez A, Sfaello I, Barthelemy C, Brunelle F, Samson Y, Zilbovicius M (2004) Abnormal cortical voice processing in autism. Nat Neurosci 7:801-802

Gibson JR, Bartley AF, Hays SA, Huber KM (2008) Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. J Neurophysiol 100:2615-2626

Gillberg C, Svennerholm L (1987) CSF monoamines in autistic syndromes and other pervasive developmental disorders of early childhood. Br J Psychiatry 151:89-94

Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, et al. (2009) Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. Nature 459:569-573

Green L, Fein D, Modahl C, Feinstein C, Waterhouse L, Morris M (2001) Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms. Biol Psychiatry 50:609-613

Guastella AJ, Einfeld SL, Gray KM, Rinehart NJ, Tonge BJ, Lambert TJ, Hickie IB Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. Biol Psychiatry 67:692-694

Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Layet V, et al. (2009) Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. Arch Gen Psychiatry 66:947-956

Guo TW, Zhang FC, Yang M, Gao XC, Bian L, Ji Q, Ma J, Gao J, Zheng ZJ, Li RL, Feng GY, He L (2005) Lack of association of the thyroid transcription factor 1 gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. Psychiatr Genet 15:233

Guo TW, Zhang FC, Yang MS, Gao XC, Bian L, Duan SW, Zheng ZJ, Gao JJ, Wang H, Li RL, Feng GY, St Clair D, He L (2004) Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. J Med Genet 41:585-590

Gupta S, Aggarwal S, Rashanravan B, Lee T (1998) Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. J Neuroimmunol 85:106-109

Hadjikhani N, Joseph RM, Snyder J, Chabris CF, Clark J, Steele S, McGrath L, Vangel M, Aharon I, Feczko E, Harris GJ, Tager-Flusberg H (2004) Activation of the fusiform gyrus when individuals with autism spectrum disorder view faces. Neuroimage 22:1141-1150

Hagerman RJ (2006) Lessons from fragile X regarding neurobiology, autism, and neurodegeneration. J Dev Behav Pediatr 27:63-74

Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, Kronk R, Delahunty C, Hessl D, Visootsak J, Picker J, Gane L, Tranfaglia M (2009) Advances in the treatment of fragile X syndrome. Pediatrics 123:378-390

Hagerman RJ, Hagerman PJ (2002) The fragile X premutation: into the phenotypic fold. Curr Opin Genet Dev 12:278-283

Hagerman RJ, Ono MY, Hagerman PJ (2005) Recent advances in fragile X: a model for autism and neurodegeneration. Curr Opin Psychiatry 18:490-496

Han K, Lee J, Meyer TJ, Remedios P, Goodwin L, Batzer MA (2008) L1 recombination-associated deletions generate human genomic variation. Proc Natl Acad Sci U S A 105:19366-19371

Hara H (2007) Autism and epilepsy: a retrospective follow-up study. Brain Dev 29:486-490

Hardan AY, Minshew NJ, Harenski K, Keshavan MS (2001a) Posterior fossa magnetic resonance imaging in autism. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 40:666-672

Hardan AY, Minshew NJ, Mallikarjuhn M, Keshavan MS (2001b) Brain volume in autism. J Child Neurol 16:421-424

Hasler J, Strub K (2006) Alu elements as regulators of gene expression. Nucleic Acids Res 34:5491-5497

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G (2009) Mechanisms of change in gene copy number. Nat Rev Genet 10:551-564

Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT (1991) Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. Epilepsia 32:429-445

Hehir-Kwa JY, Wieskamp N, Webber C, Pfundt R, Brunner HG, Gilissen C, de Vries BB, Ponting CP, Veltman JA (2010) Accurate distinction of pathogenic from benign CNV in mental retardation. PLoS Comput Biol 6:e1000752

Heim C, Young LJ, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB (2009) Lower CSF oxytocin concentrations in women with a history of childhood abuse. Mol Psychiatry 14:954-958

Herault J, Perrot A, Barthelemy C, Buchler M, Cherpi C, Leboyer M, Sauvage D, Lelord G, Mallet J, Muh JP (1993) Possible association of c-Harvey-Ras-1 (HRAS-1) marker with autism. Psychiatry Res 46:261-267

Herault J, Petit E, Martineau J, Cherpi C, Perrot A, Barthelemy C, Lelord G, Muh JP (1996) Serotonin and autism: biochemical and molecular biology features. Psychiatry Res 65:33-43

Herbert MR, Ziegler DA, Deutsch CK, O'Brien LM, Kennedy DN, Filipek PA, Bakardjiev AI, Hodgson J, Takeoka M, Makris N, Caviness VS, Jr. (2005) Brain asymmetries in autism and developmental language disorder: a nested whole-brain analysis. Brain 128:213-226

Herman GE, Butter E, Enrile B, Pastore M, Prior TW, Sommer A (2007a) Increasing knowledge of PTEN germline mutations: Two additional patients with autism and macrocephaly. Am J Med Genet A 143:589-593

Herman GE, Henninger N, Ratliff-Schaub K, Pastore M, Fitzgerald S, McBride KL (2007b) Genetic testing in autism: how much is enough? Genet Med 9:268-274

Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP (2004) A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. Neurology 63:1927-1931

Hollander E, Bartz J, Chaplin W, Phillips A, Sumner J, Soorya L, Anagnostou E, Wasserman S (2007) Oxytocin increases retention of social cognition in autism. Biol Psychiatry 61:498-503

Hollander E, King A, Delaney K, Smith CJ, Silverman JM (2003a) Obsessive-compulsive behaviors in parents of multiplex autism families. Psychiatry Res 117:11-16

Hollander E, Novotny S, Hanratty M, Yaffe R, DeCaria CM, Aronowitz BR, Mosovich S (2003b) Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. Neuropsychopharmacology 28:193-198

Hranilovic D, Bujas-Petkovic Z, Vragovic R, Vuk T, Hock K, Jernej B (2007) Hyperserotonemia in adults with autistic disorder. J Autism Dev Disord 37:1934-1940

Hussman JP (2001) Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. J Autism Dev Disord 31:247-248

Hutcheson HB, Olson LM, Bradford Y, Folstein SE, Santangelo SL, Sutcliffe JS, Haines JL (2004) Examination of NRCAM, LRRN3, KIAA0716, and LAMB1 as autism candidate genes. BMC Med Genet 5:12

Hyman SL, Shores A, North KN (2005) The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. Neurology 65:1037-1044

Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. Nat Genet 36:949-951

Ingram JL, Stodgell CJ, Hyman SL, Figlewicz DA, Weitkamp LR, Rodier PM (2000) Discovery of allelic variants of HOXA1 and HOXB1: genetic susceptibility to autism spectrum disorders. Teratology 62:393-405

Inlow JK, Restifo LL (2004) Molecular and comparative genetics of mental retardation. Genetics 166:835-881

Insel TR, Fernald RD (2004) How the brain processes social information: searching for the social brain. Annu Rev Neurosci 27:697-722

Ito M, Depaz I, Wilce P, Suzuki T, Niwa S, Matsumoto I (2005) Expression of human neuronal protein 22, a novel cytoskeleton-associated protein, was decreased in the anterior cingulate cortex of schizophrenia. Neurosci Lett 378:125-130

Jacob S, Brune CW, Carter CS, Leventhal BL, Lord C, Cook EH, Jr. (2007) Association of the oxytocin receptor gene (OXTR) in Caucasian children and adolescents with autism. Neurosci Lett 417:6-9

Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC, Prieur M, Vekemans M, Carter NP, Munnich A, Colleaux L, Philippe A (2006) Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. J Med Genet 43:843-849

Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T (2002) Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. Mol Psychiatry 7:302-310

Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. Nat Genet 34:27-29

Jorde LB, Hasstedt SJ, Ritvo ER, Mason-Brothers A, Freeman BJ, Pingree C, McMahon WM, Petersen B, Jenson WR, Mo A (1991) Complex segregation analysis of autism. Am J Hum Genet 49:932-938

Josse D (1997) Brunet-Lezine Révisé : Echelle de Développement Psychomoteur
de la Première Enfance. , Paris

Jyonouchi H, Sun S, Le H (2001) Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. J Neuroimmunol 120:170-179

Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann LM, Tzschach A, Shoichet SA, Menzel C, Erdogan F, Arkesteijn G, Ropers HH, Ullmann R (2007) Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. Hum Genet 121:501-509

Kana RK, Keller TA, Cherkassky VL, Minshew NJ, Just MA (2006) Sentence comprehension in autism: thinking in pictures with decreased functional connectivity. Brain 129:2484-2493

Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. Nervous Child 2:217-250

Kanner L, Eisenberg L (1957) Early infantile autism, 1943-1955. Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc:55-65

Kaufmann WE, Abrams MT, Chen W, Reiss AL (1999) Genotype, molecular phenotype, and cognitive phenotype: correlations in fragile X syndrome. Am J Med Genet 83:286-295

Kaufmann WE, Cortell R, Kau AS, Bukelis I, Tierney E, Gray RM, Cox C, Capone GT, Stanard P (2004) Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. Am J Med Genet A 129A:225-234

Kelleher RJ, 3rd, Bear MF (2008) The autistic neuron: troubled translation? Cell 135:401-406

Kemper TL, Bauman ML (1993) The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. Neurol Clin 11:175-187

Kilpinen H, Ylisaukko-Oja T, Hennah W, Palo OM, Varilo T, Vanhala R, Nieminen-von Wendt T, von Wendt L, Paunio T, Peltonen L (2008) Association of DISC1 with autism and Asperger syndrome. Mol Psychiatry 13:187-196

Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, et al. (2008) Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. Am J Hum Genet 82:199-207

Kim IJ, Shin Y, Kang HC, Park JH, Ku JL, Park HW, Park HR, Lim SB, Jeong SY, Kim WH, Park JG (2003) Robust microsatellite instability (MSI) analysis by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). J Hum Genet 48:525-530

Kindich R, Florl AR, Jung V, Engers R, Muller M, Schulz WA, Wullich B (2005) Application of a modified real-time PCR technique for relative gene copy number quantification to the determination of the relationship between NKX3.1 loss and MYC gain in prostate cancer. Clin Chem 51:649-652

Kleibl Z, Havranek O, Prokopcova J (2007) Rapid detection of CAA/CAG repeat polymorphism in the AIB1 gene using DHPLC. J Biochem Biophys Methods 70:511-513

Kolevzon A, Newcorn JH, Kryzak L, Chaplin W, Watner D, Hollander E, Smith CJ, Cook EH, Jr., Silverman JM Relationship between whole blood serotonin and repetitive behaviors in autism. Psychiatry Res 175:274-276

Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA (2002) The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. Genes Chromosomes Cancer 35:97-112

Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA (2004) Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). J Med Genet 41:892-899

Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BB (2009) Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. Hum Mutat 30:283-292

Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, de Leeuw N, Knight SJ, Regan R, Kooy RF, Reyniers E, Romano C, Fichera M, Schinzel A, Baumer A, Anderlid BM, Schoumans J, Knoers NV, van Kessel AG, Sistermans EA, Veltman JA, Brunner HG, de Vries BB (2006) A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. Nat Genet 38:999-1001

Kornhuber J, Mack-Burkhardt F, Konradi C, Fritze J, Riederer P (1989) Effect of antemortem and postmortem factors on [3H]MK-801 binding in the human brain: transient elevation during early childhood. Life Sci 45:745-749

Krakowiak P, Goodlin-Jones B, Hertz-Picciotto I, Croen LA, Hansen RL (2008) Sleep problems in children with autism spectrum disorders, developmental delays, and typical development: a population-based study. J Sleep Res 17:197-206

Kulman G, Lissoni P, Rovelli F, Roselli MG, Brivio F, Sequeri P (2000) Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children. Neuro Endocrinol Lett 21:31-34

Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH, Jr., Dobyns WB, Christian SL (2008) Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. Hum Mol Genet 17:628-638

Kuperman S, Beeghly, J., Burns, T., Tsai, L. (1987) Association of serotonin concentration to behavior and IQ in autistic children. Journal of Autism and Developmental Disorders 17:133-140

Lainhart JE (1997) Developmental abnormalities in autism. Lancet 349:373-374
Lainhart JE, Bigler ED, Bocian M, Coon H, Dinh E, Dawson G, Deutsch CK, Dunn M, Estes A, Tager-Flusberg H, Folstein S, Hepburn S, Hyman S, McMahon W, Minshew N, Munson J, Osann K, Ozonoff S, Rodier P, Rogers S, Sigman M, Spence MA, Stodgell CJ, Volkmar F (2006) Head circumference and height in autism: a study by the Collaborative Program of Excellence in Autism. Am J Med Genet A 140:2257-2274
Lam KW, Jeffreys AJ (2006) Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. Proc Natl Acad Sci U S A 103:8921-8927
Lam KW, Jeffreys AJ (2007) Processes of de novo duplication of human alpha-globin genes. Proc Natl Acad Sci U S A 104:10950-10955
Lamb JA, Barnby G, Bonora E, Sykes N, Bacchelli E, Blasi F, Maestrini E, Broxholme J, Tzenova J, Weeks D, Bailey AJ, Monaco AP (2005) Analysis of IMGSAC autism susceptibility loci: evidence for sex limited and parent of origin specific effects. J Med Genet 42:132-137
Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. Am J Hum Genet 74:552-557
Laumonnier F, Roger S, Guerin P, Molinari F, M'Rad R, Cahard D, Belhadj A, Halayem M, Persico AM, Elia M, Romano V, Holbert S, Andres C, Chaabouni H, Colleaux L, Constant J, Le Guennec JY, Briault S (2006) Association of a functional deficit of the BKCa channel, a synaptic regulator of neuronal excitability, with autism and mental retardation. Am J Psychiatry 163:1622-1629
Laumonnier F, Shoubridge C, Antar C, Nguyen LS, Van Esch H, Kleefstra T, Briault S, Fryns JP, Hamel B, Chelly J, Ropers HH, Ronce N, Blesson S, Moraine C, Gecz J, Raynaud M (2010) Mutations of the UPF3B gene, which encodes a protein widely expressed in neurons, are associated with nonspecific mental retardation with or without autism. Mol Psychiatry 15:767-776
Launay JM, Bursztejn C, Ferrari P, Dreux C, Braconnier A, Zarifian E, Lancrenon S, Fermanian J (1987) Catecholamines metabolism in infantile autism: a controlled study of 22 autistic children. J Autism Dev Disord 17:333-347
Lauritsen MB, Als TD, Dahl HA, Flint TJ, Wang AG, Vang M, Kruse TA, Ewald H, Mors O (2006) A genome-wide search for alleles and haplotypes associated with autism and related pervasive developmental disorders on the Faroe Islands. Mol Psychiatry 11:37-46
Leboyer M, Bouvard MP, Launay JM, Tabuteau F, Waller D, Dugas M, Kerdelhue B, Lensing P, Panksepp J (1992) Brief report: a double-blind study of naltrexone in infantile autism. J Autism Dev Disord 22:309-319
Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. Cell 131:1235-1247
Lee M, Martin-Ruiz C, Graham A, Court J, Jaros E, Perry R, Iversen P, Bauman M, Perry E (2002) Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. Brain 125:1483-1495
Lee SJ, Lee DH, Yoo HW, Koo SK, Park ES, Park JW, Lim HG, Jung SC (2005) Identification and functional analysis of cystathionine beta-synthase gene mutations in patients with homocystinuria. J Hum Genet 50:648-654
Lejeune J (1964) [Karyotypes of Trisomy 21.]. Rev Prat 14:57-67
Lemay JF, Herbert AR, Dewey DM, Innes AM (2003) A rational approach to the child with mental retardation for the paediatrician. Paediatr Child Health 8:345-356
Lenski C, Kooy RF, Reyniers E, Loessner D, Wanders RJ, Winnepenninckx B, Hellebrand H, Engert S, Schwartz CE, Meindl A, Ramser J (2007) The reduced expression of the HADH2 protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior. Am J Hum Genet 80:372-377
Lerer E, Levi S, Salomon S, Darvasi A, Yirmiya N, Ebstein RP (2008) Association between the oxytocin receptor (OXTR) gene and autism: relationship to Vineland Adaptive Behavior Scales and cognition. Mol Psychiatry 13:980-988
Leu RM, Beyderman L, Botzolakis EJ, Surdyka K, Wang L, Malow BA (2010) Relation of Melatonin to Sleep Architecture in Children with Autism. J Autism Dev Disord
Levitt JG, Blanton R, Capetillo-Cunliffe L, Guthrie D, Toga A, McCracken JT (1999) Cerebellar vermis lobules VIII-X in autism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 23:625-633
Levitt P (2005) Disruption of interneuron development. Epilepsia 46 Suppl 7:22-28
Levy SE, Mandell DS, Schultz RT (2009) Autism. Lancet 374:1627-1638
Lezine I, Brunet O (1950) [Presentation of a French scale of tests for infants.]. Ann Med Psychol (Paris) 108:499

Li F, Shen Y, Kohler U, Sharkey FH, Menon D, Coulleaux L, Malan V, Rio M, McMullan DJ, Cox H, Fagan KA, Gaunt L, Metcalfe K, Heinrich U, Hislop G, Maye U, Sutcliffe M, Wu BL, Thiel BD, Mulchandani S, Conlin LK, Spinner NB, Murphy KM, Batista DA (2010) Interstitial microduplication of Xp22.31: Causative of intellectual disability or benign copy number variant? Eur J Med Genet 53:93-99

Li J, Zhang F, Gao J, Cai Z, Zhao Q, Xing Y, Xu J, Liu Y, Shao L, Che R, Wei Z, He L (2009) An association study of the SLC26A4 gene in children with mental retardation. Neurosci Lett 457:155-158

Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. J Biol Chem 283:1-5

Lim MM, Young LJ (2006) Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. Horm Behav 50:506-517

Liu QJ, Gong YQ, Chen BX, Guo CH, Li JX, Guo YS (2001) [Linkage analysis and mutation detection of GRIA3 in Smith--Fineman--Myers syndrome]. Yi Chuan Xue Bao 28:985-990

Liu YL, Fann CS, Liu CM, Chen WJ, Wu JY, Hung SI, Chen CH, Jou YS, Liu SK, Hwang TJ, Hsieh MH, Chang CC, Yang WC, Lin JJ, Chou FH, Faraone SV, Tsuang MT, Hwu HG (2008) RASD2, MYH9, and CACNG2 genes at chromosome 22q12 associated with the subgroup of schizophrenia with non-deficit in sustained attention and executive function. Biol Psychiatry 64:789-796

London EA (2000) The environment as an etiologic factor in autism: a new direction for research. Environ Health Perspect 108 Suppl 3:401-404

Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, Saran RK, Voit T, Merlini L, Sewry CA, Brown SC, Muntoni F (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. Hum Mol Genet 12:2853-2861

Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook EH, Jr., Leventhal BL, DiLavore PC, Pickles A, Rutter M (2000) The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. J Autism Dev Disord 30:205-223

Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. J Autism Dev Disord 24:659-685

Lugowska A, Wlodarski P, Ploski R, Mierzewska H, Dudzinska M, Matheisel A, Swietochowska H, Tylki-Szymanska A (2009) Molecular and clinical consequences of novel mutations in the arylsulfatase A gene. Clin Genet 75:57-64

Lupski JR (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet 14:417-422

Lupski JR (2004) Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. Genome Biol 5:242

Lupski JR (2007) Genomic rearrangements and sporadic disease. Nat Genet 39:S43-47

Lupski JR (2010) Retrotransposition and structural variation in the human genome. Cell 141:1110-1112

Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. PLoS Genet 1:e49

Ma D, Salyakina D, Jaworski JM, Konidari I, Whitehead PL, Andersen AN, Hoffman JD, Slifer SH, Hedges DJ, Cukier HN, Griswold AJ, McCauley JL, Beecham GW, Wright HH, Abramson RK, Martin ER, Hussman JP, Gilbert JR, Cuccaro ML, Haines JL, Pericak-Vance MA (2009) A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1. Ann Hum Genet 73:263-273

Ma DQ, Cuccaro ML, Jaworski JM, Haynes CS, Stephan DA, Parod J, Abramson RK, Wright HH, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA (2007) Dissecting the locus heterogeneity of autism: significant linkage to chromosome 12q14. Mol Psychiatry 12:376-384

Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, Brothman A, Desnick RJ, Grier RE, Hirsch B, Jacky P, McDowell GA, Popovich B, Watson M, Wolff DJ (2001) Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. Genet Med 3:200-205

Manzi B, Loizzo AL, Giana G, Curatolo P (2008) Autism and metabolic diseases. J Child Neurol 23:307-314

Marazziti D, Muratori F, Cesari A, Masala I, Baroni S, Giannaccini G, Dell'Osso L, Cosenza A, Pfanner P, Cassano GB (2000) Increased density of the platelet serotonin transporter in autism. Pharmacopsychiatry 33:165-168

Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, et al. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. Am J Hum Genet 82:477-488

Martin-Ruiz CM, Lee M, Perry RH, Baumann M, Court JA, Perry EK (2004) Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. Brain Res Mol Brain Res 123:81-90

Martin I, Andres CR, Vedrine S, Tabagh R, Michelle C, Jourdan ML, Heuze-Vourc'h N, Corcia P, Duittoz A, Vourc'h P (2009) Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. Brain Res 1284:22-30

Martineau J, Barthelemy C, Jouve J, Muh JP, Lelord G (1992) Monoamines (serotonin and catecholamines) and their derivatives in infantile autism: age-related changes and drug effects. Dev Med Child Neurol 34:593-603

Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Ishijima M, Kohda K, Kato N, Sasaki T (2004) Association between the neurofibromatosis-1 (NF1) locus and autism in the Japanese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 131B:43-47

May ME, Srour A, Hedges LK, Lightfoot DA, Phillips JA, Blakely RD, Kennedy CH (2009) Monoamine oxidase a promoter gene associated with problem behavior in adults with intellectual/developmental disabilities. Am J Intellect Dev Disabil 114:269-273

Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P (1997) Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. Brain Res 760:68-73

Mbarek O, Marouillat S, Martineau J, Barthelemy C, Muh JP, Andres C (1999) Association study of the NF1 gene and autistic disorder. Am J Med Genet 88:729-732

McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN (2008) Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. Nat Rev Genet 9:356-369

McDougle CJ, Naylor ST, Cohen DJ, Aghajanian GK, Heninger GR, Price LH (1996) Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder. Arch Gen Psychiatry 53:993-1000

McLaren J, Bryson SE (1987) Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. Am J Ment Retard 92:243-254

Means AL, Gudas LJ (1995) The roles of retinoids in vertebrate development. Annu Rev Biochem 64:201-233

Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, Betancur C, Nygren G, Anckarsater H, Rastam M, Stahlberg O, Gillberg IC, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, Fauchereau F, Durand CM, Chevalier F, Drouot X, Collet C, Launay JM, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2008) Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. Mol Psychiatry 13:90-98

Meloni R, Albanese V, Ravassard P, Treilhou F, Mallet J (1998) A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro. Hum Mol Genet 7:423-428

Middleton FA, Strick PL (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. Brain Res Brain Res Rev 31:236-250

Mighell AJ, Markham AF, Robinson PA (1997) Alu sequences. FEBS Lett 417:1-5

Miller LJ, McIntosh DN, McGrath J, Shyu V, Lampe M, Taylor AK, Tassone F, Neitzel K, Stackhouse T, Hagerman RJ (1999) Electrodermal responses to sensory stimuli in individuals with fragile X syndrome: a preliminary report. Am J Med Genet 83:268-279

Miller MT, Stromland K, Ventura L, Johansson M, Bandim JM, Gillberg C (2005) Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: a mini review. Int J Dev Neurosci 23:201-219

Minderaa RB, Anderson GM, Volkmar FR, Akkerhuis GW, Cohen DJ (1994) Noradrenergic and adrenergic functioning in autism. Biol Psychiatry 36:237-241

Mir A, Kaufman L, Noor A, Motazacker MM, Jamil T, Azam M, Kahrizi K, Rafiq MA, Weksberg R, Nasr T, Naeem F, Tzschach A, Kuss AW, Ishak GE, Doherty D, Ropers HH, Barkovich AJ, Najmabadi H, Ayub M, Vincent JB (2009) Identification of mutations in TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. Am J Hum Genet 85:909-915

Mises R (1990) Classification française des troubles mentaux de l'enfant et de l'adolescent., Evry

Mises R, Fortabat JL, Breon S (1975) [Elements for a psychopathological approach of a reputedly exogenous mentally retarded child]. Rev Neuropsychiatr Infant 23:129-137

Modahl C, Green L, Fein D, Morris M, Waterhouse L, Feinstein C, Levin H (1998) Plasma oxytocin levels in autistic children. Biol Psychiatry 43:270-277

Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW (2007) Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. Am J Hum Genet 81:1289-1297

Molinari F, Rio M, Meskenaite V, Encha-Razavi F, Auge J, Bacq D, Briault S, Vekemans M, Munnich A, Attie-Bitach T, Sonderegger P, Colleaux L (2002) Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. Science 298:1779-1781

Moncla A, Malzac P, Livet MO, Voelckel MA, Mancini J, Delaroziere JC, Philip N, Mattei JF (1999) Angelman syndrome resulting from UBE3A mutations in 14 patients from eight families: clinical manifestations and genetic counselling. J Med Genet 36:554-560

Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, Dean JC (2000) A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. J Med Genet 37:489-497

Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, Hill RS, Mukaddes NM, Balkhy S, Gascon G, Hashmi A, Al-Saad S, Ware J, Joseph RM, Greenblatt R, Gleason D, Ertelt JA, Apse KA, Bodell A, Partlow JN, Barry B, Yao H, Markianos K, Ferland RJ, Greenberg ME, Walsh CA (2008) Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. Science 321:218-223

Moser HW (2004) Genetic causes of mental retardation. Ann N Y Acad Sci 1038:44-48

Mostofsky SH, Mazzocco MM, Aakalu G, Warsofsky IS, Denckla MB, Reiss AL (1998) Decreased cerebellar posterior vermis size in fragile X syndrome: correlation with neurocognitive performance. Neurology 50:121-130

Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann R, Abedini SS, Nieh SE, Amini SH, Goswami C, Tzschach A, Jensen LR, Schmitz D, Ropers HH, Najmabadi H, Kuss AW (2007) A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. Am J Hum Genet 81:792-798

Mulder EJ, Anderson GM, Kema IP, de Bildt A, van Lang ND, den Boer JA, Minderaa RB (2004) Platelet serotonin levels in pervasive developmental disorders and mental retardation: diagnostic group differences, within-group distribution, and behavioral correlates. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 43:491-499

Musio A, Selicorni A, Focarelli ML, Gervasini C, Milani D, Russo S, Vezzoni P, Larizza L (2006) X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. Nat Genet 38:528-530

Nanson JL (1992) Autism in fetal alcohol syndrome: a report of six cases. Alcohol Clin Exp Res 16:558-565

Napolioni V, Curatolo P (2008) Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex. Curr Genomics 9:475-487

Narayan M, Srinath S, Anderson GM, Meundi DB (1993) Cerebrospinal fluid levels of homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in autism. Biol Psychiatry 33:630-635

Nascimento RM, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-Morgante AM (2006) UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. Am J Hum Genet 79:549-555

Nasrallah F, Feki M, Kaabachi N Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. Pediatr Neurol 42:163-171

Neumann ID (2008) Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. J Neuroendocrinol 20:858-865

Nieoullon A (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. Prog Neurobiol 67:53-83

Nieoullon A, Amalric M (2002a) [Brain dopamine receptors: molecular aspects and functional implications]. Rev Neurol (Paris) 158:59-68

Nieoullon A, Amalric M (2002b) [Dopaminergic receptors: structural features and functional implications]. Rev Neurol (Paris) 158 Spec no 1:S59-68

Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, Simionati B, Nigro V, Cardazzo B, Patarnello T, Valle G, Danieli GA (2002) Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. Hum Genet 110:418-421

Nurmi EL, Bradford Y, Chen Y, Hall J, Arnone B, Gardiner MB, Hutcheson HB, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Copeland-Yates SA, Michaelis RC, Wassink TH, Santangelo SL, Sheffield VC, Piven J, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS (2001) Linkage disequilibrium at the Angelman syndrome gene UBE3A in autism families. Genomics 77:105-113

Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M, Mandel J (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. Science 252:1097-1102

Ohnishi T, Matsuda H, Hashimoto T, Kunihiro T, Nishikawa M, Uema T, Sasaki M (2000) Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. Brain 123 (Pt 9):1838-1844

OMS (1999) CIM-10. Classification statistique internationale des maladies et problèmes de santé connexes, Genève

Page LA, Daly E, Schmitz N, Simmons A, Toal F, Deeley Q, Ambery F, McAlonan GM, Murphy KC, Murphy DG (2006) In vivo 1H-magnetic resonance spectroscopy study of amygdala-hippocampal and parietal regions in autism. Am J Psychiatry 163:2189-2192

Perry EK, Lee ML, Martin-Ruiz CM, Court JA, Volsen SG, Merrit J, Folly E, Iversen PE, Bauman ML, Perry RH, Wenk GL (2001) Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. Am J Psychiatry 158:1058-1066

Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militerni R, Bravaccio C, Wassink TH, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Montecchi F, Palermo M, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Reichelt KL, Conciatori M, Marino R, Quattrocchi CC, Baldi A, Zelante L, Gasparini P, Keller F (2001) Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. Mol Psychiatry 6:150-159

Peters SU, Beaudet AL, Madduri N, Bacino CA (2004) Autism in Angelman syndrome: implications for autism research. Clin Genet 66:530-536

Petit E, Herault J, Martineau J, Perrot A, Barthelemy C, Hameury L, Sauvage D, Lelord G, Muh JP (1995) Association study with two markers of a human homeogene in infantile autism. J Med Genet 32:269-274

Pfendner EG LA (2008) Epidermolysis Bullosa with Pyloric Atresia. In: [Internet]. G (ed). Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, University of Washington, Seattle

Phelan M.C. SGA, Rogers R.C. (2005) Deletion 22q13 syndrome (Phelan-McDermid syndrome). In: Cassidy S.B. AJE (ed) The management of genetic syndromes. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp 171-181

Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF (1996) An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. J Biol Chem 271:14412-14420

Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, et al. (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. Nature 466:368-372

Piven J, Arndt S, Bailey J, Andreasen N (1996) Regional brain enlargement in autism: a magnetic resonance imaging study. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 35:530-536

Piven J, Arndt S, Bailey J, Havercamp S, Andreasen NC, Palmer P (1995) An MRI study of brain size in autism. Am J Psychiatry 152:1145-1149

Piven J, Nehme E, Simon J, Barta P, Pearlson G, Folstein SE (1992) Magnetic resonance imaging in autism: measurement of the cerebellum, pons, and fourth ventricle. Biol Psychiatry 31:491-504

Plank SM, Copeland-Yates SA, Sossey-Alaoui K, Bell JM, Schroer RJ, Skinner C, Michaelis RC (2001) Lack of association of the (AAAT)6 allele of the GXAlu tetranucleotide repeat in intron 27b of the NF1 gene with autism. Am J Med Genet 105:404-405

Ploeger A, Raijmakers ME, van der Maas HL, Galis F The association between autism and errors in early embryogenesis: what is the causal mechanism? Biol Psychiatry 67:602-607

Polak P, Domany E (2006) Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes. BMC Genomics 7:133

Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. Nat Genet 23:41-46

Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D, Carvalho CM, Eifert A, Friedman EM, Glaze D, Krull K, Lee JA, Lewis RA, Mendoza-Londono R, Robbins-Furman P, Shaw C, Shi X, Weissenberger G, Withers M, Yatsenko SA, Zackai EH, Stankiewicz P, Lupski JR (2007) Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. Am J Hum Genet 80:633-649

Purcell AE, Jeon OH, Zimmerman AW, Blue ME, Pevsner J (2001) Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. Neurology 57:1618-1628

Qi H, Xing L, Zhang K, Gao X, Zheng Z, Huang S, Guo Y, Zhang F (2009) Positive association of neuroligin-4 gene with nonspecific mental retardation in the Qinba Mountains Region of China. Psychiatr Genet 19:1-5

Ramoz N, Cai G, Reichert JG, Silverman JM, Buxbaum JD (2008) An analysis of candidate autism loci on chromosome 2q24-q33: evidence for association to the STK39 gene. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B:1152-1158

Raymond FL (2010) Monogenic causes of mental retardation. In: Knight SJL (ed) Genetics of mental retardation. Vol 18. Karger, Basel, pp 89-100

Raymond GV, Bauman ML, Kemper TL (1996) Hippocampus in autism: a Golgi analysis. Acta Neuropathol 91:117-119

Raz N, Torres IJ, Briggs SD, Spencer WD, Thornton AE, Loken WJ, Gunning FM, McQuain JD, Driesen NR, Acker JD (1995) Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. Neurology 45:356-366

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome. Nature 444:444-454

Richards BW, Sylvester, P.E., Brooker, C. (1981) Fragile X-linked mental retardation : the Martin-Bell syndrome. J Ment Defic Res 25:253-256

Richdale AL (1999) Sleep problems in autism: prevalence, cause, and intervention. Dev Med Child Neurol 41:60-66
Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. Science 273:1516-1517
Ritvo ER, Freeman BJ, Mason-Brothers A, Mo A, Ritvo AM (1985) Concordance for the syndrome of autism in 40 pairs of afflicted twins. Am J Psychiatry 142:74-77
Ritvo ER, Freeman BJ, Scheibel AB, Duong T, Robinson H, Guthrie D, Ritvo A (1986) Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLA-NSAC Autopsy Research Report. Am J Psychiatry 143:862-866
Ritvo ER, Yuwiler A, Geller E, Ornitz EM, Saeger K, Plotkin S (1970) Increased blood serotonin and platelets in early infantile autism. Arch Gen Psychiatry 23:566-572
Rodier PM (2000) The early origins of autism. Sci Am 282:56-63
Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J (1996) Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. J Comp Neurol 370:247-261
Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Mallolas J, Carrio A, Pedrinaci S, Barrionuevo JL, Mila M (2004) Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. Clin Genet 65:17-23
Rodriguez-Revenga L, Mila M, Rosenberg C, Lamb A, Lee C (2007) Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. Genet Med 9:600-606
Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreels F (1997) The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. Dev Med Child Neurol 39:125-132
Rogers RC, Stevenson RE, Simensen RJ, Holden KR, Schwartz CE (2008) Finding new etiologies of mental retardation and hypotonia: X marks the spot. Dev Med Child Neurol 50:104-111
Ropers HH (2007) New perspectives for the elucidation of genetic disorders. Am J Hum Genet 81:199-207
Ropers HH, Hamel BC (2005) X-linked mental retardation. Nat Rev Genet 6:46-57
Rosenhall U, Nordin V, Sandstrom M, Ahlsen G, Gillberg C (1999) Autism and hearing loss. J Autism Dev Disord 29:349-357
Rosser TL, Parker, L.J. (2003) Neurocognitive dysfunction in children with neurofibromatosis type 1. Curr Neurol Neurosci Rep Mars ; 3:129-136
Rossi E, Verri AP, Patricelli MG, Destefani V, Ricca I, Vetro A, Ciccone R, Giorda R, Toniolo D, Maraschio P, Zuffardi O (2008) A 12Mb deletion at 7q33-q35 associated with autism spectrum disorders and primary amenorrhea. Eur J Med Genet 51:631-638
Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, Coulet F, Noguchi T, Soubrier F, Bieche I, Olschwang S, Sobol H, Lidereau R (2009) Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. Hum Mutat 30:867-875
Rutter M, Graham P (1968) The reliability and validity of the psychiatric assessment of the child: I. Interview with the child. Br J Psychiatry 114:563-579
Saccucci P, Compagnone E, Verrotti A, Galasso C, Curatolo P (2008) Lack of association between MTHFR C677T and MTHFR A1298C genetic polymorphisms and mental retardation. Nutr Neurosci 11:241-242
Saccucci P, Galasso C, Rizzo R, Gagliano A, Refice F, Lalli C, Verrotti A, Gloria-Bottini F, Curatolo P (2007) Association of Trp53 polymorphic variants at codon 72 with nonsyndromic mental retardation. Neurosci Res 59:47-50
Samaco RC, Fryer JD, Ren J, Fyffe S, Chao HT, Sun Y, Greer JJ, Zoghbi HY, Neul JL (2008) A partial loss of function allele of methyl-CpG-binding protein 2 predicts a human neurodevelopmental syndrome. Hum Mol Genet 17:1718-1727
Schaefer GB, Mendelsohn NJ (2008) Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders. Genet Med 10:301-305
Schellenberg GD, Dawson G, Sung YJ, Estes A, Munson J, Rosenthal E, Rothstein J, Flodman P, Smith M, Coon H, Leong L, Yu CE, Stodgell C, Rodier PM, Spence MA, Minshew N, McMahon WM, Wijsman EM (2006) Evidence for multiple loci from a genome scan of autism kindreds. Mol Psychiatry 11:1049-1060, 1979
Schluth-Bolard C, Till M, Edery P, Sanlaville D (2008) [New chromosomal syndromes]. Pathol Biol (Paris) 56:380-387
Schmahmann JD (2004) Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 16:367-378
Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF, Daly K (1980) Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). J Autism Dev Disord 10:91-103
Schultz RT (2005) Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area. Int J Dev Neurosci 23:125-141

Schumann CM, Bloss CS, Barnes CC, Wideman GM, Carper RA, Akshoomoff N, Pierce K, Hagler D, Schork N, Lord C, Courchesne E Longitudinal magnetic resonance imaging study of cortical development through early childhood in autism. J Neurosci 30:4419-4427

Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, et al. (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. Science 316:445-449

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. Science 305:525-528

Sen SK, Han K, Wang J, Lee J, Wang H, Callinan PA, Dyer M, Cordaux R, Liang P, Batzer MA (2006) Human genomic deletions mediated by recombination between Alu elements. Am J Hum Genet 79:41-53

Serajee FJ, Zhong H, Mahbubul Huq AH (2006) Association of Reelin gene polymorphisms with autism. Genomics 87:75-83

Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC, Fitzpatrick CA, Segraves R, Richmond TA, Guiver C, Albertson DG, Pinkel D, Eis PS, Schwartz S, Knight SJ, Eichler EE (2006) Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. Nat Genet 38:1038-1042

Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S, Gimelli G, Striano P, Coppola A, Regan R, Price SM, Knoers NV, Eis PS, Brunner HG, Hennekam RC, Knight SJ, de Vries BB, Zuffardi O, Eichler EE (2007) Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. Hum Mol Genet 16:567-572

Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, Martin H, Rickman L, Gribble S, Curley R, Cumming S, Dunn C, Kalaitzopoulos D, Porter K, Prigmore E, Krepischi-Santos AC, Varela MC, Koiffmann CP, Lees AJ, Rosenberg C, Firth HV, de Silva R, Carter NP (2006) Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. Nat Genet 38:1032-1037

Shaw CJ, Lupski JR (2004) Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. Hum Mol Genet 13 Spec No 1:R57-64

Shuang M, Liu J, Jia MX, Yang JZ, Wu SP, Gong XH, Ling YS, Ruan Y, Yang XL, Zhang D (2004) Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 131B:48-50

Shukla P, Balakrishnan P, Agarwal N, Ghosh M, Kabra M, Sharma R, Deka D, Kalra V (2008) Prenatal diagnosis of megalencephalic leukodystrophy. Prenat Diagn 28:357-359

Sikich L, Hickok JM, Todd RD (1990) 5-HT1A receptors control neurite branching during development. Brain Res Dev Brain Res 56:269-274

Sikora DM, Pettit-Kekel K, Penfield J, Merkens LS, Steiner RD (2006) The near universal presence of autism spectrum disorders in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome. Am J Med Genet A 140:1511-1518

Silberberg G, Levit A, Collier D, St Clair D, Munro J, Kerwin RW, Tondo L, Floris G, Breen G, Navon R (2008) Stargazin involvement with bipolar disorder and response to lithium treatment. Pharmacogenet Genomics 18:403-412

Silverman JM, Buxbaum JD, Ramoz N, Schmeidler J, Reichenberg A, Hollander E, Angelo G, Smith CJ, Kryzak LA (2008) Autism-related routines and rituals associated with a mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 polymorphism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147:408-410

Singh VK (1996) Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma. Pathological significance in autism. J Neuroimmunol 66:143-145

Singh VK, Rivas WH (2004a) Detection of antinuclear and antilaminin antibodies in autistic children who received thimerosal-containing vaccines. J Biomed Sci 11:607-610

Singh VK, Rivas WH (2004b) Prevalence of serum antibodies to caudate nucleus in autistic children. Neurosci Lett 355:53-56

Skaar DA, Shao Y, Haines JL, Stenger JE, Jaworski J, Martin ER, DeLong GR, Moore JH, McCauley JL, Sutcliffe JS, Ashley-Koch AE, Cuccaro ML, Folstein SE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA (2005) Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. Mol Psychiatry 10:563-571

Smalley SL, McCracken J, Tanguay P (1995) Autism, affective disorders, and social phobia. Am J Med Genet 60:19-26

Sousa I, Clark TG, Toma C, Kobayashi K, Choma M, Holt R, Sykes NH, Lamb JA, Bailey AJ, Battaglia A, Maestrini E, Monaco AP (2009) MET and autism susceptibility: family and case-control studies. Eur J Hum Genet 17:749-758

Sparks BF, Friedman SD, Shaw DW, Aylward EH, Echelard D, Artru AA, Maravilla KR, Giedd JN, Munson J, Dawson G, Dager SR (2002) Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. Neurology 59:184-192

Spencer CM, Alekseyenko O, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2005) Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. Genes Brain Behav 4:420-430

Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. Cell 119:19-31

Stanfield AC, McIntosh AM, Spencer MD, Philip R, Gaur S, Lawrie SM (2008) Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. Eur Psychiatry 23:289-299

Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. Trends Genet 18:74-82

Stankiewicz P, Lupski JR (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. Annu Rev Med 61:437-455

Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G, Bohman M (1989) A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. J Child Psychol Psychiatry 30:405-416

Steffenburg S, Gillberg CL, Steffenburg U, Kyllerman M (1996) Autism in Angelman syndrome: a population-based study. Pediatr Neurol 14:131-136

Steinlein OK (2004) Nicotinic receptor mutations in human epilepsy. Prog Brain Res 145:275-285

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Nat Genet 11:201-203

Stevenson RE, Procopio-Allen AM, Schroer RJ, Collins JS (2003) Genetic syndromes among individuals with mental retardation. Am J Med Genet A 123A:29-32

Stevenson RE, Schwartz CE (2009) X-linked intellectual disability: unique vulnerability of the male genome. Dev Disabil Res Rev 15:361-368

Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavare S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. Science 315:848-853

Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, Stephan DA, Morton DH (2006) Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. N Engl J Med 354:1370-1377

Stromland K, Nordin V, Miller M, Akerstrom B, Gillberg C (1994) Autism in thalidomide embryopathy: a population study. Dev Med Child Neurol 36:351-356

Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K (2002a) Prevalence estimation of Williams syndrome. J Child Neurol 17:269-271

Stromme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SM, Bruyere H, Lutcherath V, Gedeon AK, Wallace RH, Scheffer IE, Turner G, Partington M, Frints SG, Fryns JP, Sutherland GR, Mulley JC, Gecz J (2002b) Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. Nat Genet 30:441-445

Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1998) The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 95:2390-2395

Sundstrom E, Kolare S, Souverbie F, Samuelsson EB, Pschera H, Lunell NO, Seiger A (1993) Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. Brain Res Dev Brain Res 75:1-12

Sweeten TL, Fujinami RS (2004) A potential link between measles virus and autism: age-matched control groups are essential. Pediatr Neurol 30:78; author reply 78

Sweeten TL, Posey DJ, McDougle CJ (2004a) Brief report: autistic disorder in three children with cytomegalovirus infection. J Autism Dev Disord 34:583-586

Sweeten TL, Posey DJ, Shankar S, McDougle CJ (2004b) High nitric oxide production in autistic disorder: a possible role for interferon-gamma. Biol Psychiatry 55:434-437

Sykes NH, Toma C, Wilson N, Volpi EV, Sousa I, Pagnamenta AT, Tancredi R, Battaglia A, Maestrini E, Bailey AJ, Monaco AP (2009) Copy number variation and association analysis of SHANK3 as a candidate gene for autism in the IMGSAC collection. Eur J Hum Genet 17:1347-1353

Szatmari P (2003) The causes of autism spectrum disorders. BMJ 326:173-174

Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, et al. (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. Nat Genet 39:319-328

Taanman JW, Daras M, Albrecht J, Davie CA, Mallam EA, Muddle JR, Weatherall M, Warner TT, Schapira AH, Ginsberg L (2009) Characterization of a novel TYMP splice site mutation associated with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). Neuromuscul Disord 19:151-154

Tai HC, Schuman EM (2008) Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. Nat Rev Neurosci 9:826-838

Tarpey PS, Raymond FL, Nguyen LS, Rodriguez J, Hackett A, Vandeleur L, Smith R, et al. (2007) Mutations in UPF3B, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. Nat Genet 39:1127-1133

Tecott LH, Logue SF, Wehner JM, Kauer JA (1998) Perturbed dentate gyrus function in serotonin 5-HT2C receptor mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15026-15031

Thompson WW, Price C, Goodson B, Shay DK, Benson P, Hinrichsen VL, Lewis E, Eriksen E, Ray P, Marcy SM, Dunn J, Jackson LA, Lieu TA, Black S, Stewart G, Weintraub ES, Davis RL, DeStefano F (2007) Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. N Engl J Med 357:1281-1292

Tierney E, Nwokoro NA, Porter FD, Freund LS, Ghuman JK, Kelley RI (2001) Behavior phenotype in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. Am J Med Genet 98:191-200

Tomilin NV (1998) Control of Genes by Mammalian Retroposons. International Review of Cytology 186:1-48

Tordjman S, Anderson GM, Pichard N, Charbuy H, Touitou Y (2005) Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. Biol Psychiatry 57:134-138

Trajkovski V, Ajdinski L, Spiroski M (2004) Plasma concentration of immunoglobulin classes and subclasses in children with autism in the Republic of Macedonia: retrospective study. Croat Med J 45:746-749

Trikalinos TA, Karvouni A, Zintzaras E, Ylisaukko-oja T, Peltonen L, Jarvela I, Ioannidis JP (2006) A heterogeneity-based genome search meta-analysis for autism-spectrum disorders. Mol Psychiatry 11:29-36

Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME (2008) Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. Nat Genet 40:90-95

Van Buggenhout G, Van Ravenswaaij-Arts C, Mc Maas N, Thoelen R, Vogels A, Smeets D, Salden I, Matthijs G, Fryns JP, Vermeesch JR (2005) The del(2)(q32.2q33) deletion syndrome defined by clinical and molecular characterization of four patients. Eur J Med Genet 48:276-289

Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G (2005) Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. Am J Hum Genet 77:442-453

Varga EA, Pastore M, Prior T, Herman GE, McBride KL (2009) The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric cohort with autism spectrum disorders, developmental delay, and macrocephaly. Genet Med 11:111-117

Verhoeven JS, De Cock P, Lagae L, Sunaert S Neuroimaging of autism. Neuroradiology 52:3-14

Vernes SC, Newbury DF, Abrahams BS, Winchester L, Nicod J, Groszer M, Alarcon M, Oliver PL, Davies KE, Geschwind DH, Monaco AP, Fisher SE (2008) A functional genetic link between distinct developmental language disorders. N Engl J Med 359:2337-2345

Vincent JB, Horike SI, Choufani S, Paterson AD, Roberts W, Szatmari P, Weksberg R, Fernandez B, Scherer SW (2006) An inversion inv(4)(p12-p15.3) in autistic siblings implicates the 4p GABA receptor gene cluster. J Med Genet 43:429-434

Vincent JB, Kolozsvari D, Roberts WS, Bolton PF, Gurling HM, Scherer SW (2004) Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: no mutations in 196 autism probands. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 129B:82-84

Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA (2003) Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. Am J Hum Genet 73:1261-1270

Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA (2010) Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. J Med Genet 47:289-297

Volkmar FR, Pauls D (2003) Autism. Lancet 362:1133-1141

Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L (2006) Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. Mol Psychiatry 11:1, 18-28

Vourc'h P, Andres C (2004) Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp): evolution, structure and function. Brain Res Brain Res Rev 45:115-124

Vourc'h P, Bienvenu T, Beldjord C, Chelly J, Barthelemy C, Muh JP, Andres C (2001) No mutations in the coding region of the Rett syndrome gene MECP2 in 59 autistic patients. Eur J Hum Genet 9:556-558

Vourc'h P, Martin I, Bonnet-Brilhault F, Marouillat S, Barthelemy C, Pierre Muh J, Andres C (2003) Mutation screening and association study of the UBE2H gene on chromosome 7q32 in autistic disorder. Psychiatr Genet 13:221-225

Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, Heye B, Glaser D, Liebscher V, Meitinger T, Strom TM (2007) Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. Am J Hum Genet 81:768-779

Wakefield AJ (1999) MMR vaccination and autism. Lancet 354:949-950

Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, et al. (2009) Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. Nature 459:528-533

Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. Nature 417:941-944

Wang L, Guo Y, Huang WJ, Ke X, Poyet JL, Manji GA, Merriam S, Glucksmann MA, DiStefano PS, Alnemri ES, Bertin J (2001) Card10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF-kappa B. J Biol Chem 276:21405-21409

Wang L, Jia M, Yue W, Tang F, Qu M, Ruan Y, Lu T, Zhang H, Yan H, Liu J, Guo Y, Zhang J, Yang X, Zhang D (2008a) Association of the ENGRAILED 2 (EN2) gene with autism in Chinese Han population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B:434-438

Wang SS, Qiao FY, Feng L, Lv JJ (2008b) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. J Zhejiang Univ Sci B 9:93-99

Warren RP, Foster A, Margaretten NC (1987) Reduced natural killer cell activity in autism. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 26:333-335

Wassink TH, Vieland VJ, Sheffield VC, Bartlett CW, Goedken R, Childress D, Piven J (2008) Posterior probability of linkage analysis of autism dataset identifies linkage to chromosome 16. Psychiatr Genet 18:85-91

Webber C, Hehir-Kwa JY, Nguyen DQ, de Vries BB, Veltman JA, Ponting CP (2009) Forging links between human mental retardation-associated CNVs and mouse gene knockout models. PLoS Genet 5:e1000531

Wechsler D (1981) Wechsler adult intelligence scale revised., New York

Wechsler D (1989) Manual for the Wechsler preschool and primary scale of intelligence-revised, New York

Weiss BJ, Kamholz J, Ritter A, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Emanuel B, Fischbeck KH (1991) Segmental spinal muscular atrophy and dermatological findings in a patient with chromosome 18q deletion. Ann Neurol 30:419-423

Weiss LA, Arking DE, Daly MJ, Chakravarti A (2009) A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. Nature 461:802-808

Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ (2008) Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. N Engl J Med 358:667-675

Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA (2005) A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. BMC Genomics 6:180

Weterings E, Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. Cell Res 18:114-124

Whitaker-Azmitia PM (2001) Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. Brain Res Bull 56:479-485

Whitaker-Azmitia PM, Zhang X, Clarke C (1994) Effects of gestational exposure to monoamine oxidase inhibitors in rats: preliminary behavioral and neurochemical studies. Neuropsychopharmacology 11:125-132

Williams JM, Beck TF, Pearson DM, Proud MB, Cheung SW, Scott DA (2009) A 1q42 deletion involving DISC1, DISC2, and TSNAX in an autism spectrum disorder. Am J Med Genet A 149A:1758-1762

Winnepenninckx B, Errijgers V, Hayez-Delatte F, Reyniers E, Frank Kooy R (2002) Identification of a family with nonspecific mental retardation (MRX79) with the A140V mutation in the MECP2 gene: is there a need for routine screening? Hum Mutat 20:249-252

Winnepenninckx B, Rooms, L., Kooy, R.F. (2003) Mental retardation : a review of the genetic causes. Brit J Dev Disabil 49:29-44

Winslow JT (2005) Neuropeptides and non-human primate social deficits associated with pathogenic rearing experience. Int J Dev Neurosci 23:245-251

Wirojanan J, Jacquemont S, Diaz R, Bacalman S, Anders TF, Hagerman RJ, Goodlin-Jones BL (2009) The efficacy of melatonin for sleep problems in children with autism, fragile X syndrome, or autism and fragile X syndrome. J Clin Sleep Med 5:145-150

Wu S, Jia M, Ruan Y, Liu J, Guo Y, Shuang M, Gong X, Zhang Y, Yang X, Zhang D (2005) Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population. Biol Psychiatry 58:74-77

Xiao W, Oefner PJ (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. Hum Mutat 17:439-474

Yamashita Y, Fujimoto C, Nakajima E, Isagai T, Matsuishi T (2003) Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. J Autism Dev Disord 33:455-459

Yang MS, Gill M (2007) A review of gene linkage, association and expression studies in autism and an assessment of convergent evidence. Int J Dev Neurosci 25:69-85

Yang P, Lung FW, Jong YJ, Hsieh HY, Liang CL, Juo SH (2008) Association of the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 with autistic disorder in Chinese children. Neuropsychobiology 57:3-8

Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C (2003) Prevalence of autism in a US metropolitan area. Jama 289:49-55

Ylisaukko-Oja T, Peyrard-Janvid M, Lindgren CM, Rehnstrom K, Vanhala R, Peltonen L, Jarvela I, Kere J (2005a) Family-based association study of DYX1C1 variants in autism. Eur J Hum Genet 13:127-130

Ylisaukko-Oja T, Rehnstrom K, Vanhala R, Kempas E, von Koskull H, Tengstrom C, Mustonen A, Ounap K, Lahdetie J, Jarvela I (2005b) MECP2 mutation analysis in patients with mental retardation. Am J Med Genet A 132A:121-124

Young JG, Cohen DJ, Kavanagh ME, Landis HD, Shaywitz BA, Maas JW (1981) Cerebrospinal fluid, plasma, and urinary MHPG in children. Life Sci 28:2837-2845

Zafeiriou DI, Ververi A, Vargiami E (2007) Childhood autism and associated comorbidities. Brain Dev 29:257-272

Zafeiriou DI, Ververi A, Vargiami E (2009) The serotonergic system: its role in pathogenesis and early developmental treatment of autism. Curr Neuropharmacol 7:150-157

Zazzo R (1965) [the Concept of Heterochronia in the Diagnosis of Mental Deficiency.]. Rev Neuropsychiatr Infant 13:241-246

Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR (2009) Copy number variation in human health, disease, and evolution. Annu Rev Genomics Hum Genet 10:451-481

Zhang K, Gao J, An C, Gao X, Zheng Z, Li R, Huang S, Zhang F (2007) An association study between cathechol-O-methyltransferase gene and mental retardation in the Chinese Han population. Neurosci Lett 419:83-87

Zilbovicius M, Boddaert N, Belin P, Poline JB, Remy P, Mangin JF, Thivard L, Barthelemy C, Samson Y (2000) Temporal lobe dysfunction in childhood autism: a PET study. Positron emission tomography. Am J Psychiatry 157:1988-1993

Sites web consultés

PubMed http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed

Primer3 http://frodo.wi.mit.edu/primer3/

Ensembl Genome Browser http://www.ensembl.org/index.html

UCSC Genome Browser http://genome.ucsc.edu/

MRC-Holland mlpa http://www.mrc-holland.com

AutDB (Autism data base) http://www.mindspec.org/autdb.html

GENATLAS http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/

DECIPHER https://decipher.sanger.ac.uk/application/

BioGPS http://biogps.gnf.org/#goto=welcome

Database of Genomic Variants (DGV) http://projects.tcag.ca/variation/

BLAST

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on

RT PRIMER DB http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/

ANNEXES

Annexe 1 : Tableau des amorces de QPCR avec leur localisation

Gène	Localisation	Exon/Intron	Nom de l'amorce	séquence des amorces	Taille de l'amplicon en pb	Tm de QPCR en °C	Cp moyen en QPCR
GABRD	1p36	INT3-EX4	GARDF	gtgccacctccacagGAGTA	194	60	28
			GARDR	AGCTTGTTCTCCACCGTCAC		60	
DISC1	1q42	EX2	DISC1F	GAACGTGGAGAAGCAGAAGG	216	60	25
			DISC1R	AGAATGCATGTCACGCTCTG		60	
		EX11	DISC1F2	CAGGGGAAGCCTGTCTGTAG	143	60	26
			DISC1R2	GGGATGAGGTGAGTCTTCCA		60	
NRXN1	2p16	EX2	NRXN1F	TGATGTGCTGGCATCTTAGC	128	60	26
			NRXN1R	CACGGCAACAGTAGGACTCA		60	
		EX22	NRXN1F2	TTGGTGAAGTGCCTTCCTCT	172	60	26
			NRXN1R2	TTTCCTCTTCTGGCTGTGCT		60	
SLC25A12	2q24	INT5	SLC25A12F	cctgactgttttccacagca	177	60	24
			SLC25A12R	aatgcagcaaacaggaggtt		60	
ITGA6	2q31	INT1	ITGA6F	GACTGGGGGCCTCCTTATAG	116	60	25
			ITGA6R	TCTCCCACAAAGGATTCAGG		60	
		EX4	ITGA6F2	GGCGGTGTTATGTCCTGAGT	111	60	27
			ITGA6R2	GGCAAGAGCCAAATTTCTCA		60	
OXTR	3p25	INT1-EX2	OXTRF	tggggcgagtaggtagtttg	196	60	27
			OXTRR	TCTGAGCCACTGCAAATGAG		60	
TAGLN3	3q13	INT3	TAGLN3F	gcaggtgcttcagagtttcc	176	60	24
			TAGLN3R	ctcctgccctgttgtatggt		60	
NLGN1	3q26-q27	EX3	NLGN1F	CCACTGGTGGCTACCAACTT	143	60	26
			NLGN1R	TGGTTCTGGAGGCTGAAAAC		60	
		EX6	NLGN1F3	GTTGGCCACAAAAGTTGGTT	166	60	26
			NLGN1R3	CTGGGGGTCGTCTGGTATTA		60	
AHI1	6q23	INT3	AHI1F	TGACGGAGGAGCTAAAGGAA	106	60	25
			AHI1R	AGGGCTCCATACCTCCTGAT		60	
		INT24	AHI1F2	gaccagcctgggcaatataa	111	60	24
			AHI1R2	gcttcagaggtctggctttg		60	
PARK2	6q26	EX4	PARK2F	TGACCCAGGTAAGGAAATGC	179	60	28
			PARK2R	AAGACAAAGGCGCATAAACG		60	
CNTNAP2	7q35-7q36	INT1	CNTNAP2F	ggcaagagcttggctagaga	173	60	25
			CNTNAP2R	caaccccgtgctcattaagt		60	
		INT13	CNTNAP2F2	gcttgttttctggggaatga	137	60	25
			CNTNAP2R2	tgtcccacagccactactga		60	
FOXP2	7q31	INT1	FOXP2F	GGACTGGTGAGAGGGAATGA	135	60	25
			FOXP2R	AAACCTCGCTAGCCACAGAA		60	
		INT9	FOXP2F3	actggacctcagtgggaatg	103	60	27
			FOXP2R3	gcaatggactagtgccaaca		60	
HOXA1	7p15	EX1	HOXA1F	GGGTGTCCTACTCCCACTCA	162	60	25
			HOXA1R	GGACCATGGGAGATGAGAGA		60	
MET	7q31	INT1	METF	caccaaagacatggcaacac	215	60	26
			METR	gaaagcgtagatggctctgg		60	
SMARCA2	9p24	EX28	SMARCA2F	GCAATTTGGAGGAAATGGAA	173	60	26
			SMARCA2R	AGCGTTCATCTGCTTTGTCA		60	
		EX4	SMARCA2F2	CCACACCCATCTCCATTAGG	170	60	27
			SMARCA2R2	AGCTGGACAGGACTGAAAGG		60	
KCNMA1	10q22	INT3	KCNMA1F	AGGAGGTCCCTCATCCTCAT	107	60	25
			KCNMA1R	CAGGTCTGCCACAAAAGACA		60	
PTEN	10q23	INT1	PTENF2	aacgtgggagtagacggatg	210	60	25
			PTENR2	tagccctcaggaagagacca		60	
		INT5	PTENF3	ccagggtgaaagcatttaaga	124	60	26
			PTENR3	gggagggaggaacacaagat		60	

Gène	Localisation	Exon/Intron	Nom de l'amorce	séquence des amorces	Taille de l'amplicon en pb	Tm de QPCR en °C	Cp moyen en QPCR
DHCR7	11q13	INT2	DHCR7F	AGCCGTCTATTGGGAAGGAT	157	60	27
			DHCR7R	AAGCCACTGGGAGAATGTTG		60	
HRAS	11p15	EX3	HRASF	CCTGTTCTGGAGGACGGTAA	152	60	27
			HRASR	ATGACCCAGTGATGGGAAAA		60	
CACNA1C	12p13	INT1	CACNA1CF	aaatgggtagccctttgctt	208	60	25
			CACNA1CR	cttgtgccaccagaatagca		60	
		INT32	CACNA1CF2	cgtgcctgctctaacactca	191	60	25
			CACNA1CR2	gaaaaggggaaggcctaatg		60	
MDGA2	14q21	EX7	MDGA2F	GCTGTTCCTTCTGAGGAGCTA	197	60	25
			MDGA2R	TCAGATATTCCTCCTCCCTTC		60	
		INT1	MDGA2F2	tttttgcctgtcagcagttg	183	60	26
			MDGA2R2	tcccaccagacctcaaaaac		60	
UBE3A	15q11	EX5	UBE3AF	AACTGAGGGCTGTGGAAATG	145	60	25
			UBE3AR	GGAGGGATGAGGATCACAGA		60	
		INT1	UBE3AF2	gcttggcaaccttgaaagag	116	60	26
			UBE3AR2	agcaccctcgccacttaata		60	
RNF135	17q11	INT2	RNF135F	GATGGGCTAGGATCACTCCA	128	60	25
			RNF135R	AAAGGCTGCTGAAAGGTCAA		60	
BZRAP1	17q22-23	INT16	BZRAP1F	AGCAGAGAGGATGGCACTGT	157	60	25
			BZRAP1R	AGAGGACCCAGGGAAAAGAA		60	
DLG4	17p13	EX2	DLG4F	CACTCCTCACAGTGCTGCAT	107	60	25
			DLG4R	agcccccgaagttcagtaat		60	
MLC1	22q13	EX6	MLC1F	ccccttggcagATCAACTT	122	60	25
			MLC1R	tgcacccacCTTCTTTTTCT		60	
SHANK3	22q13	EX8	SHANK3F2	ACAGGGATGTCCGCAACTAC	235	60	25
			SHANK3R2	ACGAAGGGAACATCAACACC		60	
GRIA3	Xq25	INT1-EX2	GRIA3F	caatcccacaccccagtatc	152	60	25
			GRIA3R	CTGTGCTCCTGCACTGTGTT		60	
		EX13	GRIA3EX13F	GCGAAAGTCCAAGGGAAAGT	129	60	27
			GRIA3EX13R	GTTGCCACACCATAGCCTTT		60	
NLGN4X	Xp22	INT5	NLGN4XF	GGAGGCCGTAAGATGACAAA	119	60	26
			NLGN4XR	TGTAGGGGGAGGGTATTTCC		60	
		EX6	NLGN4XEX6F	CTGTTTCCTCCCCAACAAAA	121	60	26
			NLGN4XEX6R	CTGGGTCTTCTGTGGGACAT		60	
NLGN3	Xq13	INT4	NLGN3F	CTGTGTAGTGGGGCCTTTGT	123	60	26
			NLGN3R	GGTTCAGTGCTCAGGAAAGC		60	
PTCHD1	Xp22	INT1	PTCHD1F2	CCACGGTTCAGACCTTCATT	180	60	26
			PTCHD1R2	ACTGCGAGCCAGTCAAAGAT		60	
UPF3B	Xq25-26	EX1-INT1	UPF3BF2	GCTCCAAGGGGGAAGATAAG	200	60	25
			UPF3BR2	AACCAGGATGATGCGACTTC		60	
MAPK3	16p11	INT1	MAPK3F	TGGGTTAAGGAGCCTTTCCT	128	60	28
			MAPK3R	GCCCTTCGGTGACTTTACAA		60	
DOC2A	16p11	INT6	DOC2AF2	CCGCTGGTTGGTTGATCTAT	179	60	27
			DOC2AR2	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA		60	
UBE2C	20q11-13	INT1	UBE2CF	tggtgggcctagatgaagac	209	60	25
			UBE2CR	tcaggctcagctcagggtat		60	
UBE2A	Xq24-25	EX3	UBE2AF3	CAGATGAAGCAGGGAGAAGG	158	60	27
			UBE2AR3	AGGATGACTGGGAACCCTTT		60	
HEM3	11q23	EX14	HEM3F	TGCACGGCAGCTTAACGAT	201	60	25
			HEM3R	AGGCAAGGCAGTCATCAAGG		60	
ALB	4q13	INT12	ALBF	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTG	139	60	25
			ALBR	ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC		60	

Annexe 1

Annexe 2 : Séquence des amplicons de QPCR

GRIA3

1er couple d'amorces dans l'intron 1 et l'exon 2

caatcccacaccccagtatcattgagaggtatccggtatctatattgttccccaattcctaactggccctagtgtgggggaacac
aagccaaatctccgttccctttgcttatagGTGGACTTTTCATGAGAAACACAGTGCAGGAGCACAG

2ème couple d'amorces dans exon 13

GCGAAAGTCCAAGGGAAAGTTCGCCTTCCTGCTGGAGTCAACCATGAATGAGTACATTGAGCAGAGAAAACCATGTGATACGATG
AAAGTTGGTGGAAATCTGGATTCCAAAGGCTATGGTGTGGCAAC

NLGN4X

1er couple d'amorces dans l'intron 5

GGAGGCCGTAAGATGACAAAGACACAGAGTGGGATGGTGCACCTGCAAGGTAGGAATGCCAAAGACTGCACCCAAACACCAGTAA
CTAAGAAGGAGCAAGGAAATACCCTCCCCCTACA

2ème couple d'amorces dans exon 6

CTGTTTCCTCCCCAACAAAAGAGGCTTTTCTTCTTAATTACTTGTGGTAAACAAAGACATGGGATTTTCTTACATGAGATTCTCA
TTTGTAGGAGGATGTGATGTCCCACAGAAGACCCAG

NLGN3

CTGTGTAGTGGGGCCTTTGTTGTTTTGTTGCCCAAAGCATCCCAGAACAGGTGGTTTGTTTTGGACCCCAGTCACAGGCATTCAT
TCACTCTCCTTCCCATCAGCTTTCCTGAGCACTGAACC

UPF3B

GCTCCAAGGGGGAAGATAAGCAGGATCGCAACAAGGAGAAGAAAGAAGCGCTGAGCAAGGTGCCCGGTCGGCCGCTGGCCCGGGA
GAGGGCGGGACGAGTCCGCAGCGCGGGGAGGATGGCTGGGAATGGGGCTGCCCCCTTTCTTTCTCAGGTTCTCCTTCTATCTCTT
CGCCTGAATGGAAGTCGCATCATCCTGGTT

PTCHD1

TTCGCAGTTCCTTCGTCTTTCACAGTAGCTCCTCAAGAAATGCCAAAACTTTGGGAAAAGAGGGAACCGATCAATCCACTTTTAT
TTGGGTGCATCTGAGCATGGGGGTGAGGGGCAGAGCCCGAAGGGTGAGAACAGAAGCCAGGCTGTGTGACCCCGAGAAGAGCACA
GGAAACCG

UBE2A

CAGATGAAGCAGGGAGAAGGGGGCCCCTTAAGTGGGAACTGACCATTTTTCTCTGTGTTGCAGGCCTGAAGGGACCCCGTTTGAG
GATGGTAAGAGAGAGTTTCTTTACCCACTTTTCAGGAGCCTGGTCATCTGGGGAAAGGGTTCCCAGTCATCCT

GABRD

cctccacagGAGTACACCATGACGGTGTTCCTGCACCAGAGCTGGCGGGACAGCAGGCTCTCCTACAACCACACCAACGAGACCC
TGGGTCTGGACAGCCGCTTCGTGGACAAGCTGTGGCTGCCCGACACCTTCATCGTGAACGCCAAGTCGGCCTGGTTCCACGACGT
GACGGTGGAGAACAAGCT

DISC1

1er couple d'amorces dans l'exon 2

GAACGTGGAGAAGCAGAAGGCTGCCCACCATCCAGAGAGGCTGAGTCCCATTGCCAGAGCCCCCAGGAGATGGGAGCCAAAGCTG
CCAGCTTGGACGGGCCTCACGAGGACCCGCGATGTCTCTCTCGGCCCTTCAGTCTCTTGGCTACACGGGTCTCTGCAGACTTGGC
CCAGGCCGCAAGGAACAGCTCCAGGCCAGAGCGTGACATGCATTCT

2ème couple d'amorces dans exon 11

CAGGGGAAGCCTGTCTGTAGAAGATGAGAGGCAGATGGATGACTTAGAGGGAGCTGCTCCTCTATTCCCCCCAGGCTCCACTCCG
AGGATAAAAGGAAGACCCCTTTGAAGGTATTGGAAGAATGGAAGACTCACCTCATCCC

ITGA6

1er couple d'amorces dans l'intron 1

Gactgggggcctccttataggagataaaaacactcggctggggagaagaaggaatattacagtgcctagtacataagtggagcta
caccagttgtccctgaatcctttgtgggag

2ème couple d'amorces dans exon 4

GGCGGTGTTATGTCCTGAGTCAGAATCTCAGGATTGAAGACGATATGGATGGGGGAGATTGGAGCTTTTGTGATGGGCGATTGAG
AGGCCATGAGAAATTTGGCTCTTGCC

NRXN1

1er couple d'amorces dans l'exon 2

TGATGTGCTGGCATCTTAGCTTGGCCCTGCAGAGGCAGAGAGAAAAGAAGAGGAGCTGTTGCGATTTCCACATCTAACAGCTTCT
GGCTATTTCGCAACTGCTGGGTTTGAGTCCTACTGTTGCCGTG

2ème couple d'amorces dans exon 22
TGGCAGCCGAAAACGATGCCAACATCGCCATAGTGGGAAATGTGAGACTGGTTGGTGAAGTGCCTTCCTCTATGACAACTGAGTC
AACAGCCACTGCCATGCAATCAGAGATGTCCACATCAATTATGGAGACTACCACGACCCTGGCTACTAGCACAGCCAGAAGAGGA
AA

SLC25A12
Cctgactgttttccacagcagctgcaccattttcctgttgtttcctcacctgcttcagggccagaagccagactgtgtaagctca
ctgcataggagtcattctgtgatcacccttcacttttaccttggagaatccatttgctgttctgttacgttgaacctcctgtttg
ctgcatt

NLGN1
1er couple d'amorces dans l'exon 3
CACTGGTGGCTACCAACTTTGGAAAGATAAGAGGGATTAAGAAGGAACTCAATAATGAAATTTTGGGGCCTGTTATTCAATTTCT
TGGGGTTCCATATGCAGCCCCACCAACAGGGGAACGTCGTTTTCAGCCTCCAGAACCA
2ème couple d'amorces dans exon 6
GTTGGCCACAAAAGTTGGTTGCAATGTTTCAGATACAGTAGAGTTAGTGGAATGCCTACAGAAGAAGCCTTACAAAGAACTTGTT
GACCAAGATATTCAACCAGCTCGATACCACATAGCCTTTGGACCTGTGATTGATGGTGATGTAATACCAGACGACCCCCAG

OXTR
tggggcgagtaggtagtttggagattccctcggggaggtgatttggttttagattcccactcccggaggaacgttgctgattttg
accctcccttctcccccagTGGAAGCCGCTGAACATCCCGAGGAACTGGCACGCTGGGGGCTCTGGGCTTGTGGCCGGTAGAGGA
TTCCCGCTCATTTGCAGTGGCTCAGA

TAGLN3
Gcttcagagtttccaaatggccccaagaggccccagggtctggtggctgactctatggaatggccaaagtccagggagattcatt
ataagttggaggggatatctgatattccccaggatcactgtctgaagcttaggccaatgctggtcaccatacaacagggcaggag

AHI1
1er couple d'amorces dans l'intron 3
TGACGGAGGAGCTAAAGGAAGGGTATTATAGCTAGAACATAGGCATCTAAGGGGATATTTGTCTTGATTTGAAGCCCTGGAGATA
GATCAGGAGGTATGGAGCCCT
2ème couple d'amorces dans exon 6
Gaccagcctgggcaatataacaagactccatctccacaaaagataaattttttttaaaagctaataaaatttgttcttcttccat
gatgatcaaagccagacctctgaagc

PARK2
TGACCCAGGTAAGGAAATGCAGTGTCAGCATGAGACTGCCAGGAAAATGAATGTGTACTAACACATTGCCTTTCAGTTTTTCTAA
TGATGTATCACCCGTCTTTGAAAAGAAAAGACATTCTCTTCTGTGGTTGTGATAGTTAATGATAGCCGAAGTTTCGTTTATGCGC
CTTTGTCTT

CNTNAP2
1er couple d'amorces dans l'intron 1
ggcaagagcttggctagagagactgatgtagatggcagcttcttaggagttgtttgtgcagggagagttaactgcatttggctta
ggtaggtcagtgaatgaaaagtgaagaccatggcaaaaccaagtttcttatttttatttatggttataacttaatgagcacggggg
ttg
2ème couple d'amorces dans intron 13
gcttgttttctggggaatgaagctaagaaagaatgattttgaggaaaaaatagtccattgttttaaacttacggatttttaaatt
gtatgtgcatatatgtttctagtgcttaactgtcagtagtggctgtgggaca

FOXP2
1er couple d'amorces dans l'intron 1
GGACTGGTGAGAGGGAATGACAACATAAATCAGCCCTCCAACATAATGACCCTAATCAGCTAGAAATAACTGGAAACGTCATGAT
GAGCTATGTCTCTGTATTACTTCGGCAAGATTCTGTGGCTAGCGAGGTTT
2ème couple d'amorces dans intron 9
Actggacctcagtgggaatgcatgaagtgtgtagacaatcctggcaggcactttgctttgagaacccttcacccccttcacagctg
ttggcactagtccattgc

Annexe 2

HOXA1
GGGTGTCCTACTCCCACTCAAGTTGTGGTCCAAGCTATGGCTCACAGAACTTCAGTGCGCCTTACAGCCCCTACGCGTTAAATCA
GGAAGCAGACGTAAGTGGTGGGTACCCCCAGTGCGCTCCCGCTGTTTACTCTGGAAATCTCTCATCTCCCATGGTCC

MET
Caccaaagacatggcaacacccccatggtgagcacagttcctcacacattcagattacctcccatttctctgtcctcttcctcct
caacccttttcccttggtttggtcagagctgctttcaaggccttccgtgcccccatttctccagcccagtttgctcgtttcttctt
taggcattaggcttagtgattctcgccagagccatctacgctttc

SMARCA2
1er couple d'amorces dans l'exon 28
GCAATTTGGAGGAAATGGAAGAGGAAGTACGGCTTAAGAAGCGAAAAAGACGAAGAAATGTGGATAAAGATCCTGCAAAAGAAGA
TGTGGAAAAAGCTAAGAAGAGAAGAGGCCGCCCTCCCGCTGAGAAACTGTCACCAAATCCCCCCAAACTGACAAAGCAGATGAAC
GCT
2ème couple d'amorces dans exon 4
CCACACCCATCTCCATTAGGAGCCCCAGAGCACGTCTCCAGCCCTATGTCTGGAGGAGGCCCAACTCCACCTCAGATGCCACCAA
GCCAGCCGGGGGCCCTCATCCCAGGTGATCCGCAGGCCATGAGCCAGCCCAACAGAGGTCCCTCACCTTTCAGTCCTGTCCAGC

KCNMA1
AGGAGGTCCCTCATCCTCATTCCTCAGGAAAGGATGCTGAGGCTCAGAGAACAGTGGCACCAGTTGGGATCCAATGCCTCTTTGA
CTCTAATACTATATTCTACAGTTGTCTTTTGTGGCAGACCTG

PTEN
1er couple d'amorces dans l'intron 1
Aacgtgggagtagacggatgcgaaaatgtccgtagtttgggtgactataacatttaaccctggtcaggttgctaggtcatatatt
ttgtgtttcctttctgtgtattcaacctagggtgtgtttggctagacggaactcttgcctggttgcaagtgtcaagccaccgatt
gctttcttaggctatctatatggtctcttcctgagggcta
2ème couple d'amorces dans intron 5
Ccagggtgaaagcatttaagatctacaagctacaattttcaattatacaatgttattattaactatagtcactatgctgtccagt
agagcttcagatcttgttcatcttgtgttcctccctccc

HRAS
CCTGTTCTGGAGGACGGTAACCTCAGCCCTCGGGCGCCTCCCTTTAGCCTTTCTGCCGACCCAGCAGCTTCTAATTTGGGTGCGT
GGTTGAGAGCGCTCAGCTGTCAGCCCTGCCTTTGAGGGCTGGGTCCCTTTTCCCATCACTGGGTCAT

DHCR7
AGCCGTCTATTGGGAAGGATGTTACTTAGATGTTTATTGCACAACTCAATGCTTGTGGCTAAAGAGCTGACTCCTGGGTGAATGA
ACTCTGTAATAAGCTAAAAGTACTTCTTTGGTCTTGTTTTAATCCCTTTTGACAACATTCTCCCAGTGGCTT

CACNA1C
1er couple d'amorces dans l'intron 1
aaatgggtagccctttgcttccctgtgtctcttggaaaatatctgctatccttggcccctcttctgtagctgtaggggaaggttt
ctcctggcctcccacaaagctgggggagcctaactcaccctagagaaaggtggacctgcctgcctactgcctgagtgccaggctg
agagcctcatctctgcattgctattctggtggcacaag
2ème couple d'amorces dans intron 32
Cgtgcctgctctaacactcatttgccttttcccggtttgtttccttcattttattttctctccccaccttcttatttttttttt
taatttgtttgtttgaattggtttgaaggtttttttttccttgttgctttattttgaaatctttttttttttttaactttggaac
gcattaggccttcccctttc

MDAG2
1er couple d'amorces dans l'exon 7
GCTGTTCCTTCTGAGGAGCTAACATTTAGTTGGTTTAAAAATGGTCGTCCATTAAGAAGTTCTGAGCGGATGGTCATTACACAGA
CTGATCCTGATGTCTCTCCGGGAACAACAAACTTGGACATCATTGATTTAAAATTCACGGATTTTGGGACGTACACATGTGTAGC
ATCTCTGAAGGGAGGAGGAATATCTGA
2ème couple d'amorces dans intron 1
Tttttttgcctgtcagcagttggcacccttagctttcaggatggaagcacacacacacacacacacacacacacacacacaca
tccaggtcatagttaatagtggactaaaatgtatgtcttctcttgggacaagcaggtggtgcccaaaaaataacttctgtgtttt
tgaggtctggtggga

Annexe 2

UBE3A

1er couple d'amorces dans l'exon 5

AACTGAGGGCTGTGGAAATGAAGCCTGCACGAATGAGTTTTGTGCTTCCTGTCCAACTTTTCTTCGTATGGATAATAATGCAGCA
GCTATTAAAGCCCTCGAGCTTTATAAGATTAATGCAAAACTCTGTGATCCTCATCCCTCC

2ème couple d'amorces dans intron 1

Gcttggcaaccttgaaagagaatttagcgtctacatttttaaatgacttttatggatatgctaaattagtaacagtccaaaat
ctgtttgagattattaagtggcgagggtgct

DOC2A

CCGCTGGTTGGTTGATCTATGTCCCATTAAGCCCGTACCTCTCTGATGCTCAAGAACCATCAGCGGCTCCCTAGCCCCTTTGGCA
GCAGGCCAAAATTCTTCCCTGCCATTCCTGCCCCTCAATATCTCCTGCCTGCCAGGTGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCA
CTTTGGGAG

MAPK3

TGGGTTAAGGAGCCTTTCCTGGGAATGGGGGCGAAGGGTTCAGGGCCAGTAGAATGGAAGGGGATTGAGGAGAGGGGAAGTCAGT
GAGCGGTCAGTCTCTTCCTCTGTTTGTAAAGTCACCGAAGGGC

BZRAP1

AGCAGAGAGGATGGCACTGTGTAGAGAATTGGATGGGGCATGGACAGGGCAGGGCGAGAGCCGCAGCTGTGTGTAGAGATTTAGG
AACAGGCTTAGCTCTGAATCTGTAACCCTGGAAGCTTGGGAGCCTGCTCAGTTTCTTTTCCCTGGGTCCTCT

DLG4

CACTCCTCACAGTGCTGCATAGCGACCTCTTCCAGGCCTTGCTGGgtgagtagcccgttttctgagggacctgggcctccaaggg
ccattactgaacttcgggggct

RNF135

GATGGGCTAGGATCACTCCACCTAACAAGCTGTCTCTAAGATCACCAGTGACCTCTGTGTATAACGTTCTGGTGCCTGTCTCTAT
AAGCGTTCTGGTGCCTGTCTTCATTGACCTTTCAGCAGCCTTT

UBE2C

Tggtgggcctagatgaagacgctcaaggaccctcgtgacttggccgagacaggggaagggagaagttgagtcgggcaaggaagag
atgctaaagcctggggaattaagaacatgccagaatcatcccgagggagtctggaattagggagggtgaggactcgctaggatcg
tcctgtggatctggtgagtataccctgagctgagcctga

MLC1

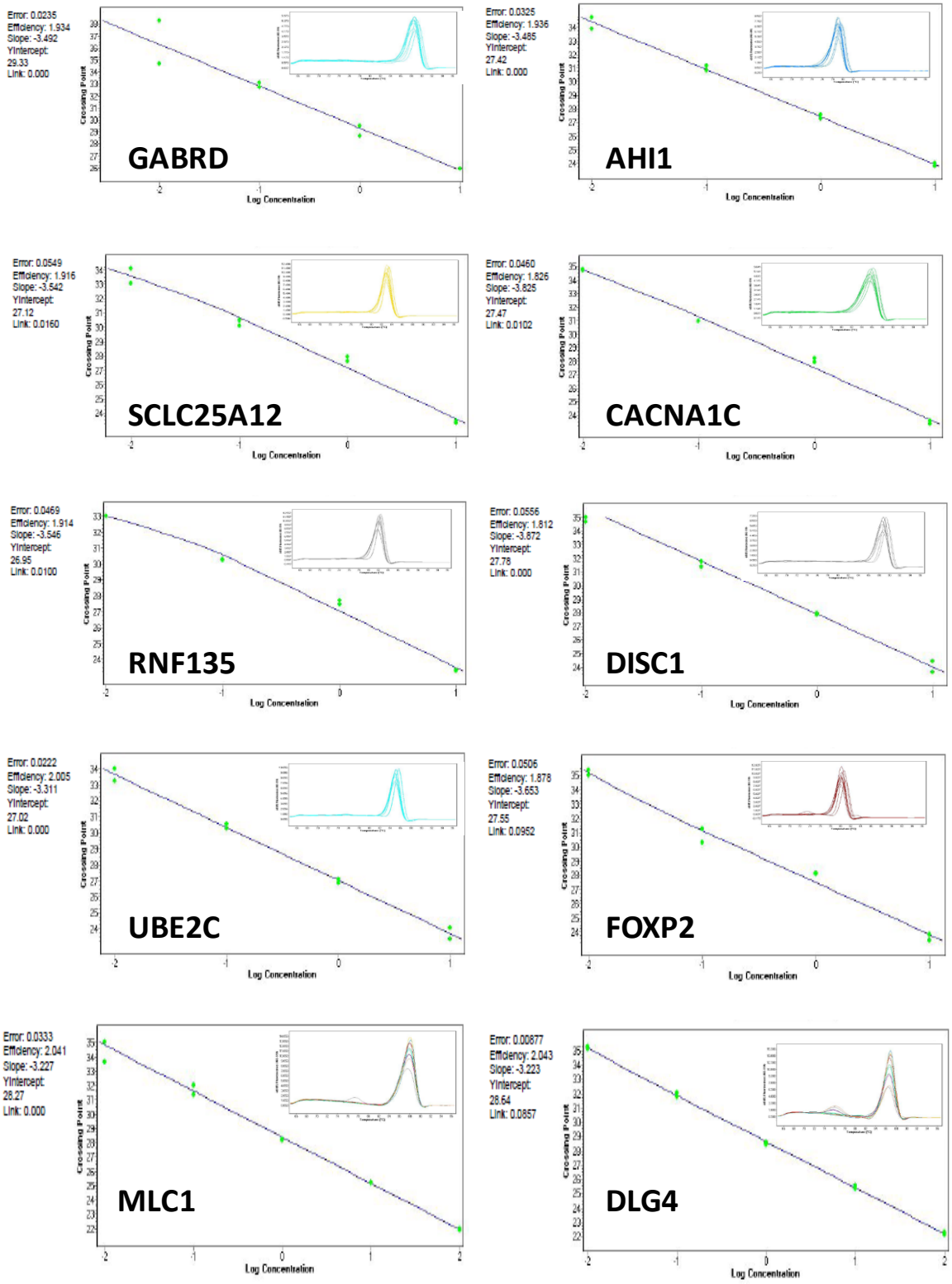
CcccttggcagATCAACTTCAACCTCATCCTGCTGCTCCTGCTGGAGCTGCTCATGGCGGCCACGGTGATCATCGCTGCACGGTC
CAGCGAGGAGGACTGCAAGAAAAAGAAGgtgggtgca

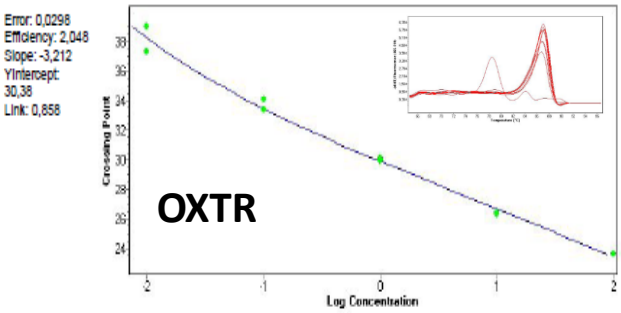
SHANK3

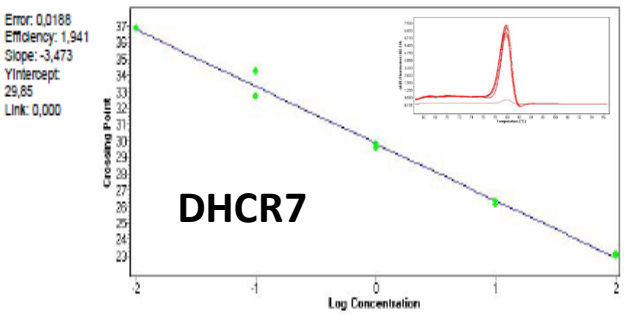
ACAGGGATGTCCGCAACTACAACAGCCAGACAGCCTTCCAGGTACACCGGTGGTTTACAGGAGCTCAAGGCTGCCCCAGAGGTGT
CTGTCTCTGTGTCCATGTGACTTGACTTCTCTGAACCTTGGTTCTTCCCTGGAAGGCCCTAAGGGAGCACCTCCCCCAGGACTGC
CCACAGGAGGTGTTGGGGGACGAGCCCAGCACGCGAGGGGTATTTGGTGTTGATGTTCCCTTCGT.

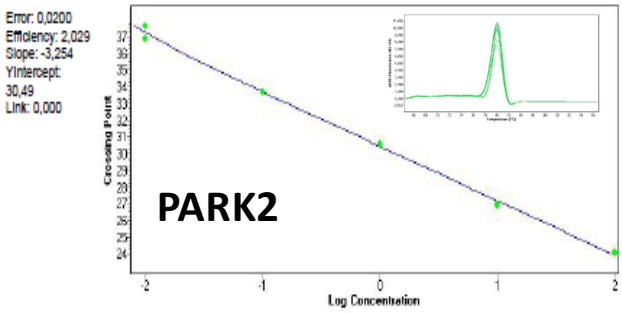
Annexe 2

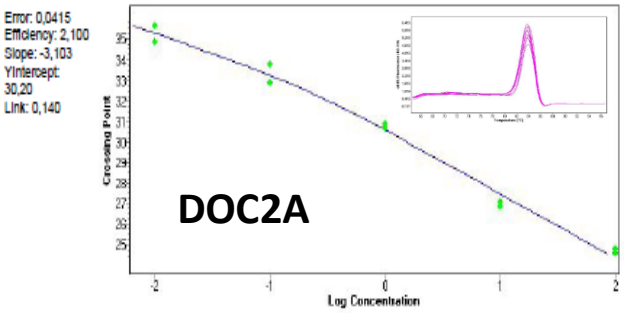
Annexe 3 : Paramètres de QPCR pour les 30 gènes autosomiques étudiés.

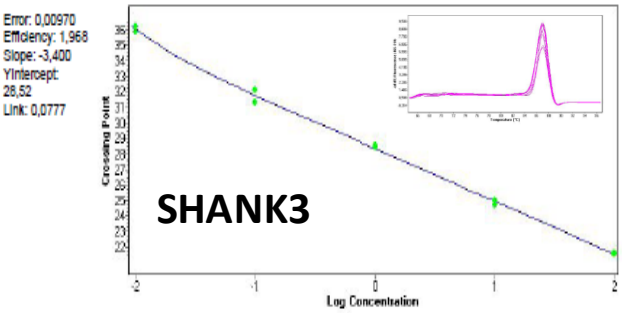


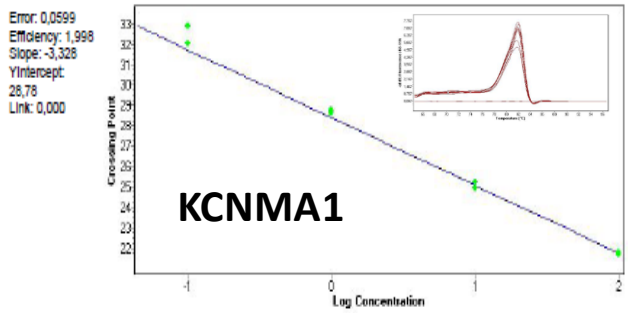

Error: 0,0298
Efficiency: 2,048
Slope: -3,212
YIntercept: 30,38
Link: 0,858
OXTR
Crossing Point
Log Concentration

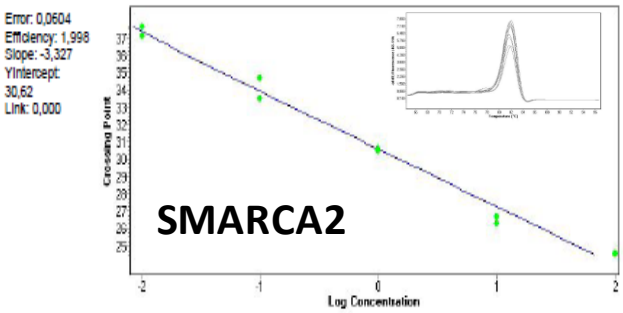

Error: 0,0188
Efficiency: 1,941
Slope: -3,473
YIntercept: 29,65
Link: 0,000
DHCR7
Crossing Point
Log Concentration

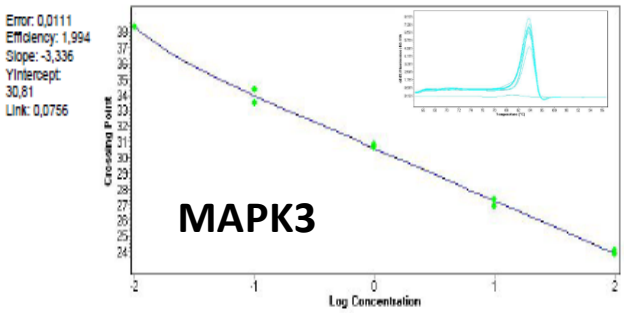

Error: 0,0200
Efficiency: 2,029
Slope: -3,254
YIntercept: 30,49
Link: 0,000
PARK2
Crossing Point
Log Concentration

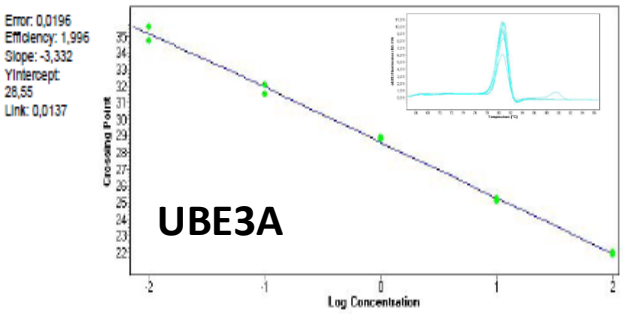

Error: 0,0415
Efficiency: 2,100
Slope: -3,103
YIntercept: 30,20
Link: 0,140
DOC2A
Crossing Point
Log Concentration

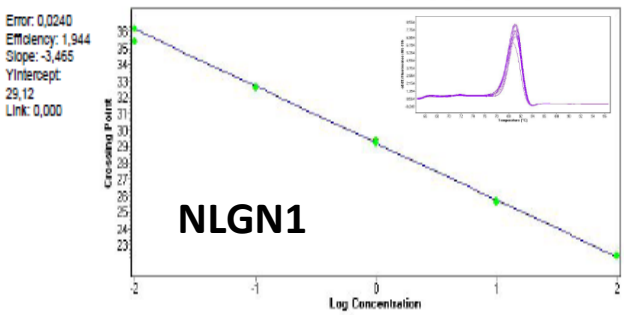

Error: 0,00970
Efficiency: 1,968
Slope: -3,400
YIntercept: 28,52
Link: 0,0777
SHANK3
Crossing Point
Log Concentration


Error: 0,0599
Efficiency: 1,998
Slope: -3,328
YIntercept: 28,78
Link: 0,000
KCNMA1
Crossing Point
Log Concentration

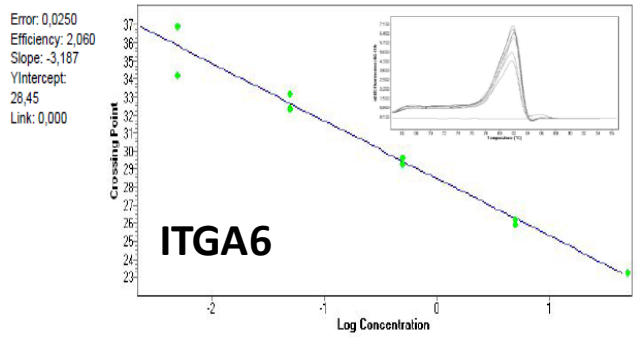

Error: 0,0604
Efficiency: 1,998
Slope: -3,327
YIntercept: 30,62
Link: 0,000
SMARCA2
Crossing Point
Log Concentration

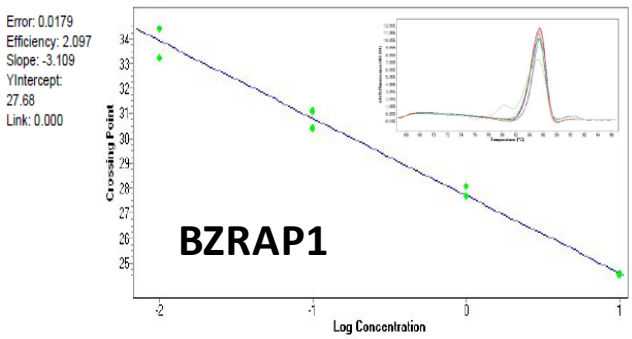

Error: 0,0111
Efficiency: 1,994
Slope: -3,336
YIntercept: 30,81
Link: 0,0756
MAPK3
Crossing Point
Log Concentration

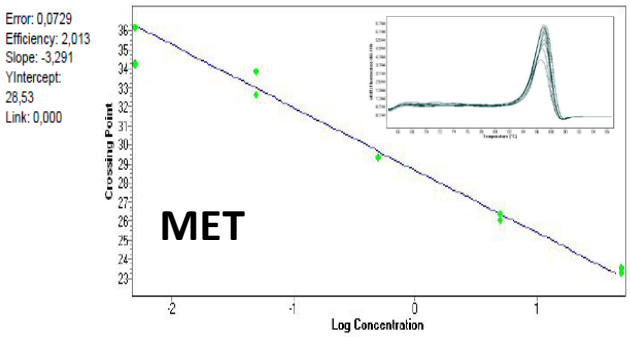

Error: 0,0196
Efficiency: 1,996
Slope: -3,332
YIntercept: 28,55
Link: 0,0137
UBE3A
Crossing Point
Log Concentration

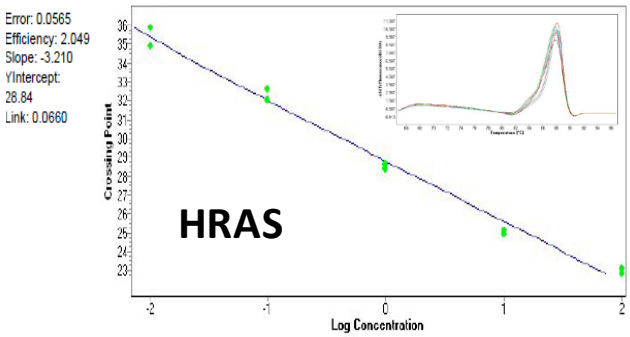

Error: 0,0240
Efficiency: 1,944
Slope: -3,465
YIntercept: 29,12
Link: 0,000
NLGN1
Crossing Point
Log Concentration

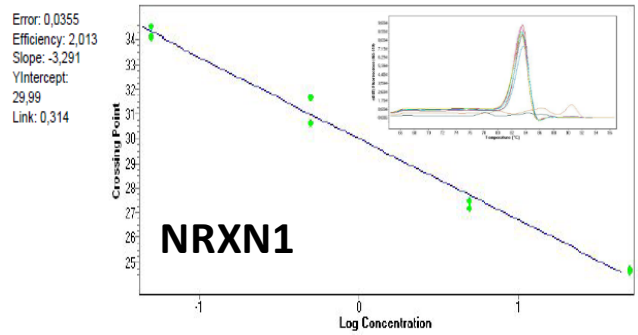
Annexe 3

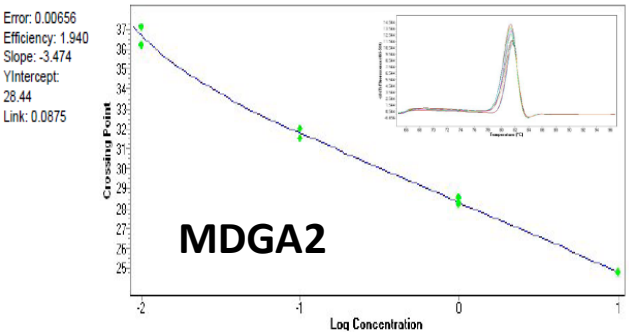

Error: 0,0250
Efficiency: 2,060
Slope: -3,187
YIntercept:
28,45
Link: 0,000
ITGA6
Crossing Point
Log Concentration

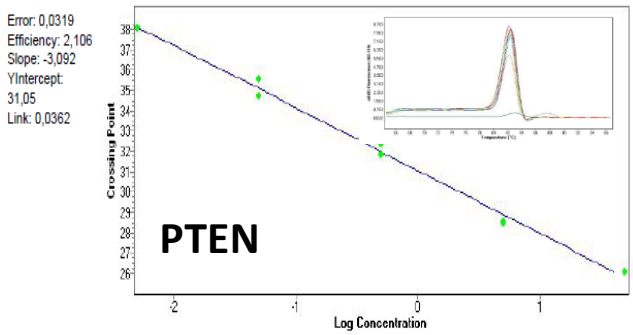

Error: 0.0179
Efficiency: 2.097
Slope: -3.109
YIntercept:
27.68
Link: 0.000
BZRAP1
Crossing Point
Log Concentration

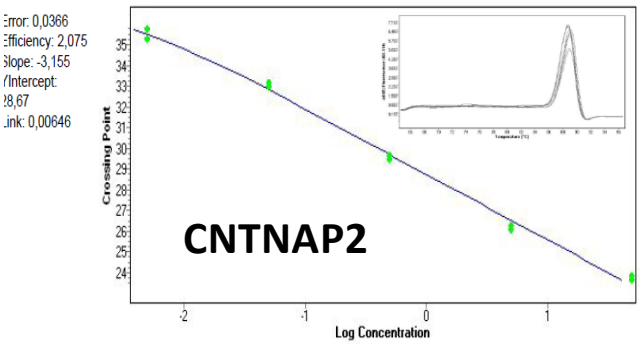

Error: 0,0729
Efficiency: 2,013
Slope: -3,291
YIntercept:
28,53
Link: 0,000
MET
Crossing Point
Log Concentration

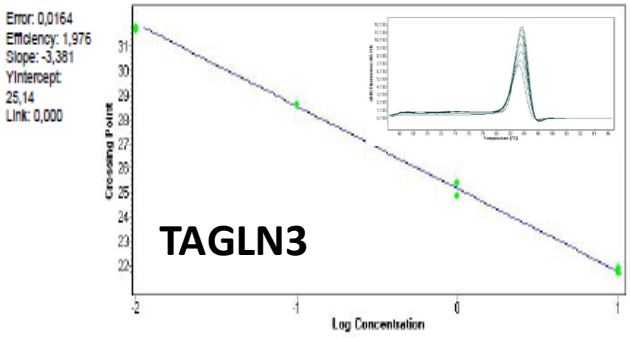

Error: 0.0565
Efficiency: 2.049
Slope: -3.210
YIntercept:
28.84
Link: 0.0660
HRAS
Crossing Point
Log Concentration

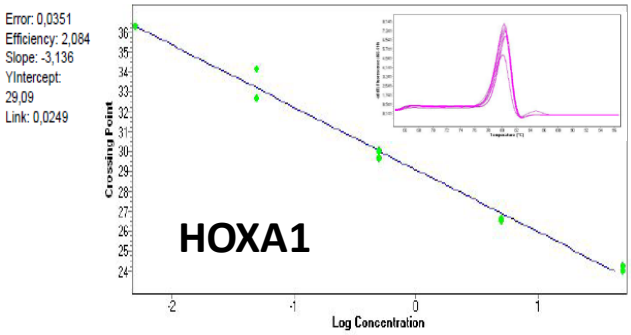

Error: 0,0355
Efficiency: 2,013
Slope: -3,291
YIntercept:
29,99
Link: 0,314
NRXN1
Crossing Point
Log Concentration


Error: 0.00656
Efficiency: 1.940
Slope: -3.474
YIntercept:
28.44
Link: 0.0875
MDGA2
Crossing Point
Log Concentration


Error: 0,0319
Efficiency: 2,106
Slope: -3,092
YIntercept:
31,05
Link: 0,0362
PTEN
Crossing Point
Log Concentration


Error: 0,0366
Efficiency: 2,075
Slope: -3,155
YIntercept:
28,67
Link: 0,00646
CNTNAP2
Crossing Point
Log Concentration


Error: 0,0164
Efficiency: 1,976
Slope: -3,381
YIntercept:
25,14
Link: 0,000
TAGLN3
Crossing Point
Log Concentration


Error: 0,0351
Efficiency: 2,084
Slope: -3,136
YIntercept:
29,09
Link: 0,0249
HOXA1
Crossing Point
Log Concentration

Annexe 3

Annexe 4 : Publications et Communications scientifiques

Publications scientifiques

1. **Sylviane Marouillat Védrine**, Patrick Vourc'h , Refaat Tabagh, Laurence Mignon, Saskya Höfflin, Catherine Cherpi-Antar, Olivier Mbarek, Agathe Paubel, Claude Moraine, Martine Raynaud and Christian R. Andres. (2011) A functional tetranucleotide (AAAT) polymorphism in an *Alu* element in the *NF1* gene is associated with mental retardation. *Neurosci. Lett.* sous presse.

2. Tabagh R, Andres CR, **Vedrine S**, Cherpi-Antar C, Thepault RA, Mignon L, Dufour-Rainfray D, Moraine C, Vourc'h P. (2010) Study of the serotonin transporter (SLC6A4) and BDNF genes in French patients with non syndromic mental deficiency. *BMC Med Genet* 11: 30.

3. Martin I, Vourc'h P, Mahe M, Thepault RA, Antar C, **Vedrine S**, Praline J, Camu W, Andres CR, Corcia P. (2009) Association study of the ubiquitin conjugating enzyme gene UBE2H in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 10(5-6): 432-5.

4. Martin I, Andres CR, **Vedrine S**, Tabagh R, Michelle C, Jourdan ML, Heuze-Vourc'h N, Corcia P, Duittoz A, Vourc'h P. (2009) Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells. *Brain Res* 1284: 22-30.

5. Daoud H, Gruchy N, Constans JM, Moussaoui E, Saumureau S, Bayou N, Amy M, **Vedrine S**, Vu PY, Rotig A, Laumonnier F, Vourc'h P, Andres CR, Leporrier N, Briault S. (2009) Haploinsufficiency of the GPD2 gene in a patient with nonsyndromic mental retardation. *Hum Genet* 124(6): 649-58.

6. Daoud H, Bonnet-Brilhault F, **Vedrine S**, Demattei MV, Vourc'h P, Bayou N, Andres CR, Barthelemy C, Laumonnier F, Briault S. (2009) Autism and nonsyndromic mental retardation associated with a de novo mutation in the NLGN4X gene promoter causing an increased expression level. *Biol Psychiatry* 66(10): 906-10.

7. Martin I, Gauthier J, D'Amelio M, **Vedrine S**, Vourc'h P, Rouleau GA, Persico AM, Andres CR. (2007) Transmission disequilibrium study of an oligodendrocyte and myelin glycoprotein gene allele in 431 families with an autistic proband. *Neurosci Res* 59(4): 426-30.

Posters

Marouillat Védrine S, Vourc'h P, Tabagh R, Höfflin S, Cherpi-Antar C, Mbarek O, Paubel A, Raynaud M, Andres CR. A functional tetranucleotide (AAAT) polymorphism in an Alu element in the NF1 gene is associated with mental retardation. 6th Forum of European Neuroscience, July 3–7 2010, Amsterdam, Netherlands.

Védrine S., Vourc'h P., Laumonnier F., Bonnet Brilhault F., Barthélémy C., Andres. C.R. Détection de microdélétions et microduplications dans l'autisme. Journée de la recherche des facultés de médecine de Tours et de Poitiers, Dec 2009, Poitiers.

Védrine S., Bacle E., Domenger C., Vourc'h P., Laumonnier F., Andres C.R. Détection de microduplications ou microdélétions (copy number variant, CNV) dans le génome de patients autistes. Forum de l'école doctorale SST à Tours, Juin 2008.

Védrine S., Michelle C., Becker M., Laumonnier F., Vourc'h P., Andres C.R. Criblage total du génome humain par CGH-array et étude d'association pour l'identification de gènes de susceptibilité de l'autisme. Forum de l'école doctorale SST à Tours, Juin 2007.

Annexe 4

Sylviane Marouillat

Etudes des variations structurales chromosomiques dans l'autisme et la déficience mentale

Résumé

L'autisme et la déficience mentale sont deux syndromes neuro-développementaux impliquant des facteurs génétiques. Notre travail a consisté à rechercher de nouveaux gènes candidats ou facteurs de susceptibilité chez 106 patients atteints d'autisme et 68 de déficience mentale non syndromique sporadique.

Nous avons observé une association entre l'allèle 4 d'un marqueur microsatellite GXAlu localisé en 17q11.2 dans l'intron 27b du gène *NF1* et des patients atteints de déficience mentale non-syndromique.

Nous avons contribué à la mise en évidence d'une augmentation d'expression du transcrit NLGN4X, chez un patient autiste avec un retard mental non-syndromique présentant une mutation dans le promoteur du gène *NLGN4X*.

L'étude de la région 22q13 par MLPA, nous a permis de mettre en évidence une délétion *de novo* d'au moins 1Mb chez un patient autiste.

Les variations de nombre de copies (CNV) ont été étudiées chez des autistes par QPCR. Nous avons identifié 27 variations réparties sur 17 gènes parmi les 36 explorés. Les CNV observés dans les gènes *ITGA6*, *TAGLN3*, *HOXA1*, *DLG4* et *UBE2C* sont intéressants en raison de l'implication de ces gènes dans le développement cérébral ou la fonction neuronale.

L'ensemble de ces résultats nécessite des expériences complémentaires de validation.

Mots clés : autisme, déficience mentale, microsatellite, étude d'association, étude d'expression, gène *NLGN4X*, région 22q13, variations de nombre de copies de l'ADN (CNV), MLPA, QPCR.

Résumé en anglais

Autism and mental retardation are two neurodevelopmental syndromes involving genetic factors. Our work consists in finding new candidate genes or susceptibility factors. 106 autistic patients and 68 sporadic non-syndromic mentally retardated patients were studied.

We have shown an association between allele 4 of a microsatellite marker *GXAlu* locasized in 17q11.2, in intron 27b of the *NF1* gene and patients with non-syndromic mental retardation.

We contributed to the study on the *NLGN4X* gene. We demonstrated an increase of expression of NLGN4X transcript, in an autistic patient with non-syndromic mental retardation linked to a mutation in the *NLGN4X* gene promoter.

We study the 22q13 region with MLPA method, we have demonstrated a deletion *de novo* of at least 1Mb in an autistic patient.

The copy number variations (CNV) have been investigated in an autistic population by QPCR. We identified 27 variations on 17 genes among the 36 investigated. The CNV observed in *ITGA6*, *TAGLN3*, *HOXA1*, *DLG4* and *UBE2C* genes are interesting because of the involvement of these genes in brain development or neuronal function.

These results require further experiments for validation.

Keywords : autism, mental retardation, microsatellite, association study, expression study, NLGN4 gene, 22q13 region, copy number variations (CNV), MLPA, QPCR.