



HAL
open science

Étude biochimique et génétique des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine comme facteurs de vulnérabilité à l'autisme

Cécile Pagan

► **To cite this version:**

Cécile Pagan. Étude biochimique et génétique des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine comme facteurs de vulnérabilité à l'autisme. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T041 . tel-00923164

HAL Id: tel-00923164

<https://theses.hal.science/tel-00923164>

Submitted on 2 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

École Doctorale Gc2iD

DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Neurosciences

Cécile PAGAN

**Étude biochimique et génétique
des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine
comme facteurs de vulnérabilité à l'autisme.**

- THESE -

dirigée par les Professeurs

Jean-Marie Launay et Thomas Bourgeron

soutenue le 8 octobre 2012

Jury :

Professeur Marion Leboyer	Présidente
Docteur Valérie Simonneaux	Rapporteur
Docteur Christel Depienne	Rapporteur
Professeur Dominique Bonnefont-Rousselot	Examinatrice
Professeur Thomas Bourgeron	Directeur de thèse
Professeur Jean-Marie Launay	Directeur de thèse

RESUME

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont définis par l'association de troubles des interactions sociales, de troubles du langage et de comportements stéréotypés et intérêts restreints. Cette entité recouvre en réalité des situations cliniques très hétérogènes, tant par le spectre de sévérité des symptômes que par la variété des comorbidités et signes associés. Si l'étiologie génétique semble prépondérante, les mécanismes moléculaires impliqués semblent complexes et hétérogènes, et les associations génotype-phénotype inconstantes. Une stratégie possible pour décomposer cette hétérogénéité clinique et génétique consiste à s'appuyer sur des endophénotypes, ou phénotypes intermédiaires, pour définir des catégories plus homogènes sur le plan physiopathologique. Parmi les nombreux endophénotypes biologiques décrits dans les TSA, l'augmentation de la sérotonine sanguine est l'un des mieux documentés, mais les mécanismes en sont encore inconnus. Des déficits en mélatonine (qui est un dérivé de la sérotonine) ont également été rapportés par plusieurs études.

L'objectif de cette thèse était de caractériser les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine dans les TSA, et d'en étudier les mécanismes et les corrélats cliniques. L'exploration exhaustive de la voie sérotonine-mélatonine à partir de prélèvements sanguins dans une grande cohorte de plus de 200 patients avec TSA et leurs apparentés a permis d'estimer la prévalence de l'hypersérotoninémie dans les TSA à 45%, et celle du déficit en mélatonine à environ 60%. Cette étude a mis en évidence des anomalies du catabolisme de la sérotonine ainsi que des anomalies de la synthèse de la mélatonine, et a ainsi permis de proposer des mécanismes biochimiques à ces deux endophénotypes. Les anomalies de synthèse de la mélatonine, qui pourraient s'accompagner d'une augmentation de la N-acétylsérotonine, ont été confirmées sur des échantillons de glandes pinéales et de tractus gastro-intestinal (sources majeures de mélatonine et de sérotonine de l'organisme) issus de patients avec TSA. Les gènes impliqués dans la synthèse de la mélatonine (gènes codant pour les enzymes AANAT et ASMT) ont été étudiés dans les TSA, ainsi que dans des pathologies neurodéveloppementales connexes. Les anomalies de la synthèse de mélatonine pourraient être associées aux troubles du sommeil, fréquents chez les patients avec TSA.

MOTS-CLEFS

Autisme, sérotonine, mélatonine, glande pinéale, N-acétylsérotonine, AANAT, ASMT.

SUMMARY

Autism Spectrum Disorders (ASD) are defined by three core symptoms: social interaction impairments, language impairments, and stereotyped behavior and restricted interests. Beyond this definition lie extremely diverse clinical situations, in terms of symptoms severity as well as comorbidities and associated features. The aetiology of ASD is considered to be mostly genetic, but the molecular mechanisms involved seem to be complex and heterogeneous, and the genotype-phenotype associations elusive. One possible strategy for decomposing the clinical and genetic complexity is to focus on endophenotypes, or intermediate phenotypes, to define more homogeneous pathophysiological categories. Among many biological endophenotypes reported in ASD, the increase of blood serotonin is well documented but still unexplained. Deficits in melatonin (which chemically derives from serotonin) have also been described.

The aim of this work was to characterize the impairments of the serotonin-melatonin pathway in ASD, and to address their mechanisms and clinical correlates. Based on a comprehensive assessment of the serotonin-melatonin pathway from blood samples in a large cohort of 200 patients with ASD and their relatives, the prevalence of hyperserotonemia in ASD was estimated to be 45%, and that of melatonin deficit about 60%. Impairments of serotonin catabolism were shown, as well as impairments of melatonin synthesis, thus providing biochemical mechanisms for both endophenotypes. Abnormal melatonin synthesis, which may involve an increase in N-acetylserotonin, was confirmed on pineal gland and gastro-intestinal tract samples (i.e. the major sources of melatonin and serotonin) from patients with ASD. The genes involved in melatonin synthesis (coding for AANAT and ASMT enzymes) were studied in ASD and in related neurodevelopmental disorders. Abnormal melatonin synthesis may be associated with sleep disorders, frequently observed in patients with ASD.

KEY WORDS :

Autism, serotonin, melatonin, pineal gland, N-acetylserotonin, AANAT, ASMT.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein des laboratoires :

Service de Biochimie et Biologie Moléculaire

(dirigé par le Professeur Jean-Marie Launay)

Hôpital Lariboisière

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

2 rue Ambroise Paré

75010 Paris

et

Unité Génétique Humaine et Fonctions Cognitives

(dirigée par le Professeur Thomas Bourgeron)

CNRS URA 2182

Institut Pasteur

25 rue du Dr Roux

75015 Paris

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma gratitude à mes deux directeurs de thèse pour avoir encadré ce travail. Vos approches sont très différentes, et c'est pour moi doublement formateur. Je remercie Thomas Bourgeron pour m'avoir accueillie dans ce cadre de recherche exceptionnel qu'est l'Institut Pasteur, et pour m'avoir fait découvrir le passionnant domaine de l'autisme. Je remercie Jean-Marie Launay pour m'avoir fait le privilège d'être mon directeur de thèse, pour avoir activement pris part à ce projet, pour m'avoir aidée, soutenue et encouragée tout au long de ce parcours, et pour m'avoir fait partager votre vision du métier, de la science et de l'humain.

Je remercie vivement les membres du jury de me faire l'honneur d'accorder leur attention à ce travail. Je suis reconnaissante à Marion Leboyer, pionnière de la psychiatrie biologique en France sans qui ce travail n'aurait pas été possible, et à Marie-Christine Mouren d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie Valérie Simonneaux, qui apporte son expertise de chronobiologiste, et Christel Depienne, qui apporte son expertise de neuro-généticienne, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Dominique Bonnefont-Rousselot pour avoir accepté le rôle d'examinatrice.

Je remercie chaleureusement les membres actuels ou passés de l'Unité Génétique Humaine et Fonctions Cognitives pour leur aide et leur disponibilité. Hany Goubran-Botros, Nathalie Lemièrre, Kerren Murray, Fabien Fauchereau, Pauline Chaste, Anne-Marie Le Sourd ont activement contribué à la partie expérimentale de ce travail. Richard Delorme a un rôle clef de coordination, à l'interface de la clinique et de la recherche – c'est une chance de pouvoir travailler avec des cliniciens. Je remercie avec émotion les amis, Oriane Mercati (qui a exercé son œil de lynx pour corriger les coquilles de ce manuscrit), Claire Leblond, Elodie Ey, Guillaume Huguet, Nicolas Torquet, Isabelle Scheid, Anna Maruani, pour les bons moments passés ensemble, et je vous souhaite bon vent à tous pour tracer votre chemin. Enfin je remercie Corinne Baran, Jean-Pierre Bourgeois, Roberto Toro, Isabelle Cloëz-Tayarani, Marina Konyukh, qui font vivre ce laboratoire.

Je remercie les membres du service de Biochimie et Biologie moléculaire de l'hôpital Lariboisière, et tout particulièrement Jacques Callebert et l'équipe du secteur Neurochimie pour leur contribution essentielle à ce projet.

Mes remerciements vont également aux nombreux acteurs qui ont contribué à ce travail d'interface : Didier Chevenne, Odile Varoquaux et leurs équipes respectives pour la biochimie ; Frédérique Amsellem, Laurence Letellier, et les équipes des centres d'investigation clinique des Hôpitaux Robert-Debré et Henri-Mondor pour l'inclusion des patients et des témoins, Stéphane Jamain et Christelle Dussert pour les ADN et les cellules, Flavie Mathieu, Nita Nguyen et Hakim Laouamri pour la gestion des données cliniques, la fondation FondaMental qui constitue le socle de ce travail, Olivia Chény et Sylvie Gerbaud pour les aspects réglementaires... Il y a de nombreuses pierres à cet édifice et toutes sont essentielles.

Je dédie ce travail à mes parents, qui m'ont donné le goût de l'indépendance, de l'exploration et de la persévérance (devrais-je dire de l'obstination ?). Je remercie les membres de ma famille pour leur présence : mon frère Benoît, Claire et le petit Mathis, Françoise et Claire, les grand-parents pour leur patience (que c'est long une thèse !), les oncles et tantes. Je remercie mes amis pour leur soutien et pour les moments partagés, Darja, Catherine et leur bonheur de vivre communicatif, Alix, Noelle, Lise, Aurélie et les bouffes de l'angoisse, Lucie, Nadia et tous ceux que je ne cite pas. Enfin je remercie Guillaume, qui partage ma vie et me rend plus forte.

SOMMAIRE

Ce manuscrit est composé d'une introduction portant sur l'autisme et ses étiologies, ainsi que sur les données de la littérature concernant les anomalies de la sérotonine et de la mélatonine associées à l'autisme – cette section est constituée par un chapitre de livre, publié en Anglais. La partie consacrée aux résultats est constituée d'un ensemble de résultats non publiés, d'une ébauche d'article, et de deux articles publiés. Les discussions spécifiques des différents champs de cette étude sont intégrées à chaque section de résultats ; la dernière section (section 4) fournit l'occasion d'une discussion plus générale. À la fin du manuscrit sont annexés deux chapitres de livre, quatre articles et une communication, en lien avec cette étude et auxquels nous avons contribué, sur lesquels s'appuie notamment la discussion de cette thèse.

INTRODUCTION	19
1. HETEROGENEITE CLINIQUE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE	21
1.1. Autisme et TSA	21
1.1.1. La triade autistique	21
1.1.2. Le spectre autistique	22
1.2. Diagnostic et instruments d'évaluation	24
1.2.1. Diagnostic catégoriel	24
1.2.2. Approche dimensionnelle	24
1.2.3. Aux frontières de la pathologie	25
1.3. Epidémiologie	25
1.4. Comorbidités et signes associés	26
1.5. Prise en charge	30
2. COMPLEXITE ETIOLOGIQUE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE	33
2.1. Hypothèses étiologiques	33
2.1.1. Héritabilité des TSA et étiologies génétiques	33
2.1.2. Facteurs environnementaux	34
2.1.3. Facteurs épigénétiques	35
2.2. Diversité des facteurs génétiques impliqués dans les TSA.	36
2.2.1. Remaniements chromosomiques et CNV	37
2.2.2. Mutations ponctuelles	39
2.2.3. Polymorphismes fréquents	41
2.3. « Une constellation de maladies génétiques rares »	43
2.3.1. Hétérogénéité génétique des TSA et variabilité du génome humain	43
2.3.2. Architecture génétique des TSA	44
2.3.3. Bénin ou délétère : signification des variants génétiques	47
2.3.4. Génétique et nosographie psychiatrique	51
2.4. Processus neurobiologiques impliqués dans les TSA.	55
2.4.1. La piste des gènes synaptiques	55
2.4.2. Apports des modèles animaux	59
2.4.3. Neurobiologie humaine des TSA	62
2.5. Décomposer la complexité : la stratégie des endophénotypes	66
2.5.1. Symptômes candidats, endophénotypes, biomarqueurs	67
2.5.2. Biomarqueurs et endophénotypes biologiques associés aux TSA	68

3. LES ANOMALIES DE LA VOIE SEROTONINE - MELATONINE, ENDOPHENOTYPES DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE	77
<i>Chapitre de livre : Alterations of the serotonin-melatonin pathway in autism spectrum disorders : biological evidence and clinical consequences (C. Pagan, R. Delorme, JM. Launay, T. Bourgeron). In : <u>The Autisms. Molecules to model systems.</u> C.M. Powell & L.M. Monteggia, Oxford Press. (sous presse)</i>	79
3.1. Biochemistry of the tryptophan-serotonin-melatonin pathway	81
3.1.1. Tryptophan metabolism	81
3.1.2. From tryptophan to serotonin	81
3.1.3. Catabolism of serotonin	83
3.1.4. From serotonin to melatonin	83
3.1.5. Catabolism of melatonin	83
3.2. Altered serotonin levels in autism spectrum disorders	84
3.2.1. The hyperserotonemia of autism	84
3.2.2. Altered central serotonin levels in autism spectrum disorders ?	85
3.2.3. Hyperserotonemia : cause or consequence ?	86
3.2.4. Explorations of serotonin metabolism	87
3.2.5. Genetics of serotonin-related genes	87
3.3. Low melatonin levels in autism spectrum disorders	89
3.3.1. Evidence for melatonin deficit in autism spectrum disorders	89
3.3.2. Melatonin deficit : cause or consequence ?	91
3.3.3. Genetics of the melatonin pathway	91
3.3.4. Are hyperserotonemia and low melatonin related ?	92
3.4. Possible consequences of abnormal serotonin-melatonin pathway	92
3.4.1. Brain development	92
3.4.2. Sleep	94
3.4.3. Cognition and behavior	96
3.4.4. Antioxidative defense	97
3.4.5. Epilepsy	97
3.4.6. Gastro-intestinal function	97
3.4.7. Immune response	98
3.5. Therapeutic implications	98
3.5.1. Serotonergic therapies	98
3.5.2. Melatonin therapy	99
3.6. References	102
<u>OBJECTIFS</u>	<u>113</u>
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	<u>117</u>
1. EXPLORATION BIOCHIMIQUE DU METABOLISME DE LA SEROTONINE ET DES CATECHOLAMINES CHEZ LES PATIENTS AVEC TSA	119
1.1. Méthodes	120
1.1.1. Patients, prélèvements sanguins, tissus post mortem	120
1.1.2. Dosages biochimiques.	120
1.2. Hypersérotoninémie chez les patients avec TSA	121
1.3. Synthèse de la sérotonine	122
1.3.1. Métabolisme du tryptophane	122
1.3.2. Synthèse intestinale de la sérotonine	123
1.4. Catabolismes de la sérotonine et de la noradrénaline	123

1.4.1. Catabolismes MAO-dépendants	123
1.4.2. Catabolisme COMT-dépendant	126
1.4.3. Sulfoconjugaison	126
1.5 Discussion : anomalies du catabolisme de la sérotonine et des monoamines dans les TSA	127
2. EXPLORATION DES MECANISMES BIOCHIMIQUES ET GENETIQUES ET DES CONSEQUENCES DU DEFICIT EN MELATONINE OBSERVE DANS LES TSA	131
<i>Article : Characterization, mechanisms and consequences of the alterations of melatonin synthesis in Autism Spectrum Disorders (en préparation)</i>	133
2.1. Materials and methods	134
2.1.1. Ethics statement	134
2.1.2. Subjects and clinical evaluations	134
2.1.3. Blood samples and biochemical measurements in whole blood, plasma and platelets	135
2.1.4. Saliva samples and biochemical measurements	135
2.1.5. Sequencing of AANAT and ASMT	136
2.1.6. Mapping and genotyping of ASMT CNV	137
2.1.7. Lymphoblastoid cell lines cultures, RNA extraction and quantitative PCR	138
2.1.8. Autoptic tissue samples	139
2.1.10. Statistical analyses	141
2.2. Biochemical characterization of the serotonin-melatonin pathway in patients with ASD	141
2.2.1. The serotonin-melatonin pathway in the blood of patients with ASD and their relatives	141
2.2.2. The serotonin-melatonin pathway in autoptic ileum samples and pineal glands from patients with ASD	145
2.2.3. Exploration of the nyctohemeral cycles of melatonin and cortisol of patients with ASD and their relatives.	149
2.3. Exploration of the mechanisms of melatonin deficit observed in ASD	151
2.3.1. Genetic study of melatonin synthesis enzymes	151
2.3.2. Study of AANAT and ASMT gene expression	154
2.4. Clinical correlates of melatonin deficit	156
2.4.1. Diagnosis and autistic symptoms	156
2.4.2. Comorbidities and associated features	157
2.5. Acknowledgements	158
2.6. Figures	159
2.7. Tables	175
2.8. Discussion : Caractérisation biochimique de la voie sérotonine-mélatonine chez les patients avec TSA	188
2.8.1. Anomalies de synthèse de la mélatonine	188
2.8.2. Anomalies de la N-acétylsérotonine	190
2.8.3. Sérotonine/mélatonine : voie commune, anomalies indépendantes ?	191
2.8.4. Les anomalies de voie sérotonine-mélatonine, facteurs de vulnérabilité aux TSA	192
2.8.5. Corrélats cliniques	193

3. ETUDES MOLECULAIRES DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DE LA MELATONINE DANS D'AUTRES PATHOLOGIES NEURO-DEVELOPPEMENTALES, IMPACT FONCTIONNEL DES MUTATIONS RARES.	197
3.1. Mutations rares dans le gène <i>ASMT</i> associées au retard mental	198
<i>Article</i> : Mutation screening of <i>ASMT</i> , the last enzyme of the melatonin pathway, in a large sample of patients with Intellectual Disability. (C. Pagan, H. Goubran-Botros, K. Poirier, A. Dumaine, S. Jamain, S. Moreno, A. de Brouwer, H. Van Esch, R. Delorme, JM. Launay, A. Tzschach, V. Kalscheuer, D. Lacombe, S. Briault, F. Laumonier, M. Raynaud, B.W van Bon, M.H Willemsen, M. Leboyer, J. Chelly, T. Bourgeron). <u><i>BMC Medical Genetics</i></u> . 2011. 12:17.	199
3.1.1. Methods	200
3.1.2. Non-synonymous variants in the <i>ASMT</i> gene	200
3.1.3 Impact of non-synonymous genetic variations on <i>ASMT</i> enzyme activity	202
3.1.4. Discussion	202
3.1.5. References	203
3.2. Mutations rares dans les gènes <i>AANAT</i> et <i>ASMT</i> associées aux troubles du sommeil chez des enfants présentant un trouble neurodéveloppemental.	205
3.2.1. Méthodes	205
3.2.2. Identification de variants rares dans les gènes <i>AANAT</i> et <i>ASMT</i>	206
3.2.3. Corrélats thérapeutiques des variants rares	207
3.3. Structure de l'enzyme <i>ASMT</i> et impact fonctionnel des mutations rares identifiées.	208
<i>Article</i> : Crystal structure and functional mapping of human <i>ASMT</i> , the last enzyme of the melatonin synthesis pathway. (H. Goubran Botros, P. Legrand, C. Pagan, V. Bondet, P. Weber, M. Ben Abdallah, N. Lemièrre, G. Huguet, J. Bellalou, E. Maronde, P. Beguin, A. Haouz, W. Shepard, T. Bourgeron.) <u><i>Journal of Pineal Research</i></u> . 2012 (in press)	209
3.3.1. Material and methods	210
3.3.2. Results	212
3.3.3. Discussion	216
3.3.4. References	219
3.4. Une possible modulation épigénétique de l'expression des mutations <i>ASMT</i> ?	221
3.4.1. Méthodes	221
3.4.2. Mise en évidence du phénomène d'exclusion allélique par le SNP synonyme rs4933063.	222
3.4.3. Conséquence du phénomène d'exclusion allélique sur l'expression des mutations perte-de-fonction du gène <i>ASMT</i>	224
3.5. Discussion : Mécanismes moléculaires des anomalies de synthèse de la mélatonine dans les TSA	227
3.5.1. Génétique du déficit de synthèse de la mélatonine	227
3.5.2. Régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de la synthèse de la mélatonine	230
3.6. Discussion : Spécificité nosographique des altérations de la mélatonine	234

4. ELEMENTS DE DISCUSSION COMPLEMENTAIRES : MECANISMES ET CAUSALITE DES ANOMALIES DE LA VOIE SEROTONINE-MELATONINE	239
4.1. Étude familiale et longitudinale des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine au niveau sanguin.	239
4.1.1. Héritabilité	239
4.1.2. Ségrégation	241
4.1.3. Stabilité longitudinale	243
4.2. Discussion : notion d'endophénotype. Anomalies causales vs secondaires.	245
4.3. Altérations biochimiques additionnelles dans les glandes pinéales de patients avec TSA	249
4.3.1. Anomalie d'une protéine de signalisation intracellulaire, la protéine 14-3-3	249
4.3.2. Anomalie d'une enzyme de remodelage de la matrice extracellulaire, l'héparane sulfate sulfotransférase	250
4.4. Discussion : une perturbation globale de la physiologie de la glande pinéale ? Relations avec des altérations neurobiologiques.	252
4.5. Discussion : des atteintes multiples du métabolisme ? Relations avec les autres endophénotypes biochimiques des TSA.	254
4.6. Discussion : Modèles d'interactions entre les altérations de la voie sérotonine-mélatonine et les altérations neurobiologiques des TSA.	256
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	259
REFERENCES	263
ANNEXES	283
Annexe 1. <i>Chapitre de livre</i> : Structure et métabolisme (P. Manivet, J. Pratuangdejkul, C. Pagan, C. Hercend, JM. Launay). In : <u>Sérotonine. Aspects biologiques et cliniques</u> . O. Spreux-Varoquaux, Lavoisier, 2012.	287
Annexe 2. <i>Chapitre de livre</i> : Sérotonine et plaquettes sanguines (C. Hercend, C. Pagan, JM. Launay). In : <u>Sérotonine. Aspects biologiques et cliniques</u> . O. Spreux-Varoquaux, Lavoisier, 2012.	301
Annexe 3. <i>Article</i> : Genetic variations of the melatonin pathway in patients with attention-deficit and hyperactivity disorders. (P. Chaste, N. Clement, H. Goubran-Botros, JL. Guillaume, M. Konyukh, C. Pagan, I. Scheid, G. Nygren, H. Anckarsäter, M. Rastam, O. Ståhlberg, IC. Gillberg, J. Melke, R. Delorme, C. Leblond, R. Toro, G. Huguet, F. Fauchereau, C. Durand, L. Boudarene, E. Serrano, N. Lemièrre, JM. Launay, M. Leboyer, R. Jockers, C. Gillberg, T. Bourgeron). <u>Journal of Pineal Research</u> . 2011. 51(4):394-9.	317
Annexe 4. <i>Article</i> : Genetic and functional abnormalities of the melatonin biosynthesis pathway in patients with bipolar disorder (B. Etain, A. Dumaine, F. Bellivier, C. Pagan, L. Francelle, H. Goubran-Botros, S. Moreno, J. Deshommes, K. Moustafa, K. Le Dudal, F. Mathieu, C. Henry, JP. Kahn, JM. Launay, TW. Mühleisen, S.	

- Cichon, T. Bourgeron, M. Leboyer, S. Jamain). Human Molecular Genetics. 2012. (sous presse). 323
- Annexe 5. *Article* : Dynamics in enzymatic protein complexes offer a novel principle for the regulation of melatonin synthesis in the human pineal gland (E. Maronde, A. Saade, K. Ackermann, H. Goubran-Botros, C. Pagan, R. Bux, T. Bourgeron, F. Dehghani, JH. Stehle). Journal of Pineal Research. 2011. 51(1):145-55. 331
- Annexe 6. *Article* : Identification of pathway-biased and deleterious melatonin receptor mutants in autism spectrum disorders and in the general population. P. Chaste, N. Clement, O. Mercati, JL. Guillaume, R. Delorme, H. Goubran-Botros, C. Pagan, S. Périvier, I. Scheid, G. Nygren, H. Anckarsäter, M. Rastam, O. Ståhlberg, C. Gillberg, E. Serrano, N. Lemièrè, JM. Launay, MC. Mouren-Simeoni, M. Leboyer, C. Gillberg, R. Jockers, T. Bourgeron. PLoS One. 2010. 15;5(7). 343
- Annexe 7. *Communication* : Exploration of biological circadian rhythms in a patient with autism and a loss-of-function mutation of melatonin receptor type I (C. Pagan, P. Chaste, R. Delorme, X. Drouot, D. Chevenne, JM. Launay, T. Bourgeron). 2012 ECNP Workshop on Neuropsychopharmacology for Young Scientists in Europe. European Neuropsychopharmacology. 2012. 22(S1):S59. 355

INDEX DES TABLES ET FIGURES

INTRODUCTION

Tableau I-1 : Critères diagnostiques de l'autisme selon le DSM-IV-TR	22
Figure I-1 : Modèles classiques selon la fréquence et l'impact phénotypique des variants génétiques	37
Figure I-2 : <i>Two-hit model</i>	46
Figure I-3 : a- Exemple d'algorithme utilisé dans le diagnostic du retard mental pour déterminer la signification clinique des CNV identifiés b- Algorithme proposé pour la prise en charge des situations à deux atteintes génétiques	52
Figure I-4 : a- Exemple de réseau fonctionnel de gènes associés aux TSA b- Schéma simplifié des gènes associés aux TSA et impliqués dans le fonctionnement des synapses et dans la morphogenèse des épines dendritiques	57
Tableau I-2 : Principaux phénotypes de modèles génétiques murins de TSA	60
Tableau I-3 : Résumé des principaux éléments de neuroanatomie des TSA	63
Figure I-5 : a- Décomposer le phénotype : modèle simplifié des relations gènes-endophénotypes-pathologie b- Différentes modalités possibles d'interactions gènes-endophénotype-pathologie	69

Chapitre de livre : Alterations of the serotonin-melatonin pathway in autism spectrum disorders : biological evidence and clinical consequences

Figure 15.1 : Overview of the tryptophan-serotonin-melatonin pathway	80
Figure 15.2 : Main sources, targets, and physiological actions of serotonin and melatonin relevant for symptoms and comorbidities of ASD	82
Figure 15.3 : Physiological age-dependent variations of serotonin, melatonin, sleep duration, head circumference and synapse density in typically developing children.	85

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Exploration biochimique du métabolisme de la sérotonine et des catécholamines chez les patients avec TSA

Figure 1.1 : Paramètres du métabolisme de la sérotonine et des catécholamines explorés dans cette étude	119
Tableau 1.1 : Récapitulatif des paramètres investigués et des effectifs	120
Figure 1.2 : Dosage de la sérotonine sanguine	121
Figure 1.3 : Etude du métabolisme du tryptophane	122
Figure 1.4 : Etude du métabolisme de la sérotonine dans des échantillons post mortem d'iléons	124
Figure 1.5 : Etude du catabolisme de la sérotonine	125
Figure 1.6 : Etude du catabolisme de la noradrénaline	126

2. Exploration des mécanismes biochimiques et génétiques et des conséquences du déficit en mélatonine observé dans les TSA	
Article : Characterization, mechanisms and consequences of the alterations of melatonin synthesis in Autism Spectrum Disorders	
Figure 2.1 : Exploration of the serotonin-melatonin pathway in the blood	164
Figure 2.2 : Multivariate approach of blood biochemical data	165
Supplementary figure 2.1 : Detail of the two phases of inclusion	166
Supplementary figure 2.2 : Effect of age on biochemical parameters	167
Supplementary figure 2.3 : Frequency of the various biochemical profiles observed in patients with ASD	168
Figure 2.3 : Characterization of the serotonin-melatonin pathway in autaptic ileum samples	169
Supplementary figure 2.4 : Representative examples of chromogranin A immunostaining of ileum samples	170
Figure 2.4 : Characterization of the serotonin-melatonin pathway in autaptic pineal glands	171
Figure 2.5 : Exploration of the nyctohemeral cycle of melatonin and cortisol in saliva	172
Supplementary figure 2.5 : Mapping and genotyping a microduplication in <i>ASMT</i>	173
Figure 2.6 : Quantification of <i>AANAT</i> and <i>ASMT</i> mRNA in lymphoblastoid cell lines and pineal glands	174
Table 2.1. Comparison of the nyctohemeral cycle of salivary melatonin	178
Table 2.2. Mutation screening of <i>AANAT</i> and <i>ASMT</i>	179
Table 2.3. Clinical correlates of alterations of the serotonin-melatonin pathway : diagnosis and autistic symptoms	180
Table 2.4. Clinical correlates of alterations of the serotonin-melatonin pathway : comorbidities and associated features	181
Supplementary table 2.1 : Description of the populations investigated for blood biochemistry	182
Supplementary table 2.2 : Primers and PCR conditions used for this study	183
Supplementary table 2.3 : Characteristics of patients and control groups involved in the study of autaptic tissues	184
Supplementary table 2.4 : Missense, nonsense and splice-site variants in <i>AANAT</i> and <i>ASMT</i> referenced in the Exome Variant Server	185
Supplementary table 2.5 : Biochemical and clinical data for families carrying rare <i>AANAT</i> and <i>ASMT</i> variants	186
3. Etude moléculaire de la voie de synthèse de la mélatonine dans d'autres pathologies neurodéveloppementales, impact fonctionnel des mutations rares	
Article : Mutation screening of <i>ASMT</i>, the last enzyme of the melatonin pathway, in a large sample of patients with Intellectual Disability	
Table 1 : <i>ASMT</i> mutations identified in 361 patients with ID and 440 controls	201
Table 2 : Clinical observations and <i>ASMT</i> activity in B lymphoblastoid cell line of patients with ID and <i>ASMT</i> mutations	201
Figure 1 : <i>ASMT</i> activity in B lymphoblastoid cell lines of 31 unaffected controls and 7 patients with ID and <i>ASMT</i> mutation.	202

Tableau 3.1. Réponse au traitement par la mélatonine chez les patients porteurs d'un variant rare	207
Article : Crystal structure and functional mapping of human ASMT, the last enzyme of the melatonin synthesis pathway	
Figure 1 : the crystal structure of the human ASMT and the impact of genetic variants on ASMT activity	210
Table 1 : Crystallographic parameters and data statistics	211
Figure 2 : Biochemical characterization of the human ASMT protein	212
Figure 3 : Key residues of the active site of ASMT	213
Figure 4 : Changes in thermal parameters of human ASMT upon binding NAS suggest entry portals to binding sites	213
Figure 5 : Clustal alignment of the ASMT protein from different species	214
Figure 6 : Ribbon diagram of ASMT showing the three isoforms	216
Table 2 : <i>ASMT</i> variations identified during the 1000 genomes project and listed in dbSNP	217
Table 3 : Enzyme activity and prediction of the functional impact of the human <i>ASMT</i> variants identified in patients and in the general population	218
Figure 3.1 : Mise en évidence du phénomène d'exclusion allélique pour le gène <i>ASMT</i>	222
Tableau 3.2. Etude de la transmission de l'exclusion allélique dans 5 familles	224
Tableau 3.3. Etude de l'exclusion allélique du gène <i>ASMT</i> dans 7 familles porteuses de mutations codantes délétères	226
Tableau 3.4. Récapitulatif des fréquences des mutations dans les gènes <i>AANAT</i> et <i>ASMT</i> dans les différentes populations de patients avec troubles neurodéveloppementaux étudiées	228
4. Eléments de discussion complémentaires	
Tableau 4.1 : Héritabilité estimée par la méthode de corrélation parent moyen – descendant	240
Tableau 4.2 : Taux de concordance pour les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine observées pour les paires de germains atteints	242
Figure 4.1 : Stabilité longitudinale des paramètres biochimiques explorés	244
Tableau 4.3 : Concordance longitudinale des paramètres étudiés	245
Figure 4.1 : Dosage de la protéine 14-3-3 dans les échantillons de glandes pinéales	250
Figure 4.2 : Dosage de l'activité héparane sulfate sulfotransférase	251
Figure 4.2 : Modèles schématiques d'interactions entre les altérations de la voie sérotonine-mélatonine et les altérations neurobiologiques	257

ABBREVIATIONS UTILISEES

AADC	Aminoacide Décarboxylase
AANAT	Arylalkylamine N-acétyltransférase
<i>ADHD</i>	<i>Attention-deficit Hyperactivity disorder</i>
<i>ADI</i>	<i>Autism Diagnostic Interview</i>
<i>ADOS</i>	<i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i>
<i>ASD</i>	<i>Autism Spectrum Disorders</i>
ASMT	Acétylsérotonine Méthyltransferase
<i>BDNF</i>	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
<i>CNP</i>	<i>Copy Number Polymorphism</i>
<i>CNV</i>	<i>Copy Number Variation</i>
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
<i>DLMO</i>	<i>Dim Light Melatonin Onset</i>
<i>DSM</i>	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
5-HIAA	Acide 5-hydroxyindole acétique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
<i>ID</i>	<i>Intellectual Disability</i>
<i>IQ</i>	<i>Intellectual Quotient</i>
MAO	Monoamine Oxydase
NAS	N-acétylsérotonine
<i>PDD</i>	<i>Pervasive Developmental Disordered (-NOS : Not Otherwise Specified)</i>
PST	Phénol Sulfotransférase
QI	Quotient Intellectuel
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TDAH	Trouble de Déficit de l'Attention / Hyperactivité
TED	Trouble envahissant du développement (-NOS : Non Spécifié)
TPH	Tryptophane Hydroxylase
Trp	Tryptophane
TSA	Troubles du spectre autistique

INTRODUCTION

1. HETEROGENEITE CLINIQUE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

L'entité nosologique des Troubles du Spectre Autistique (TSA) recouvre une grande hétérogénéité de tableaux cliniques, tant par le gradient de sévérité des symptômes que par la diversité des comorbidités et des signes associés, et donc une grande variabilité en termes de niveau de handicap. Les connaissances sur les caractéristiques cliniques, le fonctionnement des sujets atteints et la physiopathologie progressent, et de nouveaux instruments d'évaluation sont développés. En parallèle, la définition même des troubles est toujours en évolution.

1.1. Autisme et TSA

1.1.1. La triade autistique

Leo Kanner propose en 1943, aux Etats-Unis, la première description clinique de « troubles autistiques du contact affectif », sur la base de 11 cas présentant « une incapacité innée à créer des contacts affectifs habituels, biologiquement déterminés, avec autrui », associée à un besoin d'immuabilité (*sameness*) (Kanner, 1943). Parallèlement, en 1944 en Autriche, Hans Asperger décrit, chez 4 enfants présentant des capacités intellectuelles normales et même des talents particuliers, une « psychopathie autistique » caractérisée par « un manque d'empathie, une faible capacité à se faire des amis, une conversation unidirectionnelle, une forte préoccupation vers des intérêts spéciaux, et des mouvements maladroits » (Asperger, 1944).

En 1981, Lorna Wing réactualise les travaux d'Asperger et formalise les trois traits cliniques qui deviennent la définition de l'autisme (Wing, 1981)(tableau I-1) :

- troubles des interactions sociales,
- troubles de la communication,
- comportements stéréotypés et intérêts restreints.

Ces troubles débutent dans la petite enfance, parfois après une phase de développement normal (notion de régression), et constituent une caractéristique envahissante du fonctionnement du sujet. L'autisme est souvent associé à un retard mental ; les patients présentant des capacités intellectuelles normales sont dits autistes de haut niveau. L'autisme est parfois associé à des pathologies générales avec anomalies chromosomiques, infections congénitales...

Tableau I-1 : Critères diagnostiques de l'autisme selon le DSM-IV-TR
 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition, text revised
 (American Psychiatric Association, 2000).

- A. Un total de six (ou plus) parmi les éléments décrits en (1), (2), et (3), dont au moins deux de (1) et un de (2) et un de (3) :
- 1) Altération qualitative des interactions sociales, comme en témoignent au moins deux des éléments suivants :**
 - a) Altération marquée dans l'utilisation pour réguler les interactions sociales, de comportements non verbaux multiples, tels que le contact oculaire, la mimique faciale, les postures corporelles, les gestes,
 - b) Incapacité à établir des relations avec les pairs correspondant au niveau du développement,
 - c) Le sujet ne cherche pas spontanément à partager ses plaisirs, ses intérêts ou ses réussites avec d'autres personnes (par exemple, il ne cherche pas à montrer, à désigner du doigt ou à apporter les objets qui l'intéressent),
 - d) Manque de réciprocité sociale ou émotionnelle ;
 - 2) Altération qualitative de la communication, comme en témoigne au moins un des éléments suivants :**
 - a) Retard ou absence totale de développement du langage parlé sans tentative de compensation par le geste ou la mimique,
 - b) Chez les sujets maîtrisant suffisamment le langage, incapacité marquée à engager ou à soutenir une conversation avec autrui,
 - c) Usage stéréotypé et répétitif du langage ou langage idiosyncrasique,
 - d) Absence de jeu de « faire semblant », varié et spontané, ou d'un jeu d'imitation sociale correspondant au niveau du développement ;
 - 3) Caractère restreint, répétitif et stéréotypé des comportements, des intérêts et des activités, comme en témoigne au moins un des éléments suivants :**
 - a) Préoccupation circonscrite à un ou plusieurs centres d'intérêt stéréotypés et restreints, anormale soit dans son intensité, soit dans son orientation,
 - b) Adhésion apparemment inflexible à des habitudes ou à des rituels spécifiques et non fonctionnels,
 - c) Maniérismes moteurs stéréotypés et répétitifs (par exemple, battements ou torsions des mains ou des doigts, ou mouvements complexes de tout le corps),
 - d) Préoccupation persistante 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 le diagnostic de syndrome de Rett ou de trouble désintégratif de l'enfance.

1.1.2. Le spectre autistique

Chaque symptôme de l'autisme n'est pas une catégorie binaire mais un continuum, de léger à sévère. Le tableau clinique de l'autisme varie donc considérablement en intensité : dans chaque domaine de fonctionnement atteint, on peut observer des difficultés plus ou moins prononcées. Ainsi, sur le plan social, le comportement peut aller du retrait social majeur à une simple maladresse sociale. Les troubles du langage

peuvent varier de l'absence totale de communication à un trouble isolé de la pragmatique du langage. Cette hétérogénéité clinique a conduit à introduire la notion de spectre autistique.

Dans la classification du DSM-IV, l'autisme est inclus dans les troubles envahissants du développement (TED), qui comprennent cinq catégories :

- le trouble autistique.
- le syndrome d'Asperger, qui se distingue de l'autisme par l'absence de retard de langage et de retard de développement cognitif.
- le syndrome de Rett, qui affecte les filles et dont l'étiologie génétique est connue. Ce syndrome rare est caractérisé par l'apparition de déficiences multiples sévères, motrices et cognitives, faisant suite à une période de développement normal pendant les premiers mois de vie.
- le trouble désintégratif de l'enfance, caractérisé par un développement normal au moins jusqu'à l'âge de 2 ans, suivi d'une perte des acquisitions dans plusieurs domaines du fonctionnement cognitif et psychomoteur.
- Le trouble envahissant du développement non spécifié (TED-NOS), qui inclut notamment l'autisme atypique (défini ainsi en raison de la symptomatologie et/ou de l'âge de survenue).

Cette classification est en cours de révision : dans le DSM-V, en cours d'élaboration, il est proposé que le syndrome de Rett soit exclu de cette catégorie et que les quatre autres syndromes soient regroupés dans la catégorie unique du trouble du spectre autistique. Les trois symptômes de la triade seraient réduits à deux : déficits de la communication sociale d'une part, et comportements répétitifs et intérêts restreints d'autre part, en spécifiant pour chacun une gamme de sévérité (American Psychiatric Association, 2012).

Dans les faits, la catégorie des troubles du spectre autistique (TSA), quelle qu'en soit la définition exacte, est déjà très largement utilisée en recherche, puisque la plupart des études à grande échelle portent sur les TSA et regroupent sous ce terme des patients atteints d'autisme, de syndrome d'Asperger, et de TED non spécifié, qui sont les trois catégories diagnostiques les plus fréquentes parmi les TED.

Le trouble du spectre autistique s'inscrit dans les troubles neurodéveloppementaux, qui incluent notamment les troubles du développement intellectuel, le trouble de déficit de

l'attention/hyperactivité (TDAH), ou encore certains troubles moteurs comme la maladie des tics chroniques.

1.2. Diagnostic et instruments d'évaluation

1.2.1. Diagnostic catégoriel

Le diagnostic des TSA est clinique, basé sur un entretien avec les parents et sur une observation clinique de l'enfant. Il existe des instruments de diagnostic standardisés, les plus utilisés actuellement sont :

- l'ADI-R (*Autism Diagnostic Interview-Revised*) (Lord et al., 1994), entretien semi-structuré avec les parents contenant une centaine de questions.
- l'ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*) (Lord et al., 2000), séquence semi-structurée interactive de jeux et d'entretiens avec l'enfant, adaptée au niveau de langage et de développement.

La distinction entre les différents sous-types catégoriels de TSA (autisme, syndrome d'Asperger, TED-NOS) n'est pas standardisée, et une récente étude multicentrique montre que les critères de classification varient significativement d'un centre à un autre (Lord et al., 2012).

Le bilan diagnostique doit également comprendre la recherche de pathologies associées, par un examen visuel et auditif, une consultation neuropédiatrique et une consultation génétique, qui peuvent donner lieu à des examens complémentaires (caryotype, recherche de remaniements génomiques par puce à ADN, recherche d'X-fragile, bilan métabolique, EEG, IRM...) (Haute Autorité de Santé, 2010).

1.2.2. Approche dimensionnelle

Alors que l'ADI et l'ADOS sont des instruments catégoriels, permettant de conclure à la présence ou non d'un autisme, différents instruments dimensionnels ont été développés afin d'évaluer de façon quantitative les symptômes autistiques dans chaque domaine. Ces outils permettent une meilleure approche de la diversité du spectre autistique. On peut citer la *Social Responsiveness Scale* pour la réciprocité sociale (Constantino et al., 2000), la *Children Communication Checklist* pour la communication (Bishop, 1998), ou encore la *Repetitive Behavior Scale-Revised* pour les comportements répétitifs (Lam et Aman, 2007).

1.2.3. Aux frontières de la pathologie

Dans la perspective de la notion de spectre autistique, les TSA peuvent être considérés comme l'extrémité pathologique du continuum d'habiletés de la communication sociale observé dans la population générale. Des outils ont donc été développés pour permettre une évaluation quantitative des traits autistiques à la fois chez les sujets atteints et dans la population générale, comme l'*Autism Spectrum Screening Questionnaire* (ASSQ) (Ehlers et al., 1999) ou l'*Autism Spectrum Quotient* (Baron-Cohen et al., 2001).

Le score *Autism Spectrum Quotient* est basé sur un auto-questionnaire et s'applique aux sujets présentant des capacités intellectuelles normales. Il présente une distribution gaussienne dans la population générale. Pour la validation de ce score, Baron-Cohen et al. ont évalué des sujets n'ayant pas de diagnostic de TSA mais présentant un score similaire à ceux obtenus par les patients avec autisme de haut niveau ou syndrome d'Asperger. La majorité de ces sujets remplissaient les critères du DSM-IV pour le trouble autistique, mais, soulignent les auteurs, « ne justifiaient pas de diagnostic car ils ne subissaient pas de souffrance significative ». Ces cas soulignent que la frontière entre le typique et le pathologique, en particulier en l'absence de retard mental, est parfois floue.

Par ailleurs, l'évaluation des traits autistiques chez les apparentés de patients avec TSA – par exemple avec ce même *Autism Spectrum Quotient* (Wheelwright et al., 2010), permet de mettre en évidence des scores plus élevés en moyenne que dans la population générale. Ces traits de personnalité qualitativement similaires à ceux des patients, mais d'intensité moindre, infraclinique, définissent le « phénotype élargi » (*broader autism phenotype*) (Bailey et al., 1998).

1.3. Epidémiologie

La prévalence actuelle des TSA est estimée à 6 à 7 pour 1000, soit un enfant sur 150 (Fombonne, 2009). Le diagnostic retenu le plus fréquemment est celui de TED-NOS, suivi de l'autisme (1/3 des cas environ) et du syndrome d'Asperger (10% des cas).

Les revues font état d'une augmentation dans le temps de la prévalence des TSA, qui s'explique, au moins en partie, par :

- l'élargissement des critères diagnostiques avec le concept de spectre autistique,
- l'amélioration du dépistage de ces troubles, liée à une meilleure reconnaissance par les professionnels et par le grand public,

- l'avancement de l'âge parental à la naissance des enfants, facteur de risque avéré de TSA (Kolevzon et al., 2007),
- l'évolution de la méthodologie des études épidémiologiques, dont les plus récentes incluent un dépistage systématique en milieu scolaire normal pour s'affranchir du biais de sous-diagnostic, souvent considérable (1/3 à 3/4 des cas selon le type de TSA, par exemple, pour l'étude de Baird et al. (2006) au Royaume-Uni).

Toutefois, une augmentation de l'incidence des TSA en lien avec des facteurs environnementaux n'a pu être ni validée ni exclue.

L'autisme est plus fréquent chez les garçons que chez les filles, avec un sex-ratio moyen de 4 garçons pour 1 fille. Les mécanismes de ce déséquilibre ne sont pas connus, les hypothèses incluent l'implication de facteurs hormonaux et/ou de facteurs génétiques liés aux chromosomes sexuels. Le sex-ratio est moins élevé dans les TSA associés à un retard mental (2:1), et plus élevé dans les TSA sans retard mental (6:1) (Fombonne, 2003).

1.4. Comorbidités et signes associés

Les pathologies et troubles associés aux TSA, bien qu'ils ne fassent pas partie de leur définition, jouent souvent un rôle majeur dans le handicap qui en résulte – parfois plus que les symptômes autistiques eux-mêmes. Les différentes comorbidités pourraient être révélatrices de différents mécanismes physiopathologiques.

1.4.1. Retard mental

Les TSA sont fréquemment associés à un retard mental. La prévalence varie de manière importante selon les études et selon le diagnostic considéré. Par définition, il n'y a pas de retard mental dans le syndrome d'Asperger. La prévalence du retard mental dans l'autisme serait de l'ordre de 70% (Chakrabarti and Fombonne, 2005, Fombonne, 2003).

Il existe de nombreux outils pour évaluer le fonctionnement intellectuel : les échelles standardisées de mesure du quotient intellectuel (QI) (WISC-IV, WPPSI-III... qui distinguent classiquement le QI Verbal et le QI Performance), les matrices progressives de Raven (test de logique permettant d'évaluer l'intelligence indépendamment des

capacités verbales) , ou encore le profil psycho-éducatif (*psychoeducative profile* PEP-R), plus spécifique des TSA.

Le DSM-IV classe les retards mentaux en 4 catégories selon leur degré de sévérité : retard mental léger ($50 < \text{QI} < 70$), modéré ($35 < \text{QI} < 50$), sévère ($20 < \text{QI} < 35$), profond ($\text{QI} < 20$). Toutefois cette classification est parfois difficile à appliquer aux patients avec TSA, caractérisés par des capacités cognitives hétérogènes. Alors que les capacités verbales sont souvent atteintes, de bonnes performances peuvent être observées dans les capacités non verbales, et même, dans certains cas, des talents remarquables, comme pour la musique, le dessin ou le calcul. Comme pour les symptômes comportementaux, il existe un continuum de sévérité du handicap mental, les différentes aires de fonctionnement pouvant être atteintes à différents degrés.

1.4.2. Dysmorphies

Les signes dysmorphiques sont classiquement considérés comme des signes d'appel pouvant orienter le diagnostic vers un syndrome génétique.

Une étude de Miles et al. (2005) portant sur 260 patients a estimé à 16% la proportion de patients avec TSA présentant un morphophénotype dysmorphique (défini par la présence de plus de 6 traits physiques dysmorphiques). Les dysmorphies étaient associées à un QI plus faible et à une plus grande prévalence d'épilepsie.

1.4.3. Anomalies du périmètre crânien

Une augmentation du périmètre crânien chez les patients autistes, associée à une augmentation du volume cérébral, a été rapportée dans de nombreuses études, malgré des résultats parfois discordants. La méta-analyse de Redcay et Courchesne (2005), qui regroupe 531 patients, suggère que ce trait est étroitement lié à l'âge considéré : le périmètre crânien est typiquement normal ou légèrement diminué à la naissance, puis une forte accélération de la croissance est observée pendant la première année de vie pour aboutir à un périmètre crânien supérieur à la normale. Cette phase d'accélération semble suivie d'un arrêt de la croissance, le volume cérébral rejoignant progressivement les valeurs normales à l'adolescence et à l'âge adulte. Plus qu'une macrocrânie constante, c'est donc la cinétique de croissance du périmètre crânien qui serait anormale. Les valeurs de périmètre crânien les plus anormales sont observées dans la petite enfance, entre 2 et 5 ans.

Une étude d'IRM de Courchesne et al. (2001) portant sur 30 garçons avec autisme entre 2 et 4 ans rapporte un volume cérébral supérieur à la moyenne dans 90% des cas, et une macrocéphalie (volume cérébral $>+2DS$) chez 37% des patients. Cette augmentation du volume cérébral chez les jeunes enfants était associée, au niveau cérébral, à une augmentation de la matière blanche et de la matière grise corticale, et au niveau du cervelet, à une augmentation de la matière blanche et à une diminution de la matière grise. Toutefois, les corrélats neurobiologiques de l'augmentation du volume cérébral (augmentation du nombre et/ou de la taille des cellules) sont encore largement débattus.

À l'inverse, une microcéphalie (périmètre crânien $\leq 2^{\text{ème}}$ centile) est observée chez une minorité (5 à 15%) de patients avec TSA. Comme les dysmorphies, la microcéphalie est fortement corrélée à la présence d'une pathologie associée.

1.4.4. Épilepsie

La prévalence de l'épilepsie dans les TSA est estimée à 20-25% (Canitano, 2007). L'épilepsie est plus fréquente chez les filles, et en cas de retard mental associé (Amiet et al., 2008).

1.4.5. Comorbidités psychiatriques

Les troubles psychiatriques associés sont fréquents chez les patients avec TSA, même si les prévalences observées pour les différents troubles varient selon les études. Les comorbidités les plus fréquentes sont les troubles anxieux, le trouble de déficit de l'attention – hyperactivité (TDAH), et les troubles de l'humeur.

Ainsi, une étude de Leyfer et al. (2006) portant sur 109 enfants avec autisme rapporte une fréquence élevée de TDAH (55%), de phobie spécifique (44%), de trouble obsessionnel compulsif (TOC) (43%), de dépression (25%). Selon une étude similaire de Simonoff et al. (2008) portant sur 112 enfants avec TSA, les comorbidités les plus fréquentes sont la phobie sociale (29%), le TDAH (28%) et le trouble oppositionnel (28%).

Les troubles du comportement de type agressivité et/ou auto-agressivité sont également fréquents (22% d'après Hartley et al., 2008).

1.4.6. Troubles moteurs

Les jeunes enfants atteints de TSA présentent fréquemment des troubles moteurs mineurs. Une étude de Ming et al. (2007) portant sur 154 enfants avec TSA rapporte

une hypotonie dans 51% des cas, et une apraxie motrice dans 34% des cas. Ces troubles sont moins fréquents chez les enfants plus âgés, ce qui suggère que la motricité tend à se normaliser spontanément.

1.4.7. Déficiences et particularités sensorielles

Une étude portant sur 199 enfants avec autisme a rapporté une déficience auditive chez 9,5% des patients, dont 3,5% de surdité (Rosenhall et al., 1999). Néanmoins, ce chiffre devrait être réexaminé avec la pratique systématique d'une audiométrie devant un retard d'acquisitions.

Une absence de réaction à la douleur est également décrite chez certains patients. À l'inverse, les hypersensibilités sensorielles semblent fréquentes chez les patients avec TSA, et peuvent concerner différentes modalités (hypersensibilité aux stimuli auditifs, visuels, tactiles, olfactifs, gustatifs) (Baron-Cohen et al., 2009).

1.4.8. Troubles du sommeil

Les troubles du sommeil constituent une des plaintes les plus fréquemment rapportées par les familles d'enfants avec TSA. Ce point sera développé dans un chapitre ultérieur (section 3 de cette introduction).

L'étude la plus récente concernant les troubles du sommeil dans les TSA est une étude de population longitudinale incluant 3700 enfants dont 28 avec TSA (Sivertsen et al., 2012). Cette étude met en évidence une association entre les troubles du sommeil et les traits autistiques (évalués par l'ASSQ), observée chez les patients mais aussi en population générale. La prévalence de l'insomnie chronique était 10 fois plus élevée chez les patients avec TSA que chez les témoins, et restait significativement associée aux TSA (malgré le petit nombre de cas) après correction pour les troubles du comportement et les problèmes émotionnels, qui peuvent être à l'origine des troubles du sommeil. Enfin, les troubles du sommeil persistaient dans le temps, avec un taux de rémission de 8% (vs 52% chez les témoins).

1.4.9. Troubles digestifs et alimentaires

Les troubles alimentaires sont fréquents, en particulier la sélectivité alimentaire (25% des patients avec TSA). La constipation est également fréquente (34% sur un échantillon de 121 cas) (Ibrahim et al., 2009).

En revanche, la suspicion d'une association entre TSA et maladie coeliaque, à l'origine du régime sans gluten et sans caséine parfois proposé aux patients, n'a pas été confirmée (voir la synthèse de consensus de la Haute Autorité de Santé, 2010).

1.5. Prise en charge

La grande hétérogénéité des présentations cliniques et des niveaux de handicap associés aux TSA s'accompagne nécessairement d'une grande variété de prises en charge. Le niveau intellectuel du patient est un élément déterminant dans le choix de la prise en charge – certains patients avec autisme de haut niveau ou syndrome d'Asperger sont capables de suivre une scolarité normale et d'acquérir un bon niveau d'autonomie, ce qui n'est bien sûr pas le cas des patients avec un retard mental sévère.

Les approches éducatives font l'objet d'un consensus international en tant qu'élément de base de la prise en charge des patients avec TSA. Bien que les données de la littérature soient encore limitées, les études d'évaluation montrent que ces interventions permettent d'améliorer les performances cognitives, le langage et les capacités adaptatives des patients (voir pour revue Warren et al., 2011). Ces approches, telles que la méthode ABA (*Applied Behaviour Analysis*) ou la méthode TEACCH, sont toutefois peu développées en France.

Les traitements médicamenteux sont actuellement utilisés à titre symptomatique dans les TSA, principalement pour la prise en charge des comorbidités, plutôt que des symptômes autistiques eux-mêmes. Il s'agit de médicaments psychotropes initialement développés pour d'autres indications que les TSA et souvent insuffisamment évalués dans ce contexte. Les plus fréquemment prescrits incluent des antipsychotiques (risperidone, aripiprazole), qui ont montré une efficacité sur les troubles du comportement, le méthylphénidate pour l'hyperactivité, et les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (fluoxétine, citalopram) pour les comportements stéréotypés et les symptômes obsessionnels (voir pour revue McPheeters et al., 2011). Enfin, la mélatonine semble efficace pour le traitement des troubles du sommeil - ce point sera développé dans une section ultérieure (section 3 de cette introduction).

Les progrès des connaissances sur la physiopathologie des TSA laissent espérer le développement de nouveaux médicaments plus spécifiques. En miroir de l'hétérogénéité clinique, les étiologies des TSA sont complexes – elles seront discutées dans le chapitre suivant. Les causes génétiques semblent prédominantes, mais les

obstacles méthodologiques à la thérapie génique, associés au phénomène d'hétérogénéité génétique qui caractérise les TSA, rendent peu probable la mise au point à court terme d'approches thérapeutiques ciblant directement les altérations génétiques. En revanche, les progrès des connaissances concernant la neurobiologie et les endophénotypes des TSA, associés au développement de modèles animaux, ont déjà débouché sur plusieurs stratégies thérapeutiques nouvelles actuellement évaluées chez l'homme. Ainsi, l'observation d'anomalies du système GABAergique a abouti à une étude-pilote prometteuse de traitement par le bumétanide, susceptible de restaurer l'homéostasie des synapses inhibitrices en diminuant les concentrations intracellulaires d'ions chlorure (Lemonnier et Ben-Ari, 2010). L'élucidation des voies de signalisation impliquant la protéine FMRP, déficiente dans le syndrome de l'X fragile, a permis de proposer un traitement par des antagonistes du récepteur mGluR5, comme le fenobam, qui fait l'objet d'essais cliniques dans ce syndrome (Berry-Kravis et al., 2009). Enfin, l'observation d'un déficit en oxytocine a conduit à tester l'effet d'une administration de cette hormone, qui semble améliorer le comportement social chez des patients autistes de haut niveau (Andari et al., 2010).

2. COMPLEXITE ETIOLOGIQUE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

2.1. Hypothèses étiologiques

2.1.1. Héritabilité des TSA et étiologies génétiques

2.1.1.1. Arguments épidémiologiques

Le premier faisceau d'arguments en faveur d'une étiologie génétique des TSA est d'ordre épidémiologique. Les premières études de jumeaux suggérant un déterminisme génétique de l'autisme ont été réalisées dans les années 1970. Ces études initiales, bien que portant sur de petits effectifs de paires de jumeaux (une vingtaine), mettaient en évidence un taux de concordance plus élevé chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes (Folstein et Rutter, 1977). Les études récentes portant sur de plus grands effectifs de paires de jumeaux ont produit des résultats partiellement divergents en termes de taux de concordance pour les TSA. Ainsi, l'étude de Rosenberg et al. (2009), portant sur 277 paires de jumeaux, montrait un taux de concordance de 89% chez les jumeaux monozygotes vs 31% chez les jumeaux dizygotes, confirmant la prépondérance de l'étiologie génétique, alors que l'étude de Hallmayer et al. (2011) rapporte des taux de concordance pour les TSA similaires chez les jumeaux dizygotes (31% pour les garçons et 36% pour les filles) mais plus faibles chez les jumeaux monozygotes (77% pour les garçons et 50% pour les filles) et propose un modèle d'héritabilité impliquant une part plus importante des facteurs environnementaux.

Parallèlement aux études de jumeaux, les études d'agrégation familiale ont mis en évidence un risque élevé de récurrence dans les fratries d'enfants atteints : la récente étude de Constantino et al. (2010) portant sur plus de 1000 familles comportant au moins un enfant atteint de TSA montrait un risque de 10,9% d'avoir un second enfant atteint (soit un risque 15 fois supérieur à la population générale en considérant une prévalence de 0,7%), et un risque de 20% d'avoir un enfant non autiste mais présentant un retard de langage.

Il est à noter que les études d'agrégation familiale ne permettent pas de prendre en compte toute l'hétérogénéité des mécanismes génétiques : en particulier, les événements *de novo*, génétiques mais par définition non hérités, peuvent être discordants même entre des jumeaux monozygotes (Bruder et al., 2008), et ne sont pas pris en compte dans les modèles d'héritabilité.

2.1.1.2. Arguments cliniques

Un deuxième faisceau d'arguments en faveur d'une étiologie génétique est l'association fréquente des TSA avec des syndromes génétiques connus. Il s'agit de syndromes rares, caractérisés sur le plan clinique et génétique. Les plus fréquemment associés aux TSA sont le syndrome de l'X fragile, la sclérose tubéreuse de Bourneville, la neurofibromatose de type I, le syndrome de Rett, le syndrome d'Angelman, le syndrome de Prader-Willi et le syndrome de Cowden. L'association de ces syndromes avec un TSA n'est pas systématique (estimée à 40% des cas pour le syndrome de l'X-fragile par exemple). On estime à 10-15% des cas la proportion de TSA dits « syndromiques » (Moss and Howlin, 2009). Plusieurs maladies métaboliques congénitales peuvent également être associées à un phénotype autistique, parmi lesquelles la phénylcétonurie si elle n'est pas dépistée à la naissance, les anomalies du métabolisme de la créatine, les déficits du métabolisme cérébral des folates, et le syndrome de Smith-Lemli-Opitz, qui résulte d'un défaut de synthèse du cholestérol.

2.1.1.3. Arguments moléculaires

Le troisième faisceau d'arguments en faveur d'une étiologie génétique des TSA réside dans l'identification d'un nombre croissant de gènes impliqués dans les TSA, par des approches moléculaires. Ces anomalies génétiques seront détaillées plus loin (section 2.2).

2.1.2. Facteurs environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux ont été proposés comme facteurs de risque d'autisme ; peu d'entre eux ont été validés de manière concluante. Les facteurs de risque documentés à ce jour sont :

- les notions de souffrances néonatales : hypoxie, traumatisme, ictère, anémie, complications obstétricales, incompatibilité rhésus foeto-maternelle, ainsi que les naissances multiples et le faible poids par rapport à l'âge gestationnel – même si les études sont parfois discordantes sur l'impact individuel de chacun de ces facteurs (voir pour revue Gardener et al., 2011).
- parmi les expositions toxiques : l'exposition prénatale au thalidomide et au valproate, auxquels peuvent s'ajouter les antidépresseurs, mis en cause dans une récente étude non encore répliquée (Croen et al., 2011).

- parmi les expositions infectieuses : les infections virales prénatales ou périnatales par le virus de la rubéole ou le cytomégalovirus.

L'hypothèse d'une association entre vaccination et autisme a fait l'objet de vives polémiques. Une étude publiée en 1998 dans la revue Lancet par Wakefield et al. (1998) suggérait un lien entre le vaccin rougeole-oreillons-rubéole et le diagnostic d'autisme sur la base de 12 cas. Plusieurs études épidémiologiques ont démenti cette association (Taylor et al., 1999), mais la polémique a été amplement médiatisée. L'article de Wakefield a été rétracté pour fraude par la revue Lancet (Editors of the Lancet, 2010). Depuis la publication de cet article, les liens entre autisme et vaccination ont été étudiés de manière intensive et aucune étude n'a montré d'association.

Enfin, il est désormais admis que les caractéristiques psychologiques des parents ne sont pas un facteur de risque de TSA (voir synthèse de consensus de la Haute Autorité de Santé, 2010) – même si cette théorie erronée a parfois encore cours.

2.1.3. Facteurs épigénétiques

Si les anomalies génétiques associées aux TSA ont fait et font l'objet d'explorations extensives, les anomalies épigénétiques ont été moins étudiées – notamment car la spécificité tissulaire (voire cellulaire) et temporelle de ces régulations ne permet pas une investigation pertinente à partir de prélèvements périphériques. Shulha et al. (2012) ont recherché des signatures épigénétiques en étudiant la méthylation des histones dans les cerveaux post mortem de 16 patients avec TSA, comparés à 16 témoins : l'étude n'a pas mis en évidence d'anomalies globales à l'échelle génomique, mais des anomalies ponctuelles, affectant certains gènes (dont des gènes connus pour être impliqués dans les troubles neurodéveloppementaux), chez certains patients. Cette étude suggère une hétérogénéité épigénétique dans les TSA – à l'image de l'hétérogénéité génétique – qui devra faire l'objet d'investigations complémentaires pour mieux caractériser ces anomalies et pour élucider les interactions entre facteurs génétiques, facteurs environnementaux et facteurs épigénétiques.

Par ailleurs, plusieurs syndromes génétiques associés aux TSA constituent des paradigmes d'interactions entre facteurs génétiques et facteurs épigénétiques. Il est probable que d'autres facteurs génétiques impliqués dans l'autisme, récemment découverts ou encore à découvrir, s'inscrivent dans l'un ou l'autre de ces paradigmes.

- Le syndrome de Rett est causé par une mutation d'un gène impliqué dans les régulations épigénétiques : *MECP2* code pour une protéine qui lie l'ADN méthylé et régule la transcription des gènes.
- Le syndrome de l'X-fragile implique une anomalie génétique (expansion de triplets) dans une région non codante, qui provoque l'extinction épigénétique (par hyperméthylation) du gène adjacent (*FMRI*).
- Le syndrome de Prader-Willi/Angelman constitue un exemple documenté dans lequel l'expression d'une anomalie génétique (délétion 15q11-q13) est modulée par des facteurs épigénétiques. La région 15q11-q13 est soumise à empreinte parentale dans le cerveau : sous l'effet de modifications épigénétiques, certains gènes sont uniquement transcrits du chromosome paternel tandis que d'autres sont uniquement transcrits du chromosome maternel. En conséquence, la même délétion est associée à des manifestations cliniques différentes selon qu'elle est héritée du père (syndrome de Prader-Willi) ou de la mère (syndrome d'Angelman), car une délétion d'origine paternelle n'aura de conséquences que sur l'expression des gènes soumis à empreinte paternelle (*SNRP*, *necdin* et clusters de snoRNA), tandis qu'une délétion d'origine maternelle n'aura de conséquences que sur l'expression du gène *UBE3A* (qui code pour l'ubiquitine ligase E3A), soumis à empreinte maternelle.

2.2. Diversité des facteurs génétiques impliqués dans les TSA.

La génétique appliquée à la pathologie distingue schématiquement deux grands types de facteurs de risque selon leur fréquence et leur impact (figure I-1). D'une part, des événements génétiques rares, fortement délétères, associés à une pénétrance élevée – les CNV (*Copy Number Variants*, qui regroupent les délétions et duplications de plus de 1 kb) et les mutations rares s'inscrivent dans ce paradigme. D'autre part, des polymorphismes génétiques fréquents (*Copy Number Polymorphisms* CNP, *Single Nucleotide Polymorphisms* SNP, polymorphismes de séquences répétées...), qui ne sont pas pathogènes à eux seuls mais constituent des facteurs de risque – ils sont classiquement identifiés par des études d'association statistiques en comparant leur fréquence chez les cas et chez les témoins. Cette dichotomie est schématique : entre ces deux extrêmes, il est possible d'observer des événements associés à un ratio impact/fréquence intermédiaire, en particulier des événements rares à impact modéré ou

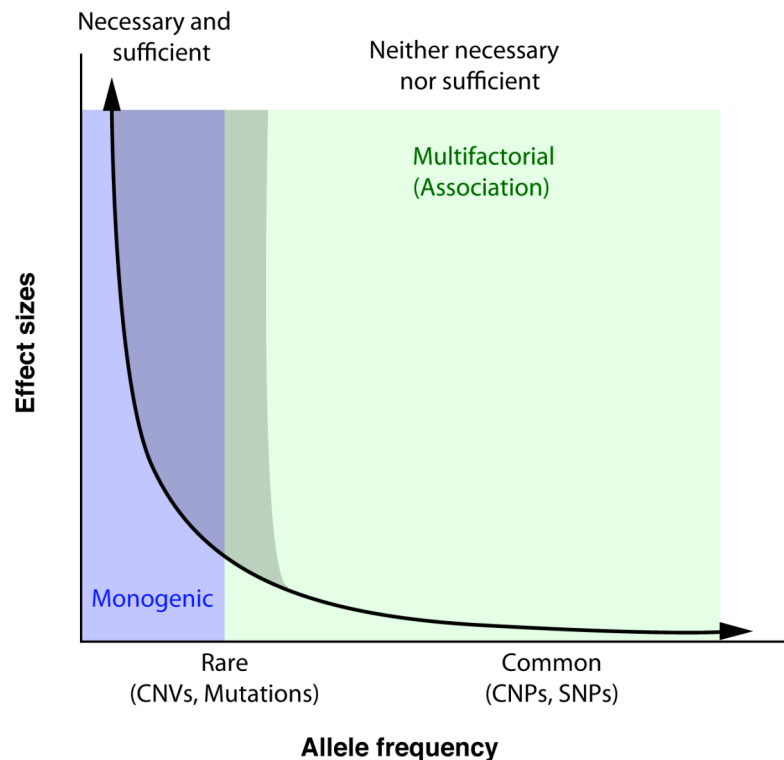


Figure I-1 : modèles classiques selon la fréquence et l'impact phénotypique des variants génétiques (d'après State et Levitt, 2011).

faible (illustrés par la zone grisée sur la figure I-1). Pour ces différents types de facteurs de risque, de nombreux exemples ont été associés aux TSA.

2.2.1. Remaniements chromosomiques et CNV

2.2.1.1. Méthodologies

Les anomalies cytogénétiques sont traditionnellement recherchées par la réalisation du caryotype, qui peut être complété par la technique de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Ces approches permettent la détection de remaniements de grande taille (5 Mb pour le caryotype, 1 Mb pour le FISH), qui impliquent généralement plusieurs gènes. La prévalence des anomalies cytogénétiques associées aux TSA est de l'ordre de 2 à 5% (Reddy, 2005).

Le développement récent des technologies de puces à ADN a permis d'améliorer considérablement la résolution de détection des remaniements et des variations du nombre de copies (*Copy Number Variations*, CNV). La technologie d'Hybridation Génomique Comparative, qui a connu ses débuts dans les années 1990, est basée sur l'hybridation simultanée et compétitive de l'ADN du patient et d'un ADN témoin, marqués par des fluorophores différents. Cette approche est dédiée à la détection des

CNV ; les puces les plus récentes ont une résolution de quelques kilobases. Les technologies de puces de génotypage de SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), développées dans les années 2000 par les sociétés Affymetrix et Illumina selon deux principes différents, sont également basées sur l'hybridation de l'ADN suivie par une détection de marquage fluorescent. Elles permettent de génotyper simultanément plusieurs centaines de milliers, voire plusieurs millions de polymorphismes. Leur application est double : d'une part, l'information sur le génotype de chaque SNP peut être utilisée en tant que telle, notamment pour des études d'association. D'autre part, l'analyse de l'intensité du signal d'hybridation ainsi que la recherche des régions de perte d'hétérozygotie permettent de détecter les CNV.

Pinto et collaborateurs ont réalisé une analyse globale des CNV chez près de 1000 patients avec TSA et rapportent une fréquence totale des CNV plus élevée chez les patients que dans la population générale (en moyenne 3,6 gènes affectés par un CNV par génome chez les témoins ; 1,2 fois plus chez les patients). Cet enrichissement concerne les délétions comme les duplications (avec un enrichissement plus fort pour les délétions), et de manière prédominante les CNV de grande taille (>500 kb) (Pinto et al., 2010).

La puissance des technologies sur puces à ADN est liée à leur caractère pangénomique : elles permettent de rechercher des CNV simultanément dans tout le génome, sans nécessiter d'hypothèse sur les gènes candidats. Une limite inhérente à cette caractéristique même est qu'elles génèrent de grandes quantités de données parfois difficiles à interpréter. Plus d'une quinzaine d'études de CNV dans les TSA ont été publiées depuis 2006, incluant chacune plusieurs centaines de patients. Ces études ont entraîné une explosion des nouveaux syndromes génomiques (plusieurs dizaines de syndromes récurrents), pour la plupart encore mal caractérisés sur le plan clinique et épidémiologique. Toutefois, la plupart des CNV identifiés sont très rares, voire uniques, ce qui rend l'interprétation délicate.

2.2.1.2. CNV associés aux TSA

Parmi les principaux CNV décrits de manière récurrente chez les patients avec TSA, on peut citer :

- la duplication 15q11-q13 d'origine maternelle, CNV le plus fréquemment décrit dans les TSA, avec une prévalence voisine de 1% (Veenstra-VanderWeele et

Cook, 2004). Une délétion de ce même locus est associée aux syndromes de Prader-Willi et d'Angelman. Des délétions et des duplications plus restreintes, touchant le locus 15q11 ou le locus 15q13, ont également été décrites chez des patients avec TSA.

- La délétion et la duplication 16p11.2, dont la prévalence dans les TSA est également proche de 1% (Weiss et al., 2008).
- La délétion 22q13, responsable du syndrome de Phelan-McDermid, et qui contient notamment le gène *SHANK3*.
- La délétion 22q11, responsable du syndrome de Di George, syndrome polymalformatif qui peut être associé à un TSA.
- La duplication 7q11.23 (Sanders et al., 2011) (une délétion de cette même région est responsable du syndrome de Williams-Beuren, également associé aux TSA).
- La duplication 17p11.2 (une délétion de cette même région est responsable du syndrome de Smith-Magenis, caractérisé par des troubles du comportement, des dysmorphies et une inversion du rythme de sécrétion de la mélatonine)

Parallèlement à ces CNV récurrents, de très nombreux CNV rares ont été décrits. S'ils sont difficiles à interpréter à l'échelle individuelle, ils permettent de proposer de nouveaux gènes candidats associés aux TSA sur la base de ces arguments génétiques et de la fonction des gènes affectés. On peut citer parmi ceux-ci *NRXN1* (qui code pour Neurexine 1, une protéine d'adhésion cellulaire exprimée au niveau pré-synaptique) (Szatmari et al., 2007), *CNTN4* (qui code pour Contactine 4, une protéine d'adhésion cellulaire associée aux axones) (Glessner et al., 2009), *CNTNAP2* (qui code pour Contactin-associated protein-like 2, une protéine de la famille des neurexines, exprimée au niveau axonal) (Szatmari et al., 2007), ou encore *SHANK2* (qui code pour une protéine d'échafaudage homologue de SHANK3) (Leblond et al., 2012).

2.2.2. Mutations ponctuelles

2.2.2.1. Approches gènes-candidats

L'identification des gènes candidats est classiquement basée sur des études de liaisons (mettant en évidence la transmission préférentielle d'un locus en association avec la pathologie) ou sur les études de CNV. Les premières mutations à pénétrance forte identifiées dans les TSA « non syndromiques » ont été celles des gènes *NLGN3* et

NLGN4X, situés sur le chromosome X, et codant pour les neuroligines, des protéines d'adhérence cellulaire exprimées au niveau post-synaptique et interagissant avec les neurexines. L'étude initiale de Jamain et al. (2003) rapporte une insertion d'un nucléotide induisant un décalage du cadre de lecture du gène *NLGN4X*, et une mutation faux-sens du gène *NLGN3*, chacune retrouvée chez un patient mâle et de transmission maternelle – soit un paradigme de transmission récessive liée à l'X. Plusieurs études ultérieures ont rapporté des mutations dans le gène *NLGN4X* suivant le même mode de transmission.

D'autres études ont depuis rapporté des mutations non synonymes dans des gènes candidats. Néanmoins des arguments forts en faveur d'un rôle étiologique prépondérant n'ont été apportés que pour peu d'entre elles. C'est le cas des mutations dans le gène *SHANK3*, situé dans la région 22q13 (dont les délétions sont connues pour être associées aux TSA), et qui code pour une protéine d'échafaudage exprimée au niveau post-synaptique. Une première étude (Durand et al., 2007) a mis en évidence une insertion d'un nucléotide induisant un décalage du cadre de lecture du gène et dont la transmission était caractérisée par un mosaïcisme germlinal maternel. Des études ultérieures ont rapporté des mutations *de novo* de ce même gène.

2.2.2.2. Exomes

Si la recherche de mutations a longtemps été limitée par la nécessité d'une approche gènes-candidats, les nouvelles technologies de séquençage à haut débit, permettant de séquencer plusieurs dizaines de gènes simultanément, et plus encore les technologies de séquençage de l'exome, qui permet d'analyser l'ensemble des régions codantes du génome, voire de séquençage génome entier, ont récemment permis de passer à l'échelle pangénomique pour la recherche de mutations rares.

Parmi les six premières études d'exomes publiées pour les TSA, cinq (totalisant 945 trios père-mère-enfant atteint) se sont focalisées sur l'analyse des variants *de novo* affectant la séquence codante des gènes pour limiter les problèmes d'interprétation de la signification des variants (O'Roak et al., 2011, Neale et al., 2012, O'Roak et al., 2012, Sanders et al., 2012, Iossifov et al., 2012). Plusieurs centaines de mutations remplissant ces critères pourtant restrictifs ont été identifiées, dont plus d'une centaine de mutations à effet fonctionnel majeur (variants faux-sens, d'épissage ou induisant un décalage du cadre de lecture). Ces mutations sont caractérisées par une grande hétérogénéité : très

peu de gènes sont mutés de manière récurrente, puisque seuls 5 exemples de récurrence ont été identifiés dans ces 5 cohortes. Ces 5 gènes (mutés chacun chez 2 patients uniquement) sont les gènes *CHD8* (qui code pour une hélicase de l'ADN), *NTNG1* (qui code pour une protéine de guidage axonal, Netrin G1), *SCN2A* (qui code pour une sous-unité de canal sodique exprimée dans le cerveau), *DYRK1A* (qui code pour une tyrosine kinase et est suspecté d'être impliqué dans le déficit cognitif associé au syndrome de Down) et *POGZ* (dont la fonction est encore mal connue). En outre, les gènes identifiés par les études d'exomes ne sont que très faiblement redondants avec les gènes déjà connus pour être impliqués dans les TSA.

Une étude d'exome, focalisée sur un paradigme de transmission récessive, a recherché des mutations homozygotes, ségrégeant avec la pathologie, dans 16 familles (Chahrour et al., 2012). Cette approche a permis d'identifier 4 nouveaux gènes candidats : *UBE3B* (qui code pour l'ubiquitine ligase E3B), *CLTCL1* (qui code pour la protéine *Clathrin heavy chain-like 1*, protéine de structure des vésicules d'endocytose), *NCKAP5L* et *ZNF18* (dont les fonctions sont encore mal caractérisées).

Ainsi, comme les études de CNV à haute résolution, et sans doute plus encore, les toutes nouvelles technologies de séquençage pangénomique confirment l'hétérogénéité génétique associée aux TSA et permettent de proposer de nouveaux gènes candidats. Ces approches génèrent une vertigineuse somme de données dont l'interprétation va être un défi majeur pour les années à venir.

2.2.3. Polymorphismes fréquents

Si les recherches de CNV et de mutations rares s'inscrivent dans un paradigme d'événements génétiques délétères à pénétrance élevée, un second paradigme est celui des maladies multifactorielles, résultant de l'association de plusieurs facteurs (génétiques et/ou environnementaux) individuellement associés à un risque faible, mais dont la combinaison peut aboutir au phénotype pathologique.

Selon cette hypothèse « variants fréquents, maladies fréquentes », de nombreuses études d'association (qui consistent à comparer les fréquences d'un polymorphisme dans une population de cas et dans une population de témoins) ont été réalisées. Les premières de ces études étaient basées sur des approches gènes-candidats - à l'instar des gènes impliqués dans le système sérotoninergique, dont l'exemple sera développé plus loin. La plupart de ces études portaient sur de petits effectifs, insuffisamment contrôlés en

termes de composition des populations comparées de cas et de témoins, et étaient donc limitées par une faible puissance statistique. Peu d'entre elles ont été répliquées de manière concluante sur des cohortes indépendantes.

Le développement des technologies de puces à ADN et, parallèlement, la mise en place de consortiums de recherche internationaux rassemblant plusieurs centaines de patients, ont permis de réaliser des études d'association pangénomiques (*genome-wide associations studies*) sur de grands effectifs (plus de 1000 patients). Cette approche a démontré sa pertinence dans plusieurs exemples de maladies complexes, comme le diabète de type 2 ou la maladie de Crohn. Dans le domaine des TSA, les deux premières de ces études, publiées en 2009, rapportaient une association significative avec des polymorphismes situés à proximité des gènes codant pour la cadhérine 9 et la cadhérine 10 (des protéines d'adhérence cellulaire), au locus 5p14.1. Le SNP (rs4307059) présentant l'association la plus forte était associé à un odds-ratio de 1,2 pour les TSA (Wang et al., 2009, Ma et al., 2009). De manière intéressante, ce même SNP a été associé aux capacités de communication sociale dans la population générale dans une étude ultérieure (St Pourcain et al., 2010). Une étude de Weiss et al. (2009) a mis en évidence une association (avec un odds-ratio de 1,9) avec un SNP situé à proximité du gène *SEMA5A*, codant pour la sémaphorine 5A, une protéine de guidage axonal. Enfin, l'étude du consortium Autism Genome Project a mis en évidence une association (avec un odds-ratio de 1,4) avec un SNP (rs4141463) situé dans le gène *MACROD2*, dont la fonction est mal connue (Anney et al., 2010). Cette association n'a pas été répliquée dans une étude ultérieure indépendante (Curran et al., 2011).

De manière décevante, les différentes études d'association pangénomiques indépendantes n'ont pas produit de répliquations croisées. Ce défaut de répliquations est sans doute en partie imputable à la double hétérogénéité génétique et clinique des TSA, qui constitue un obstacle à l'identification de facteurs de risque faibles. En outre, l'approche des études d'association pangénomique est limitée par une faible puissance statistique intrinsèque : les effets observés sont faibles (odds-ratios typiquement inférieurs à 2), or, du fait du très grand nombre de tests réalisés (plusieurs centaines de milliers de SNPs), les seuils statistiques appliqués sont très stringents (p-values de l'ordre de 10^{-8}), si bien que des effectifs de plusieurs milliers de sujets seraient nécessaires pour atteindre une puissance statistique satisfaisante. Si les polymorphismes fréquents n'ont probablement pas un rôle causal, ils sont susceptibles de moduler le

phénotype clinique. Dans cette hypothèse, la réalisation d'études d'association sur des groupes phénotypiquement plus homogènes pourrait permettre une identification plus robuste de facteurs modulateurs.

2.3. « Une constellation de maladies génétiques rares »

2.3.1. Hétérogénéité génétique des TSA et variabilité du génome humain

Les recherches sur les étiologies génétiques des TSA ont généré une abondante littérature (plusieurs milliers de publications). Après les approches gènes-candidats, l'avènement, au milieu des années 2000, des nouvelles technologies pangénomiques pour la détection des CNV et le génotypage à haut débit des polymorphismes, puis plus récemment du séquençage de l'exome, et bientôt du séquençage individuel du génome entier, ont produit une augmentation exponentielle des données disponibles. L'élément prépondérant de la génétique des TSA, à l'instar de la clinique, est l'hétérogénéité : les études de CNV à grande échelle ont permis d'estimer que plusieurs centaines de gènes et loci (200 à 400) sont associés aux TSA (Levy et al., 2011, Sanders et al., 2011), et ce nombre a encore augmenté avec les récentes études d'exomes. Chacune des anomalies génétiques identifiées a une prévalence extrêmement faible, les plus fréquentes (telles que la délétion 16p11.2, la duplication 15q11-q13, ou encore, pour les formes syndromiques, le syndrome de l'X-fragile) ne sont observées que chez 1% des patients environ. Ainsi, John Spiro (directeur scientifique adjoint de la Simons Foundation – Autism Research Initiative, et éditeur senior pour la revue Nature) définit les TSA comme « une constellation de maladies génétiques rares » (Schaaf et Zoghbi, 2011).

Cette notion d'hétérogénéité génétique se double d'une notion de complexité : la plupart des anomalies génétiques identifiées présentent une pénétrance incomplète, et une expression phénotypique variable.

Parallèlement, le développement des technologies à haut débit a mis en évidence une très grande variabilité du génome humain « normal » : il existe un taux élevé d'anomalies génétiques dans la population générale, incluant des anomalies impliquées dans les pathologies. Les premières cartographies globales des CNV ont mis en évidence un grand nombre de régions variables en termes de nombre de copies (*copy number variant regions*), qui représentent 12% du génome humain. On peut détecter en moyenne un CNV par paire de chromosomes dans un génome normal avec des puces de résolution moyenne (Redon et al., 2006) et près de dix fois plus avec les puces à haute

résolution. Les résultats du projet « 1000 genomes », projet de séquençage pangénomique individuel à grande échelle, indiquent que chaque génome comporte en moyenne 250 à 300 gènes affectés par des mutations perte-de-fonction, en restreignant cette notion aux mutations faux-sens, d'épissage ou induisant un décalage du cadre de lecture. Le nombre de mutations faux-sens est estimé à plusieurs milliers par génome (1000 Genomes Project Consortium, 2010).

L'avènement des technologies à haut débit a donc marqué un changement d'échelle, mais également de problématique : le défi actuel n'est plus la production des données génétiques brutes, mais leur analyse et leur interprétation en termes de signification pathologique.

2.3.2. Architecture génétique des TSA

Il est probable que la grande diversité des facteurs génétiques impliqués soit associée à une hétérogénéité des modes de transmission. Deux modèles sont proposés : un modèle monogénique et un modèle oligo- ou polygénique.

2.3.2.1. Modèle monogénique

Le modèle monogénique implique des anomalies génétiques à pénétrance élevée : un gène anormal ou un CNV suffit à donner un phénotype pathologique.

Les modes de transmission envisageables dans ce paradigme sont notamment :

- une transmission de type mendélienne. Il n'a pas été décrit de cas de transmission dominante dans des familles, mais cette possibilité ne peut être exclue, notamment pour des gènes associés à un phénotype léger. Dans le cas de phénotypes sévères, on s'attend préférentiellement à un modèle récessif. Dans la lignée de l'étude d'exome de Chahrour et al. (2012), l'analyse plus exhaustive des exomes et les analyses combinées d'exomes et de CNV, permettront certainement de mettre en évidence des cas où les 2 allèles du même gène sont affectés chez un même patient par 2 événements hérités.
- une hérédité liée à l'X, telle qu'elle a été décrite pour les gènes *NLGL3* et *NLGN4X* (Jamain et al., 2003). Un séquençage systématique de gènes situés sur le chromosome X par Piton et al. (2011) a permis de mettre en évidence des mutations de plusieurs gènes candidats, dont notamment des mutations tronquantes des gènes *ILIRAPL1* (qui code pour une protéine de la famille des

récepteurs de l'interleukine 1 exprimée dans le cerveau) et *MAOB* (qui code pour la monoamine oxydase B). La forte prédominance masculine observée dans les TSA serait cohérente avec ce mode de transmission, même si les exemples décrits ne suffisent pas à expliquer ce déséquilibre de sex-ratio. L'hérédité liée à l'X est fréquente dans le retard mental.

- un événement génétique *de novo*. Les mutations ponctuelles et CNV rares *de novo* sont 2 à 3 fois plus fréquents (respectivement) chez les patients avec TSA, en particulier pour les cas sporadiques, que chez les sujets non atteints. Les CNV *de novo* seraient responsables de 5 à 8% des cas de TSA (Schaaf et Zoghbi, 2011), et les mutations ponctuelles *de novo* de 10% des cas (Iossifov et al. 2012). Il est montré que les mutations *de novo* sont très majoritairement d'origine paternelle, et que leur fréquence augmente avec l'avancement de l'âge paternel (O'Roak et al., 2012). Cette observation est cohérente avec les études épidémiologiques qui montrent qu'un âge paternel avancé est un facteur de risque de TSA (Kolevzon et al., 2007).

Les syndromes génétiques associés aux TSA pourraient représenter l'archétype des formes monogéniques d'autisme : une anomalie génétique connue est nécessaire et suffisante pour produire la pathologie, et elle est associée à un phénotype caractérisé. Ces syndromes sont typiquement associés à des événements génétiques *de novo* (avec, pour le syndrome de l'X-fragile, une notion de « prémutation » liée à l'X). Toutefois, il est probable que des facteurs modificateurs (non encore identifiés) soient associés à ces syndromes, puisque le phénotype, et en particulier l'association aux TSA, n'est en réalité pas toujours constant : par exemple, le syndrome de l'X fragile est associé à un TSA dans 50 à 70% des cas. En dehors de ces syndromes bien caractérisés, il est extrêmement difficile, en l'état actuel des connaissances, de démontrer qu'une anomalie génétique seule suffit à causer un TSA.

2.3.2.2. *Modèle multifactoriel*

Le modèle oligo- ou multifactoriel implique une association de plusieurs facteurs (génétiques ou non) aboutissant à un phénotype pathologique. C'est le paradigme des maladies complexes, à transmission non mendélienne.

Dans les TSA, plusieurs études ont mis en cause l'association de plusieurs facteurs génétiques. Girirajan et Eichler (2010) ont recherché les associations entre, d'une part,

des syndromes génétiques ou des CNV récurrents dans les TSA, considérés comme une « première atteinte » (*first hit*) et d'autre part, d'autres CNV de grande taille (>500kb), considérés comme une « seconde atteinte » (*second hit*). Leurs résultats indiquent que plus la « première atteinte » est héritée, plus il est fréquent d'observer une seconde atteinte (figure I-2), suggérant un gradient entre des anomalies génétiques *de novo* à forte pénétrance et des associations d'anomalies héritées à faible pénétrance. (Leblond et al., 2012) ont disséqué les anomalies génétiques associées aux CNV *de novo* affectant le gène *SHANK2*, retrouvés chez 3 patients avec TSA. Cette étude a mis en évidence, chez les patients porteurs d'une délétion de *SHANK2*, des CNV hérités affectant le locus 15q11-q13 (également associé aux TSA), suggérant un modèle à deux atteintes. Enfin, la première des études d'exome dans les TSA rapportait une association chez un même patient entre une mutation *de novo* dans le gène *FOXP1* (homologue de *FOXP2*, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement du langage) et une mutation héritée dans le gène *CNTNAP2* (gène candidat impliqué dans les TSA)(O'Roak et al., 2012).

Dans la perspective de ce modèle multifactoriel, la dissection fine des associations entre différents facteurs génétiques impliqués dans les TSA est nécessaire à l'interprétation clinique des données génétiques et va représenter un important effort de recherche. La combinatoire des associations possibles est théoriquement infinie, impliquant une multitude de gènes, et toute la gamme des impacts possiblement associés aux facteurs génétiques. A ces facteurs génétiques peuvent s'ajouter par ailleurs des facteurs de risque non génétiques (épigénétiques ou environnementaux).

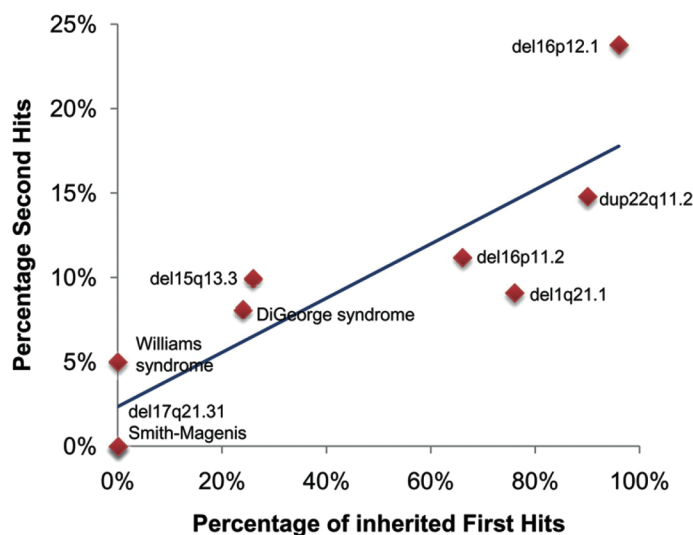


Figure I-2 : Two-hit model proposé par Girirajan et Eichler (2010), basé sur une augmentation de la prévalence des CNV de grande taille (*second hits*) associés aux CNV récurrents dans les TSA ou aux syndromes génétiques (*first hits*, étiquetés à côté des points), lorsque ceux-ci sont hérités.

2.3.3. Bénin ou délétère : signification des variants génétiques

L'importance de l'interprétation de la signification clinique d'un variant génétique s'est accrue avec la mise en évidence de la variabilité du génome humain normal : l'identification d'une variation génétique chez un patient ne suffit pas à démontrer un rôle causal de ce variant dans la pathologie. L'interprétation de la signification clinique d'un variant repose sur un faisceau d'arguments épidémiologiques, phénotypiques et fonctionnels. Dans le cas des variants rares associés aux TSA, ces arguments sont souvent lacunaires, ce qui rend difficile l'interprétation étiologique à l'échelle individuelle.

2.3.3.1. Éléments épidémiologiques : association et pénétrance

L'implication d'un facteur génétique dans une pathologie suppose que ce facteur est retrouvé plus fréquemment chez les cas que chez les sujets non affectés (notion d'association), voire uniquement chez les cas (notion de pénétrance complète). À l'exception des variants fréquents évoqués plus haut, la prévalence individuelle des facteurs génétiques impliqués dans les TSA est extrêmement rare (1% des patients pour les plus fréquents). La détermination de la fréquence et de la pénétrance des variants rares nécessite donc d'investiguer plusieurs centaines voire plusieurs milliers de patients, mais également plusieurs milliers de témoins. En additionnant les données de plusieurs études de CNV à grande échelle, une association statistiquement significative avec les TSA a pu être démontrée pour une dizaine des CNV les plus fréquents (Sanders et al., 2011). Cooper et al. (2011) ont évalué la pénétrance de 59 CNV récurrents en comparant une population de près de 16 000 enfants atteints de retard mental et de diverses anomalies congénitales à une population de plus de 8000 témoins. Toutefois, dans la plupart des cas, la pénétrance des événements génétiques associés à l'autisme n'est pas encore déterminée, et nécessitera probablement une mutualisation des données à l'échelle internationale.

La majorité des CNV et mutations associés aux TSA sont hérités, ce qui suggère une pénétrance incomplète. Toutefois, ces anomalies peuvent être associées à des traits infracliniques chez les parents porteurs : c'est le cas par exemple pour la microdélétion 16p12.1, facteur de risque de retard développemental. Cette délétion héritée s'inscrit dans le modèle à deux atteintes (*two-hit model*) de Girirajan et Eichler (2010), et les parents porteurs sont 6 fois plus à risque de développer une maladie psychiatrique

(dépression, trouble bipolaire), des troubles des apprentissages mineurs ou une épilepsie que les parents non porteurs (Girirajan et al., 2010).

À l'inverse, le caractère *de novo* d'une anomalie génétique est souvent considéré comme un argument fort en faveur d'un rôle causal dans la pathologie. Cette notion est toutefois insuffisante : les événements *de novo* ne sont pas exceptionnels, l'incidence des mutations ponctuelles est d'une centaine par génome et par génération, dont en moyenne environ 0,5 mutation génique non synonyme chez les sujets non atteints (0,9 chez les patients avec TSA) (Sanders et al., 2012). L'incidence des CNV rares est plus faible, mais non nulle (1 à 2% des sujets non atteints vs 5 à 6% des patients avec TSA) (Sanders et al., 2011). Les auteurs de l'une des études d'exome soulignent que « la plupart des événements *de novo* observés [dans les exomes] ne sont pas liés aux TSA ; ceux qui confèrent un risque sont distribués sur de nombreux gènes et sont à pénétrance incomplète (c'est-à-dire pas nécessairement suffisant pour causer la maladie) » (Neale et al., 2012).

2.3.3.2. *Éléments cliniques : phénotype associé*

La caractérisation d'un tableau phénotypique récurrent associé à un événement génétique donné est également un argument fort en faveur d'un rôle pathogène de cet événement.

Les syndromes génétiques classiques sont pour la plupart bien caractérisés, tant sur le plan neuropsychiatrique que sur le plan somatique (dysmorphies notamment). Certains des « nouveaux » syndromes ont également été associés à des phénotypes caractéristiques. On peut citer par exemple :

- le syndrome de délétion 22q13, classiquement caractérisé par une hypotonie néonatale, un retard des acquisitions associé à un retard de langage sévère et des traits autistiques, une avance staturale acquise et une tolérance à la douleur importante (Cusmano-Ozog et al., 2007).
- la délétion et la duplication 16p11.2 : de manière intéressante, les anomalies de dosage génique sont associées à des phénotypes de troubles alimentaires et morphologiques en miroir : la délétion est associée à une obésité et à une macrocéphalie, tandis que la duplication (également associée à la schizophrénie) est associée à un sous-poids et à une microcéphalie (Walters et al., 2010 , Jacquemont et al., 2011).

L'inactivation de certains gènes a également été associée à des endophénotypes particuliers : c'est le cas par exemple des mutations dans le gène *PTEN*, associées à une macrocéphalie (Butler et al., 2005).

Toutefois, plusieurs CNV récurrents sont associés à des phénotypes extrêmement pléiotropes – nous reviendrons sur ce point ultérieurement (cf. section 2.3.4). Dans le cas des CNV et mutations plus rares, décrits chez un ou quelques patients seulement, la caractérisation phénotypique est plus difficile. Dans ce cas encore, une mutualisation des données à l'échelle internationale est nécessaire. Des bases de données interactives en libre accès ont été développées dans cette perspective, comme *Decipher* ou *Database of Genomic Variants*.

Dans le domaine des polymorphismes fréquents, l'association d'un polymorphisme donné avec un phénotype (non nécessairement pathologique puisqu'il s'agit de variants fréquents en population générale) est également un argument fort en faveur d'un impact fonctionnel du polymorphisme considéré (et, le cas échéant, en faveur d'un rôle en tant que facteur de risque pathologique). On peut citer à titre d'exemple les études d'imagerie-génétique, visant à mettre en évidence une association entre des variations d'activité cérébrale observées en IRM fonctionnelle pour une tâche donnée (ou des variations anatomiques) et un ou plusieurs SNP. Ainsi, Pinel et al. (2012) ont mis en évidence l'association de deux SNP situés dans le gène *FOXP2* (codant pour un facteur de transcription exprimé dans le cerveau, et impliqué dans certains troubles du langage) avec le traitement cortical du langage écrit. Des exemples similaires existent également pour des phénotypes biochimiques, tels que l'association d'un SNP situé dans le gène *ITGB3* (codant pour l'intégrine β 3) avec le taux de sérotonine sanguine, mise en évidence par une étude d'association pangénomique (Weiss et al., 2004) et validée fonctionnellement par les travaux de Carneiro et al. (2008).

2.3.3.3. *Éléments expérimentaux : impact fonctionnel et physiopathologie*

Les arguments fonctionnels en faveur de la pertinence clinique d'un variant génétique dans les TSA sont de deux ordres : d'une part, l'impact du variant sur la fonction du gène, et, d'autre part, le rôle physiologique du gène et le rationnel physiopathologique.

L'effet d'une délétion sur le ou les gènes concernés est évident (perte d'un allèle). Une duplication, en revanche, peut aboutir à un « surdosage génique », ou, si un point de cassure se trouve dans un gène, à une perte de fonction de celui-ci (selon la structure du

remaniement). Dans les deux cas, l'impact physiopathologique de ces variations de dosage génique ne peut être déterminé a priori. Comme les délétions, les mutations non-sens, d'épissage et induisant un décalage du cadre de lecture sont considérées a priori comme des mutations perte-de-fonction. L'interprétation des mutations faux-sens et SNP non synonymes, en revanche, est moins évidente. Des algorithmes basés sur la conservation phylogénique et les propriétés physico-chimiques des acides aminés pour prédire l'impact des mutations, de bénin à délétère : on peut citer par exemple les algorithmes Sift et Polyphen. La détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine et des relations structure-activité peut également être un outil prédictif. Toutefois, il a été montré que les variants synonymes – non pris en compte par les outils de prédiction basés sur les acides aminés – peuvent également affecter la fonction de la protéine, en altérant l'épissage de l'ARN, sa stabilité, ou encore l'efficacité de traduction (Sauna et Kimchi-Sarfaty, 2011). Idéalement, c'est la caractérisation *in vitro* de la protéine mutée obtenue par mutagenèse dirigée qui permet de confirmer l'impact fonctionnel du variant. Dans le cas des variants non codants, seule l'étude *in vitro* (ou, le cas échéant, les corrélats phénotypiques *in vivo*) permettent de déterminer l'impact. Enfin, les mutations rares sont hétérozygotes dans la grande majorité des cas, et il est difficile d'estimer a priori si l'haploinsuffisance a un impact *in vivo* ou si une copie fonctionnelle du gène suffit à assurer ses fonctions.

La fonction physiologique du gène affecté est un élément clef dans la sélection des gènes candidats pour les TSA. L'expression cérébrale, la participation à des processus impliquant d'autres gènes associés à la pathologie, l'homologie avec d'autres gènes impliqués dans les TSA sont des arguments classiquement retenus dans la sélection des gènes candidats. Les modèles cellulaires et les modèles animaux, sur lesquels nous reviendrons ultérieurement (cf section 2.4.2), sont des éléments de validation expérimentale des gènes candidats, ainsi que l'étude de l'expression ou de la fonction du gène chez les patients lorsque cela est possible.

2.3.3.4. Vers une génétique diagnostique des TSA ?

La caractérisation d'une anomalie génétique sur le plan épidémiologique (prévalence et pénétrance), clinique (phénotype associé) et fonctionnel (physiopathologie) est à la base des applications cliniques : diagnostic et pronostic, conseil génétique et diagnostic prénatal, voire thérapeutique spécifique. Toutefois, l'hétérogénéité génétique associée aux TSA et la faible prévalence individuelle des anomalies génétiques impliquées

rendent cette caractérisation lacunaire dans la plupart des cas. Il est souvent difficile d'affirmer qu'une anomalie génétique donnée (ou une combinaison d'anomalies) est responsable d'un phénotype de TSA. Si les connaissances progressent quant à la caractérisation des syndromes récurrents, les événements génétiques rares, voire privés, et plus encore les combinaisons d'anomalies génétiques rares, constituent un défi majeur en termes de diagnostic et de conseil génétique.

Les plateformes de puces à ADN pour la détection des CNV ont été développées pour des applications cliniques depuis le milieu des années 2000, dans le cadre du diagnostic étiologique des retards mentaux. Des algorithmes décisionnels ont été élaborés pour déterminer la signification clinique des CNV identifiés, et pourraient être transposables aux TSA. Un exemple est proposé figure I-3a : l'application de cet algorithme à 49 CNV identifiés dans une cohorte de 386 patients a permis d'attribuer une pertinence clinique à 25 CNV (51%), tandis que 14 (28%) ont été classés « CNV de signification clinique inconnue » (Koolen et al., 2009). Ces algorithmes sont simples et utilisables en routine pour le diagnostic, mais imparfaits : la notion de transmission est le critère essentiel mais elle présente des limites, et la notion de rationnel physiopathologique n'est pas prise en compte. Le paradigme sous-jacent est celui d'une pathologie monogénique à pénétrance complète – ce qui n'est certainement pas un cas général dans les TSA. En contraste, la figure I-3b propose un exemple d'algorithme pour la prise en charge des patients entrant dans un modèle à deux atteintes génétiques (Girirajan et Eichler, 2010) : ce schéma souligne que, dans ce contexte de complexité, il est extrêmement difficile de définir une stratégie générale, et qu'une décision au cas par cas est nécessaire.

2.3.4. Génétique et nosographie psychiatrique

2.3.4.1. Notion de divergence phénotypique

L'hétérogénéité clinique des TSA semble cohérente en regard de la grande hétérogénéité génétique. Une hypothèse intégrative considère que les différentes anomalies génétiques convergent vers un petit nombre de voies biologiques communes, dont les altérations sont associées au phénotype de TSA – les différentes modalités des altérations neurobiologiques expliquant la variabilité clinique au sein d'une même entité nosographique. Toutefois les tentatives pour associer à une anomalie génétique un

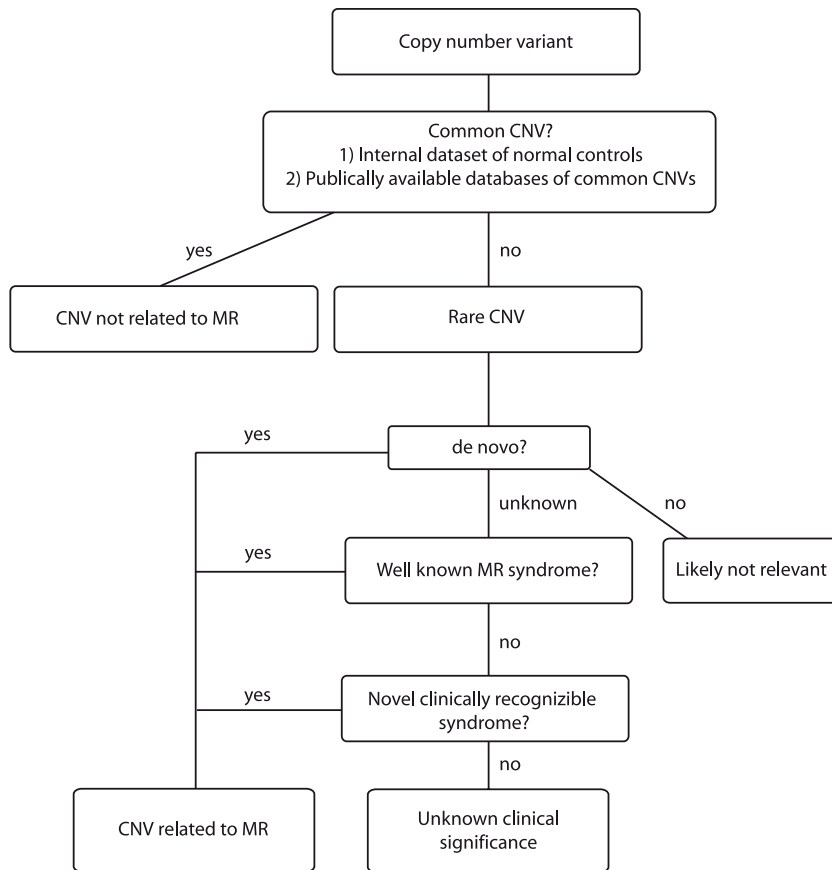


Figure 3a: exemple d'algorithme utilisé dans le diagnostic du retard mental (MR) pour déterminer la signification clinique des CNV identifiés (Koolen *et al.*, 2009)

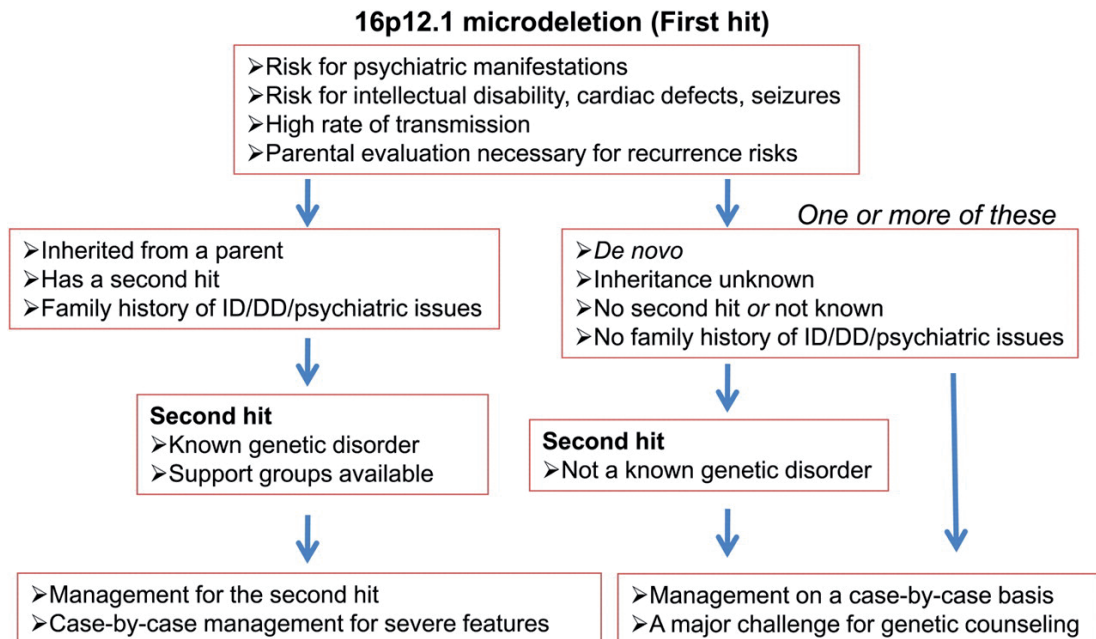


Figure 3b: algorithme proposé pour la prise en charge des situations à deux atteintes génétiques (*two-hit model*, basé sur l'exemple de la délétion 16p12.1 comme première atteinte) (Girirajan et Eichler, 2010)

tableau clinique se sont récemment heurtées à la surprenante pléiotropie phénotypique qui caractérise certains des nouveaux CNV identifiés dans les TSA – en contraste avec les phénotypes relativement constants de la plupart des syndromes génétiques classiques. À titre d'exemple, les différents CNV affectant les loci 15q11-q13 et 16p11.2 (les plus fréquents dans les TSA – et donc les mieux documentés) ont chacun été associés à différentes pathologies neurodéveloppementales (TSA, retard mental), neurologiques (épilepsie), psychiatriques (schizophrénie) et/ou somatiques (dysmorphies, obésité) (Girirajan et Eichler, 2010). De même, plusieurs gènes initialement rapportés pour être associés aux TSA ont été ensuite investigués dans d'autres cohortes et associés à d'autres pathologies : ainsi, *NRXN1*, *CNTNAP2*, *SHANK3*, parmi d'autres, ont été par exemple associés à la schizophrénie. L'étude de CNV de Pinto et al. (2010), portant sur près de 1000 patients avec TSA, a montré une fréquence accrue chez les patients de CNV affectant les loci précédemment impliqués dans les TSA, mais également les loci impliqués dans le retard mental. De même, l'étude de CNV de Williams et al. (2010) portant sur 410 patients avec TDAH a mis en évidence un enrichissement de CNV rares dans les loci précédemment associés aux TSA et à la schizophrénie.

Ces observations suggèrent une notion de vulnérabilité génétique (et neurobiologique) commune à plusieurs pathologies neuropsychiatriques, incluant notamment les TSA, le retard mental, l'épilepsie, la schizophrénie.

Plusieurs études épidémiologiques ont montré des résultats concordant avec cette hypothèse. Une susceptibilité génétique commune à différents troubles neurodéveloppementaux a été mise en évidence par une étude de jumeaux comparant la concordance entre jumeaux mono- et dizygotes pour les TSA, le TDAH, les tics et les troubles des apprentissages (Lichtenstein et al., 2010). Cette approche de génétique quantitative a permis d'estimer qu'une large part de la susceptibilité génétique était partagée entre ces 4 troubles, et en particulier entre les TSA et le TDAH. Parallèlement, une étude épidémiologique portant sur plus de 1000 familles suédoise de patients avec TSA a montré une agrégation familiale significative des TSA avec d'autres pathologies psychiatriques (schizophrénie, dépression, troubles de la personnalité), plus fréquentes chez les parents (Daniels et al., 2008). Ces observations sont également en faveur d'une notion de vulnérabilité générale aux troubles neuropsychiatriques plutôt que d'une spécificité gène-diagnostic.

2.3.4.2. Un modèle multifactoriel de la pléiotropie

Les relations génotype-phénotype dans les troubles neuropsychiatriques semblent donc caractérisées par un double phénomène de convergence-divergence : différentes anomalies génétiques convergent vers un même phénotype, et une même anomalie génétique peut diverger vers différents phénotypes. Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer les divergences phénotypiques associées à une même anomalie génétique, parmi lesquelles :

- un rôle de l'hétérogénéité allélique : des variations des points de cassure des CNV, ou de la nature des mutations ponctuelles d'un patient à un autre, pourraient modifier l'impact fonctionnel des anomalies génétiques et donc les conséquences phénotypiques.
- des facteurs génétiques au locus : dans le cas des CNV une délétion est susceptible de révéler l'effet d'une mutation ou d'un polymorphisme fonctionnel sur l'autre allèle.
- des facteurs épigénétiques au locus : le phénomène d'empreinte, par exemple, peut exacerber ou au contraire masquer l'effet d'une mutation ou d'un CNV.
- des facteurs stochastiques peuvent également intervenir : parmi ceux-ci, le phénomène d'aneuploïdie somatique mosaïque, relativement fréquent dans le cerveau (7 fois plus que dans les cellules sanguines) (Rehen et al., 2005), est susceptible en théorie de moduler localement l'impact fonctionnel d'une anomalie génétique.
- des facteurs environnementaux : on peut imaginer que la combinaison d'une anomalie génétique et d'une souffrance périnatale, par exemple, aboutisse de manière synergique à une altération du développement.

Toutefois, la notion de pléiotropie prend tout son sens dans un paradigme multifactoriel dans lequel le phénotype résulte de la somme des facteurs de risque et de la somme des facteurs protecteurs. La plus grande source de diversité combinatoire est probablement l'interaction entre des facteurs génétiques (épistasie), variants rares ou fréquents, selon le modèle de l'atteinte génétique multiple. Girirajan et Eichler (2010) proposent une dichotomie entre les maladies syndromiques, monogéniques, associées à un tableau clinique constant, et les syndromes génétiques variables, multigéniques. Dans le modèle à deux atteintes génétiques, déjà évoqué, la seconde atteinte est susceptible, selon les cas, d'être associée à :

- un phénotype plus sévère (ou moins sévère dans le cas d'un facteur protecteur), hypothèse cohérente avec la théorie dimensionnelle des TSA ;
- un phénotype additionnel, hypothèse cohérente avec la grande variété des comorbidités associées aux TSA ;
- un phénotype distinct, correspondant à un diagnostic différent, hypothèse cohérente avec la notion de divergence diagnostique.

Il est probable que les deux modèles – monogénique et multifactoriel – d'architecture génétique coexistent dans les TSA. Certaines formes apparaissent essentiellement monogéniques, et ont pour corollaire une pénétrance élevée et un tableau clinique relativement constant. En revanche les formes étiologiquement et phénotypiquement complexes, associées à une pénétrance incomplète et à un tableau clinique variable, sont interprétables dans un paradigme multifactoriel.

La génétique des TSA est donc caractérisée par une hétérogénéité allélique, de locus et d'architecture, doublée d'une notion de complexité phénotypique. Une dissection fine de ces différentes modalités d'hétérogénéité sera nécessaire pour permettre une interprétation étiologique de la pathologie à l'échelle individuelle. Les avancées de la génétique ont fourni les premières pistes à la compréhension de la physiopathologie des TSA. En retour, les progrès des connaissances dans le domaine de la neurobiologie permettent une validation des hypothèses génétiques, et constitueront une aide précieuse pour démêler la complexité étiologique des TSA.

2.4. Processus neurobiologiques impliqués dans les TSA.

2.4.1. La piste des gènes synaptiques

2.4.1.1. L'hypothèse synaptique : des gènes candidats aux réseaux géniques

L'élucidation des étiologies des syndromes génétiques associés à l'autisme a été le premier élément démontrant un substrat neurobiologique à des pathologies neurodéveloppementales, dans la mesure où les gènes *FMRI*, *MECP2*, *TSC1/2*, *NF1* (inactivés respectivement dans le syndrome de l'X-fragile, le syndrome de Rett, la sclérose tubéreuse de Bourneville et la neurofibromatose de type 1) sont exprimés au niveau neuronal. Plus tard, la description des premières mutations causales dans des cas d'autisme « non syndromique » dans les gènes *NLGN3/4* et *SHANK3*, codant

respectivement pour des protéines d'adhérence et une protéine d'échafaudage synaptiques, a abouti à la formulation d'une hypothèse synaptique des TSA. De nombreux gènes candidats identifiés par la suite s'intègrent dans cette hypothèse (voir pour revue Toro et al., 2010).

L'avènement des technologies d'analyse du génome à haut débit et l'explosion du nombre de gènes et loci associés aux TSA ont conduit à développer des outils d'analyse *in silico* de réseaux fonctionnels de gènes. Ces outils permettent une approche sans a priori des processus biologiques, en s'appuyant sur les bases de données répertoriant les fonctions biologiques des gènes (classées dans le système *Gene Ontology*), les voies métaboliques et de signalisation, ou encore les interactions entre protéines. Un exemple de ces réseaux de gènes, proposé par Gilman et al. (2011) et basé sur l'étude de CNV de Levy et al. (2011), est présenté figure I-4a. L'approche des réseaux fonctionnels de gènes permet de raisonner en termes d'enrichissement d'anomalies génétiques dans des processus biologiques (fréquemment atteints), plutôt que dans des gènes (dont les atteintes sont individuellement très rares). Il est donc plus facile de mettre en évidence des associations statistiquement significatives. Ces approches fonctionnelles non biaisées, basées sur des données génétiques à grande échelle, ont permis de confirmer l'implication des anomalies synaptiques dans les TSA : la figure I-4b, dérivée en partie du réseau présenté figure I-4a, propose une représentation plus traditionnelle de gènes associés aux TSA replacés dans le contexte de la structure des synapses et de la morphogénèse des épines dendritiques.

L'étude fonctionnelle des gènes impliqués dans les TSA valide donc, au moins en partie, l'hypothèse de convergence fonctionnelle selon laquelle des anomalies génétiques diverses affectent des voies biologiques communes. Toutefois, certains gènes considérés comme des facteurs de risque répliqués ont une fonction neuronale mais non exclusivement synaptique : c'est le cas par exemple du gène *CNTNAP2*, qui code pour une protéine d'adhérence cellulaire exprimée au niveau des axones myélinisés et qui intervient dans les interactions avec les cellules gliales. Par ailleurs, les approches systématiques ont également mis en évidence un enrichissement d'anomalies génétiques dans d'autres voies biologiques, non incriminées auparavant dans la physiopathologie des TSA. Ainsi, l'étude de CNV de Pinto et al. (2010) a mis en évidence un enrichissement d'anomalies génétiques associées au développement du système nerveux

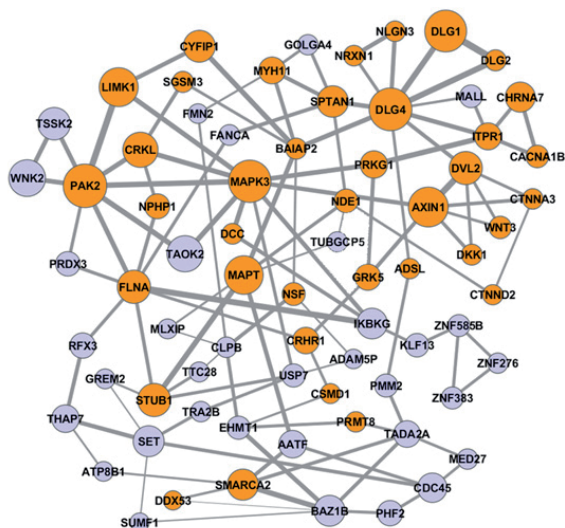


Figure 4a : Exemple de réseau fonctionnel de gènes associés aux TSA, construit *in silico* par Gilman *et al.* (2011) sur la base des gènes candidats issus de l'étude de CNV de Levy *et al.* (2011). Les noeuds du réseau correspondent aux gènes, les gènes impliqués fonctionnellement dans le système nerveux sont indiqués en orange.

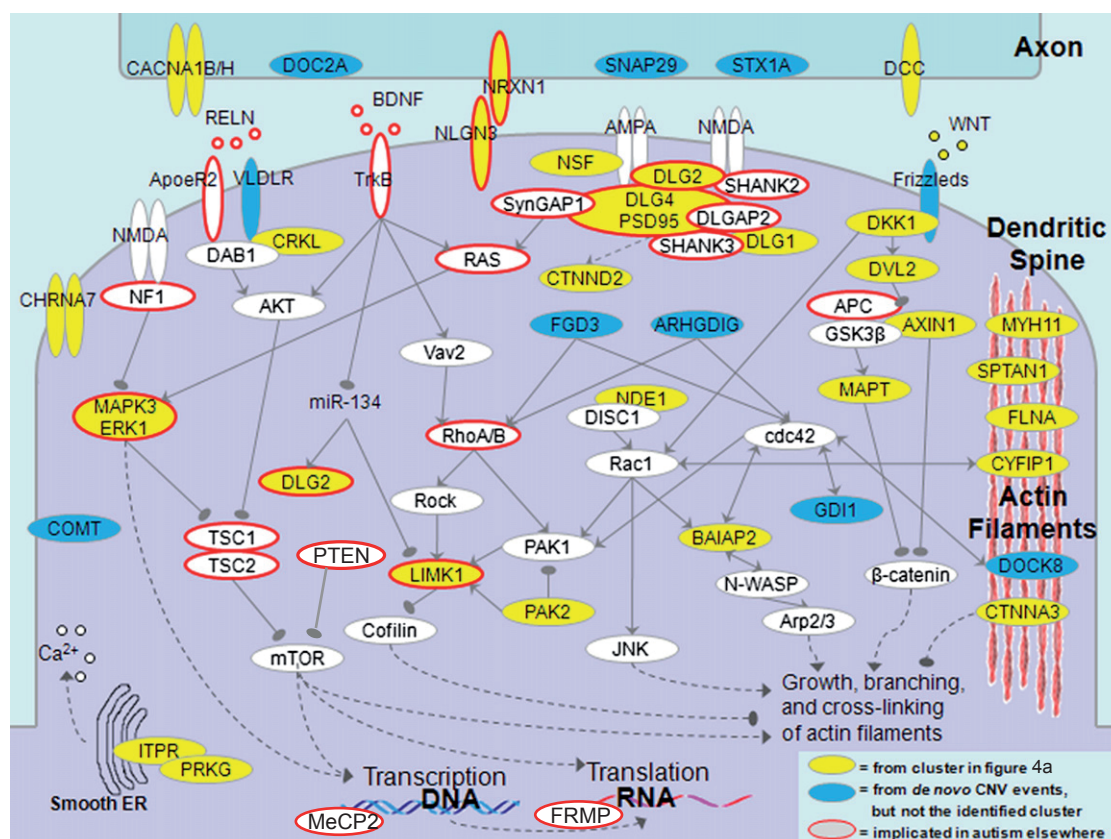


Figure 4a : Schéma simplifié des gènes associés aux TSA et impliqués dans le fonctionnement des synapses et dans la morphogénèse des épines dendritiques. Les protéines en jaune font partie du réseau présenté sur la figure 4a. Les protéines en bleu sont également des gènes candidats pour les TSA (associés à des CNV *de novo*) identifiés par l'étude de Levy *et al.* (2011), mais non identifiés par l'approche de réseau génique. Les protéines cerclées de rouge ont été impliquées dans les TSA par des études antérieures.

central et à l'adhésion cellulaire, mais également à la signalisation GTPase/Ras, à la prolifération et à la motilité cellulaires.

Les fonctions synaptiques semblent donc affectées de manière récurrente, mais elles le sont à des niveaux très divers : régulation des protéines synaptiques, protéines de structure de la synapse, ou neurotransmission (Toro et al., 2010).

2.4.1.2. Régulation des taux de protéines synaptiques

Des atteintes affectant les différents niveaux de régulation des taux de protéines synaptiques ont été associées aux TSA, et en particulier aux syndromes génétiques associés aux TSA. On peut citer notamment :

- Au niveau transcriptionnel, le gène *MECP2*, dont la perte de fonction est la cause du syndrome de Rett, code pour une protéine qui se lie aux îlots CpG méthylés de l'ADN et agit comme un régulateur (négatif ou positif) de la transcription. Parmi ses cibles, on compte notamment le facteur neurotrophique BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) et les protéines d'adhérence cellulaires Neuroligine 2 et Neuroligine 3 (Chahrour et al., 2008).
- Au niveau traductionnel, la protéine FRMP (codée par le gène *FMRI*, dont la perte de fonction est la cause du syndrome de l'X fragile) se lie aux ARNm, les transporte dans les dendrites et réprime leur traduction à la synapse. A l'inverse, la voie mTOR régule positivement la traduction des ARN, ainsi que la croissance et la prolifération cellulaire. Les gènes suppresseurs de tumeurs *NFI*, *TSC1/TSC2* et PTEN (respectivement impliqués dans la neurofibromatose de type 1, la sclérose tubéreuse de Bourneville et le syndrome de Cowden) sont des répresseurs de la voie mTOR. Ces différentes atteintes sont à l'origine d'un excès de synthèse protéique.
- Au niveau de la dégradation des protéines, le gène *UBE3A* (responsable du syndrome d'Angelman et gène candidat associé à la duplication 15q11-q13) code pour une ubiquitine ligase préférentiellement exprimée dans les neurones, qui régule la dégradation des protéines.

2.4.1.3. Protéines de structure de la synapse

Plusieurs gènes codant pour des protéines d'adhérence cellulaire synaptiques ont été impliquées dans les TSA, parmi lesquelles neurexine 1 (présynaptique), et les

neuroligines 1, 3 et 4 (postsynaptiques). Les neurexines et les neuroligines ont pour fonction la spécification et la validation des jonctions synaptiques. Leur dysfonctionnement altère les propriétés synaptiques et perturbe les réseaux neuronaux (Sudhof, 2008).

Des altérations de protéines d'échafaudage intracellulaire ont également été mises en cause dans les TSA, résultant notamment d'atteintes des gènes *SHANK3*, *SHANK2* et *SHANK1*. Ces protéines d'échafaudage constituent le lien moléculaire entre le récepteur NMDA du glutamate et le cytosquelette des épines dendritiques, et interviennent dans le phénomène de plasticité dynamique des épines dendritiques.

2.4.1.4. Neurotransmission

Quelques gènes candidats associés aux TSA interviennent directement dans la neurotransmission : en particulier, les gènes *CHRNA7* (sous-unité α_7 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine), *GABRB3*, *GABRB5* et *GABRG3* (sous-unités β_3 , β_5 , γ_3 des récepteurs GABAergiques) font partie des gènes candidats associés au locus 15q11-q13.

2.4.2. Apports des modèles animaux

2.4.2.1. Phénotypes comportementaux et validité d'aspect

Plusieurs modèles animaux reproduisant des anomalies génétiques associées aux TSA ont permis d'investiguer les dysfonctionnements neurobiologiques qui résultent de ces anomalies. La validité étiologique de ces modèles tient à leur construction même mais, puisque les TSA sont étiologiquement hétérogènes, elle est bien sûr partielle.

La validité d'aspect est un élément important de leur validation - et elle participe en retour à la validation du gène candidat comme gène de susceptibilité aux troubles neurodéveloppementaux. Des tests comportementaux ont été développés pour évaluer chez la souris le comportement social, les vocalisations ultrasoniques, et les stéréotypies comportementales – à titre d'équivalents comportementaux des trois domaines de la «triade autistique». La mémoire et l'apprentissage, la propension à l'épilepsie, la locomotion, les perceptions sensorielles ou encore les comportements relatifs à l'anxiété et à la dépression, sont également évalués par des tests classiques (voir pour revue Ey et al., 2011). Le tableau I-2 résume les phénotypes comportementaux et neurobiologiques de certains modèles murins de TSA.

Tableau I-2 : principaux phénotypes de modèles génétiques murins de TSA.

Anomalie génétique	Phénotype comportemental et neurologique	Phénotype neurobiologique	Références
Knock-out <i>Mecp2</i>	Déficits moteurs, réduction des interactions sociales	Réduction de la densité et de la complexité des arborisations dendritiques	(Ey et al., 2011)
Knock-out <i>Fmr1</i>	Stéréotypies comportementales, hyperactivité, épilepsie, altération de la mémoire et des rythmes circadiens	Anomalies morphologiques des dendrites	(Ey et al., 2011, Ramocki et Zoghbi, 2008)
Knock-out <i>Tsc1</i>	Mortalité précoce, épilepsie, hypoactivité, anomalies de l'apprentissage et de la mémoire	Hypertrophie et dysplasie neuronales, augmentation du volume cérébral, anomalies de la migration neuronale, retard de myélinisation.	(Ey et al., 2011, Meikle et al., 2007)
Knock-out <i>Nlgn4</i>	Réduction des vocalisations ultrasoniques et des interactions sociales	Diminution du volume cérébral	(Jamain et al., 2008)
Knock-out <i>Nlgn3</i>	Réduction des vocalisations ultrasoniques et des interactions sociales	Augmentation du nombre de synapses GABAergiques et des courants inhibiteurs	(Tabuchi et al., 2007)
Knock-out <i>Shank3</i>	Stéréotypies comportementales associées à des automutilations, déficits d'interactions sociales	Réduction des récepteurs glutamatergiques striataux, hypertrophie neuronale, augmentation de la complexité des arborisations dendritiques, hypertrophie striatale, réduction de la transmission synaptique cortico-striatale	(Peca et al., 2011)
Knock-out <i>Cntnap2</i>	Anomalies comportementales dans les trois domaines de la triade, hyperactivité, épilepsie	Anomalies de la migration neuronale corticale, réduction du nombre d'interneurones GABAergiques, asynchronie de l'activité neuronale	(Penagarikano et al., 2011)
Duplication 15q11-q13 ^a	Anomalies comportementales dans les trois domaines de la triade, hypoactivité	Réduction des taux de sérotonine cérébrale	(Tamada et al., 2010, Nakatani et al., 2009)
Délétion 16p11.2 ^b	Réduction de la viabilité à la naissance, hyperactivité, stéréotypies comportementales.	Augmentation du volume cérébral	(Horev et al., 2011)
Duplication 16p11.2 ^b	Hypoactivité.	Tendance à la réduction du volume cérébral	(Horev et al., 2011)

^a Duplication du locus orthologue au locus 15q11-q13 humain. Seules les souris porteuses d'une duplication d'origine paternelle présentent un phénotype pathologique. ^b Délétion/duplication du locus orthologue au locus 16p11.2 humain.

2.4.2.2. Phénotypes neurobiologiques, physiopathologie et validité prédictive

Parmi les atteintes morphologiques qui semblent récurrentes d'un modèle à l'autre, deux grands types d'anomalies antagonistes sont décrits : hypertrophie neuronale et cérébrale ou, au contraire, atrophie des arborisations dendritiques et diminution du

volume cérébral. Sur le plan électrophysiologique, on retrouve des anomalies de l'équilibre excitation/inhibition, résultant soit d'anomalies de la transmission glutamatergique, soit d'anomalies de la transmission GABAergique. Ainsi, si certains processus biologiques semblent atteints de manière récurrente dans ces modèles, les atteintes peuvent être par excès ou par défaut.

La caractérisation comparative des souris invalidées pour les gènes *Fmr1* et *Tsc2* publiée par Auerbach et al. (2011) met en évidence un antagonisme électrophysiologique et pharmacologique inattendu entre ces deux modèles (modèles du syndrome de l'X-fragile et de la sclérose tubéreuse de Bourneville, respectivement). Les protéines Fmrp et Tsc2 participent au même processus, la répression de la traduction des protéines à la synapse induite par la signalisation du récepteur glutamatergique métabotropique mGluR5, soit par répression directe de la traduction (Fmrp), soit indirectement par inhibition de la voie mTOR (*Tsc2*). L'activation du récepteur mGluR5 chez les souris déficientes pour Fmrp induit une augmentation de la synthèse protéique et une potentialisation du phénomène électrophysiologique de dépression à long terme (LTD), effets annulés par l'administration d'antagonistes du récepteur mGluR5. À l'inverse et de manière surprenante, les souris invalidées pour le gène *Tsc2* présentent une déficience de la LTD induite par la signalisation mGluR5, associée à une diminution de la synthèse des protéines impliquées dans la LTD. Cette déficience est antagonisée par l'activation pharmacologique du récepteur mGluR5. De manière intéressante, les effets des déficiences en Fmrp et en *Tsc2* s'annulent mutuellement : les souris de génotype *Fmr1* Y^{-/-}, *Tsc2* +/-, issues du croisement des deux souches, présentent un phénotype comportemental et électrophysiologique normal.

Ces antagonismes phénotypiques entre différents modèles génétiques révèlent une hétérogénéité de la physiopathologie des TSA. Si les données de génétique humaine suggèrent que différents processus biologiques liés à la morphogenèse neuronale et au fonctionnement de la synapse peuvent être altérés, les modèles animaux indiquent que ces processus biologiques peuvent être atteints par excès ou par défaut. Ces observations soulignent l'importance cruciale de la validité prédictive des modèles animaux de TSA pour de futures pistes thérapeutiques : ainsi, les antagonistes du récepteur mGluR5 améliorent le phénotype des souris invalidées pour *Fmr1* et font actuellement l'objet d'essais thérapeutiques chez des patients atteints du syndrome de l'X-fragile (Berry-Kravis et al., 2009). Ces mêmes molécules, à l'inverse, seraient

probablement délétères chez les patients porteurs d'anomalies génétiques affectant la voie mTOR (gènes *TSC1* et *2*, *NFI*, *PTEN*). En revanche, la rapamycine, inhibiteur de la voie mTOR, atténue les phénotypes pathologiques (comportementaux et électrophysiologiques) des souris déficientes pour *Tsc2* (Ehninger et al., 2008).

Cette notion d'antagonisme fonctionnel indique également que l'addition de plusieurs anomalies génétiques, individuellement délétères, peut avoir un effet compensatoire, comme dans le cas des souris doubles mutantes *Fmr1/Tsc2*. Cette observation ajoute un niveau de complexité supplémentaire à l'appréhension de la dimension multifactorielle des TSA et à l'interprétation clinique des anomalies génétiques multiples à l'échelle individuelle. Le développement de modèles d'épistasie sera nécessaire pour disséquer les effets des associations de plusieurs anomalies génétiques.

2.4.3. Neurobiologie humaine des TSA

2.4.3.1. Éléments de neuroanatomie et de neuropathologie

La majorité des études de neuropathologie basées sur les cerveaux post mortem de patients avec TSA porte sur un très petit nombre de cas, parfois un ou deux. Les anomalies décrites varient en fonction des régions cérébrales et de l'âge considéré – et, bien sûr, en fonction de l'hétérogénéité qui caractérise ces pathologies. Ces différents niveaux de variabilité, combinés aux faibles effectifs étudiés, expliquent sans doute que, si de nombreuses anomalies morphologiques ont été rapportées, peu ont été répliquées entre différentes études. Les observations issues des approches de neuropathologie sont à mettre en perspective avec les données issues des études d'imagerie : l'IRM permet l'investigation d'un plus grand nombre de patients, le cas échéant par des études longitudinales, mais sa résolution est beaucoup plus grossière que celle de l'anatomopathologie qui permet une approche à l'échelle cellulaire. Les principaux résultats issus de ces deux approches sont résumés dans le tableau I-3 (auxquels s'ajoute l'accélération précoce de la croissance cérébrale globale, déjà évoquée – cf. section 1.4.3).

Outre les anomalies anatomiques et cytoarchitecturales, deux études ont rapporté, au niveau cellulaire, une augmentation de la densité et de l'activation microgliales, qui suggère un phénomène de neuroinflammation (voir pour revue Schumann et Nordahl, 2011).

Tableau I-3 : résumé des principaux éléments de neuroanatomie des TSA, d'après la revue de Schumann et Nordahl (2011)

Région	Données de neuropathologie	Données d'imagerie
Cortex	Altérations cytoarchitecturales corticales (anomalies de structures des couches corticales et des minicolonnes radiales), augmentation de la densité cellulaire dans le cortex préfrontal dorsolatéral, diminution de la densité cellulaire dans le cortex temporal, diminution de la taille des cellules dans le cortex cingulaire antérieur	augmentation de l'épaisseur des cortex temporaux et occipitaux, diminution de l'épaisseur des cortex frontaux et pariétaux. La distribution de ces anomalies est très hétérogène d'un patient à l'autre (Ecker et al., 2010, Ramocki et Zoghbi, 2008).
Amygdale	diminution du nombre de neurones	augmentation de la taille de l'amygdale chez les jeunes enfants
Cervelet	diminution de la densité des cellules de Purkinje (répliquée dans plusieurs études et qui semble un trait récurrent associé aux TSA)	augmentation de la taille du cervelet (proportionnelle à celle du cerveau ?)

Les anomalies neuropathologiques ont également été envisagées sous l'angle des systèmes neurochimiques. Une réduction de la densité corticale des récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine a été rapportée (Lam et al., 2006). Par ailleurs, deux études publiées par Azmitia et al. (2011a et 2011b) ont mis en évidence une augmentation du nombre d'axones sérotoninergiques et une morphologie dystrophique de ces axones dans les cerveaux de patients avec TSA de différents âges. Enfin, une diminution de la densité des récepteurs GABA_A a été rapportée dans le cortex cingulaire antérieur, ainsi qu'une diminution des ARNm de la GAD (*glutamic acid decarboxylase*, enzyme de synthèse du GABA) dans le cervelet, variable selon les types cellulaires considérés (Schumann et Nordahl, 2011). Un déséquilibre glutamate/GABA (augmentation de la quantité de récepteurs mGluR5, réduction de la quantité de la sous-unité $\beta 3$ du récepteur GABA_A) a également été rapporté dans le cervelet (Fatemi et al., 2011). Ces observations, cohérentes avec les déséquilibres excitation/inhibition également rapportés dans les modèles murins, ont abouti à une nouvelle stratégie thérapeutique visant à restaurer l'homéostasie des synapses inhibitrices. Le bumétanide est un inhibiteur du co-transporteur NKCC1 (sodium, potassium, chlorures) classiquement utilisé comme diurétique ; il présente des propriétés anticonvulsivantes résultant d'une diminution de la concentration intracellulaire en ions chlorure, qui restaure les propriétés inhibitrices des récepteurs GABAergiques. Il fait l'objet d'essais thérapeutiques dans les TSA ; une première

étude-pilote sur 5 enfants a montré une amélioration des symptômes autistiques (Lemonnier et Ben-Ari, 2010).

Des efforts considérables ont été entrepris pour mettre en place des banques de tissus provenant de l'autopsie de patients avec TSA – c'est notamment l'objectif du projet américain *Autism Tissue Program*. Ces initiatives permettent désormais d'élargir les effectifs envisageables pour les études de neuropathologie et de neurobiologie, et donc de mieux appréhender l'hétérogénéité des TSA. En outre, ces projets favorisent la mutualisation des données issues de différentes approches (cliniques, anatomiques, génétiques, moléculaires) et devraient permettre d'envisager des approches intégratives. Un premier exemple d'étude combinant une approche génétique et une approche neuropathologique a été récemment publié par Wegiel et al. (2012), comparant les cerveaux de 9 patients porteurs de la duplication 15q11-q13 (dont 7 avec un diagnostic de TSA), 10 patients avec TSA non porteurs de la duplication, et 7 témoins. Les patients porteurs de la duplication présentaient une microcéphalie, ainsi que des hétérotopies et une dysplasie de l'hippocampe non retrouvées chez les patients non dupliqués. À l'inverse, la moitié des patients non dupliqués présentaient une dysplasie corticale, non observée chez les patients porteurs de la duplication.

Il existe encore peu d'hypothèses intégratives permettant d'interpréter les mécanismes des différentes altérations anatomiques, cytologiques et neurochimiques observées. Des études supplémentaires sont requises pour mieux décrire les anomalies observées, leur variabilité interindividuelle, et leurs variations développementales, et pour les mettre en perspective avec l'hétérogénéité clinique et génétique des TSA.

2.4.3.2. Premiers éléments de neurobiologie moléculaire

Une récente étude de Voineagu et al. (2011), publiée dans la revue *Nature*, rapporte l'analyse du transcriptome de trois régions cérébrales (le gyrus temporal supérieur ou cortex auditif primaire, le cortex préfrontal et le vermis cérébelleux) pour 19 patients avec TSA comparés à 17 témoins (analyse répliquée sur une cohorte indépendante de 3 cas et 5 témoins). Cette approche non biaisée de l'expression génique renforce l'hypothèse de convergence physiopathologique, dans la mesure où elle a permis de mettre en évidence des traits moléculaires communs, parmi lesquels :

- Une perte de l'expression génique différentielle qui distingue normalement les différentes aires corticales (dans cette étude le cortex frontal et le cortex

temporal), ce qui suggère une anomalie de la spécialisation des aires corticales au cours du développement.

- Une diminution de l'expression de gènes impliqués dans les fonctions neuronales (incluant la synapse, le transport des neurotransmetteurs, les projections neuronales, les vésicules synaptiques, les axones, les vésicules à clathrine). La mise en perspective avec une étude d'association pangénomique antérieure (Wang et al., 2009) indique que les gènes sous-exprimés sont par ailleurs enrichis en SNPs associés aux TSA, ce qui renforce l'hypothèse synaptique génétique des TSA.
- Des anomalies de l'épissage alternatif des ARNm associées à une diminution de l'expression du gène *A2BPI*, régulateur de l'épissage alternatif spécifique des neurones et des myocytes. Les cibles de ce facteur incluent plusieurs gènes associés aux TSA. L'altération de l'épissage alternatif constitue donc potentiellement un nouveau mécanisme impliqué dans la physiopathologie moléculaire des TSA.
- Une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation, cohérente avec les anomalies microgliales rapportées par les études de neuropathologie. Contrairement aux gènes synaptiques, ces gènes ne sont pas enrichis en SNPs correspondant à des signaux d'association génétique, ce qui suggère que ces altérations immunitaires sont un phénomène secondaire.

Ces résultats renforcent l'hypothèse synaptique des TSA, et proposent de nouveaux mécanismes physiopathologiques moléculaires (altérations de l'épissage alternatif), cellulaires (inflammation) et histologiques (altérations de la spécialisation fonctionnelle des aires corticales). De manière intéressante, les auteurs proposent des arguments pour tenter de distinguer les altérations primaires des altérations secondaires. Même si les caractéristiques génétiques des patients inclus dans cette étude n'ont pas été prises en compte et sont très probablement hétérogènes, les anomalies moléculaires semblent convergentes.

L'hypothèse d'une variété d'anomalies génétiques convergeant vers des mécanismes physiopathologiques communs est donc partiellement validée par des arguments génétiques, par l'étude des modèles animaux et par les éléments de neurobiologie issus

des patients. Les anomalies du développement neuronal et des fonctions synaptiques émergent comme des processus impliqués de manière récurrente dans les TSA. Les modèles de cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells* IPS), dérivées de fibroblastes prélevés sur les patients et reprogrammées pour obtenir le type cellulaire souhaité, vont prochainement constituer un nouvel outil pour étudier la physiopathologie cellulaire des TSA à l'échelle individuelle.

Toutefois, cette convergence physiopathologique n'est probablement pas absolue, comme le suggère l'hétérogénéité des anomalies neurobiologiques observée pour les modèles animaux comme pour les patients. En outre des anomalies non neuronales, telles que la neuroinflammation, semblent également participer de la physiopathologie des TSA. L'élucidation de la physiopathologie des TSA, et sans doute plus généralement des troubles neuropsychiatriques, implique de mieux appréhender l'hétérogénéité de ces troubles pour permettre de proposer des modèles intégratifs des différents niveaux d'anomalies (génétiques, neurobiologiques, cliniques) observés.

2.5. Décomposer la complexité : la stratégie des endophénotypes

La stratégie actuelle des études de génétique des pathologies complexes consiste à inclure un large spectre phénotypique de patients, correspondant au spectre d'une entité nosographique donnée, afin de rassembler les grands effectifs nécessaires pour obtenir une puissance statistique acceptable. Dans le cas de maladies neuropsychiatriques, cette stratégie porte ses fruits, mais elle révèle, d'une part, une hétérogénéité génétique (en miroir de l'hétérogénéité clinique) des pathologies considérées, et, d'autre part, une inadéquation des catégories nosographiques existantes pour déterminer les relations génotype-phénotype.

Une approche inverse, et complémentaire, consiste à réduire le spectre phénotypique considéré, pour établir des sous-groupes phénotypiquement homogènes de patients, en supposant que le déterminisme génétique et les mécanismes physiopathologiques seront ainsi moins complexes et plus homogènes. Cette approche permet une meilleure appréhension de l'hétérogénéité des pathologies neuropsychiatriques, et permet de s'affranchir des catégories nosographiques classiques, dont la pertinence en termes de physiopathologie n'est pas démontrée.

2.5.1. Symptômes candidats, endophénotypes, biomarqueurs

Leboyer et al. (1998) proposent deux stratégies pour identifier des phénotypes pathologiques plus homogènes afin de décomposer la complexité étiologique et phénotypique des troubles neuropsychiatriques. Ces deux approches s'inscrivent dans un paradigme de pathologies multidimensionnelles, résultant de l'interaction de plusieurs phénotypes restreints, chacun associé à un déterminisme génétique plus simple que la pathologie elle-même. Certains de ces phénotypes restreints peuvent être communs à différentes catégories nosographiques.

La première stratégie implique les sujets atteints et consiste à identifier des « symptômes-candidats » (par homologie avec l'approche gènes-candidats en génétique), ou des caractéristiques cliniques restreintes. Les symptômes-candidats peuvent être un des symptômes majeurs de la pathologie considérée (par exemple les troubles du langage), l'âge de début (ou, pour les TSA, la notion de régression), la présence d'antécédents familiaux, ou encore les comorbidités et signes associés.

La deuxième stratégie est celle des endophénotypes, ou phénotypes intermédiaires, qui s'inscrit dans un paradigme multifactoriel et dans une approche de spectre des troubles neuropsychiatriques (figure I-5a). Le concept d'endophénotype recouvre des traits infracliniques associés à l'expression de la pathologie, génétiquement déterminés, et qui constituent une susceptibilité génétique à la pathologie chez les sujets non atteints. Ce concept a été initialement développé dans un contexte de recherche de facteurs génétiques impliqués dans les maladies : les gènes qui déterminent un endophénotype sont des gènes de susceptibilité à la pathologie. Les endophénotypes peuvent être de nature biochimique, neurophysiologique, neuroanatomique, cognitive, ou encore neuropsychologique. Plusieurs auteurs ont proposé des critères pour définir un endophénotype optimal, on peut citer ceux de Cannon et Keller (2006) :

1. Un endophénotype devrait être héritable.
2. Un endophénotype devrait être associé aux causes de la pathologie, et non être une conséquence de la pathologie.
3. Plusieurs endophénotypes devraient être impliqués dans une pathologie complexe.
4. Un endophénotype devrait avoir une distribution continue dans la population générale.

5. Un endophénotype devrait idéalement être mesurable à plusieurs niveaux d'analyses (ou associé à d'autres endophénotypes à d'autres niveaux, par exemple : niveaux comportemental, neuroanatomique et neurochimique).
6. Des endophénotypes qui affectent plusieurs pathologies devraient être identifiés pour des pathologies génétiquement liées.

Ainsi, le concept d'endophénotype permet d'appréhender les dimensions multifactorielles et hétérogènes des étiologies des pathologies psychiatriques, la notion de spectre de symptômes et de sévérités, et le phénomène de pléiotropie entre plusieurs catégories nosographiques.

Ces critères de définition correspondent à un endophénotype optimal, phénotype intermédiaire utilisable pour élucider les relations gène-symptôme-pathologie. Cette définition s'avère restrictive : la majorité des phénotypes associés aux pathologies psychiatriques ne sont pas documentés pour chacun de ces critères et/ou ne les remplissent que partiellement. Les modalités possibles d'interactions gène-endophénotype-pathologie, schématisées par la figure I-5b, sont multiples, au delà de la relation linéaire qui caractérise les endophénotypes stricts (Walters et Owen, 2007). Ces endophénotypes au sens large, ou phénotypes associés, ou biomarqueurs lorsqu'il s'agit de traits biologiques, ne sont pas dépourvus d'intérêt : ils peuvent être informatifs sur les mécanismes physiopathologiques même si le lien est moins direct que dans le cas des endophénotypes au sens strict. En outre, ils peuvent constituer des outils cliniques pour le diagnostic, la classification, le pronostic, la réponse aux traitements dans les pathologies considérées.

La stratégie historique des endophénotypes prend pour point de départ un phénotype associé à une pathologie pour identifier les gènes qui le déterminent. Les méthodes classiquement employées pour ce faire sont l'analyse de liaison, les approches gènes-candidats, ou, plus récemment, l'approche d'association pangénomique appliquée aux traits quantitatifs (*quantitative trait loci* QTL). L'approche inverse, qui prend pour point de départ un variant génétique pour identifier les phénotypes associés, est de plus en plus employée avec l'explosion récente des données de génétique disponibles.

2.5.2. Biomarqueurs et endophénotypes biologiques associés aux TSA

Différentes catégories d'endophénotypes (au sens large) ont été associées aux TSA : endophénotypes biologiques, morphologiques, cognitifs, neuropsychologiques. Parmi

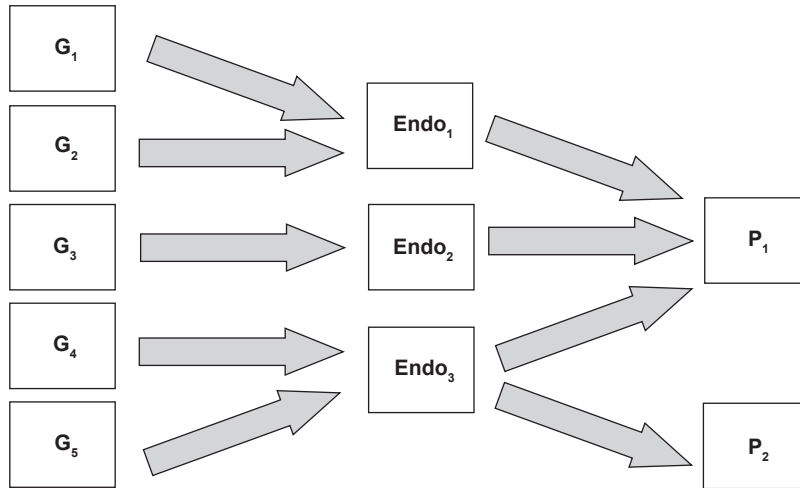
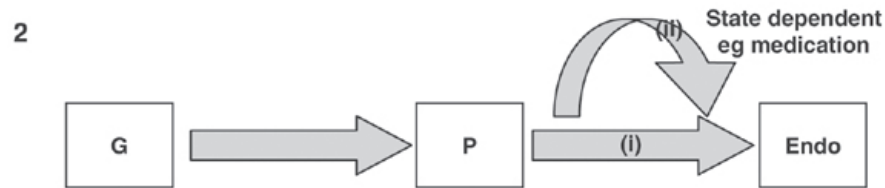


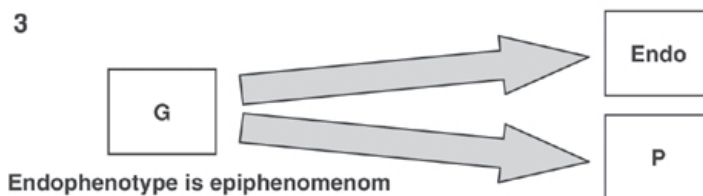
Figure 5a : Décomposer le phénotype: modèle simplifié des relations gènes (G) - endophénotypes (Endo) - pathologie (P).



1 Endophenotype on Disease Pathway (i.e. strictly-defined endophenotype)



2 Endophenotype is consequence of (i) disease symptoms or (ii) state



3 Endophenotype is epiphenomenon



4 Different genes associated with endophenotype and disease (eg linkage disequilibrium)



5 Endophenotype arises from non-genetic factors

Figure 5b : Différentes modalités possibles d'interactions gène-endophénotype-pathologie, dans le cas des endophénotypes au sens large. Des combinaisons de ces différentes modalités sont possibles. Enviro: environnement. D'après Walters et Owen (2007).

les endophénotypes morphologiques, le périmètre crânien est un exemple ayant permis d'établir avec succès une association génotype-phénotype, puisque les anomalies des gènes associés à la voie mTOR, et en particulier les mutations du gène *PTEN*, sont associées à une macrocéphalie. Le récent développement des études combinées d'imagerie cérébrale (fonctionnelle ou anatomique) et de génétique a également permis d'associer un phénotype anatomique et/ou neurophysiologique à des variants génétiques fréquents potentiellement pertinents dans la physiopathologie des TSA – c'est le cas par exemple de SNPs situés dans le gène *CNTNAP2* ou dans le gène du récepteur à l'ocytocine (Ameis et Szatmari, 2012).

Par ailleurs, de nombreux endophénotypes biologiques ont été proposés dans les TSA. Il faut souligner d'emblée que la majorité des études portent sur de petits effectifs, associés à une puissance statistique insuffisante. Globalement, il n'existe pas encore d'exemple ayant permis une élucidation intégrative du déterminisme génétique de l'endophénotype et de son impact physiopathologique. Néanmoins, ces biomarqueurs constituent des pistes à explorer pour une meilleure compréhension de la physiopathologie des TSA.

2.5.2.1. Traits neurochimiques

Les grands systèmes neurochimiques ont été investigués dans les fluides biologiques de patients avec TSA. Les anomalies de la sérotonine, et dans une moindre mesure, de la mélatonine, sont certainement les endophénotypes neurochimiques les mieux documentés dans les TSA. Ils seront traités à part ultérieurement (cf. section 3).

Concernant les catécholamines, cinq études concordantes ont rapporté une élévation de la noradrénaline plasmatique chez les patients avec TSA, alors que les catabolites de la noradrénaline (mesurés dans le plasma, les urines et le LCR) ne semblent pas affectés (voir pour revue Lam et al., 2006). Les résultats concernant les concentrations de dopamine (mesurés dans le plasma et les urines) et/ou de ses catabolites (mesurés dans le plasma, les urines et le LCR) sont équivoques, certaines études rapportant une augmentation et d'autres des valeurs normales. Les enzymes intervenant dans le métabolisme des catécholamines, dont la COMT (catéchol-O-méthyltransférase) et les MAO (monoamine oxydases) ont été investiguées sur le plan génétique. Les variants fréquents du gène *MAOA* n'ont pas montré d'association convaincante avec les TSA. Toutefois, le gène *COMT* est l'un des gènes candidats au locus 22q11.2, qui présente

des délétions récurrentes dans les TSA, ce qui suggère que des anomalies de l'activité COMT pourraient être associées aux TSA chez certains patients.

Plusieurs études ont étudié les concentrations de β -endorphine, agoniste endogène des récepteurs mu des opiacés, dans le plasma et le LCR des patients avec TSA. Certaines ont rapporté une augmentation, d'autres une diminution par rapport aux groupes témoins. Ces discordances pourraient être liées à des anomalies de maturation de la β -endorphine, qui dérive de la pro-opiomélanocortine : l'immunoréactivité C-terminale de la β -endorphine apparaît élevée, tandis que l'immunoréactivité N-terminale n'est pas altérée. En outre, une augmentation de l'immunoréactivité C-terminale a également été rapportée chez les mères de patients avec TSA (Leboyer et al., 1999). Le traitement des patients par des antagonistes des opiacés a été associé à une réduction des comportements auto-agressifs dans certaines études (Lam et al., 2006).

Enfin, une élévation des concentrations sériques (Miyazaki et al., 2004) ou dans un plasma riche en plaquettes (Correia et al., 2010) du facteur neurotrophique BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ont été rapportées chez des patients avec TSA. Une étude discordante a rapporté une diminution des concentrations plasmatiques (Kato-Semba et al., 2007). Cette discordance pourrait s'expliquer par de possibles artefacts liés au matériel biologique utilisé : le BDNF sanguin est principalement stocké dans les plaquettes, qui seraient donc le matériel optimal pour un dosage périphérique. Le serum et le plasma sont susceptibles d'être contaminés par un relargage *in vitro* de BDNF plaquettaire. Une autre hypothèse fait appel, comme pour la β -endorphine, à des anomalies de maturation : une récente étude neuropathologique rapporte des anomalies des différentes formes de maturation du BDNF (augmentation du pro-BDNF, diminution du BDNF tronqué) dans le cerveau de patients avec TSA (Garcia et al., 2012). Les études des polymorphismes du gène codant pour le BDNF ou pour son récepteur TrkB (*NTRK2*) n'ont pas montré d'association répliquée avec les TSA.

2.5.2.2. Traits endocriniens

Les études de l'axe corticotrope semblent indiquer que les niveaux de base du cortisol et de l'ACTH sont normaux. Toutefois, des anomalies fines de la réactivité et de la freination de l'axe corticotrope, ainsi que du rythme nyctéméral du cortisol ont été rapportées (Lam et al., 2006, Corbett et al., 2008).

Des anomalies de l'ocytocine, hormone hypothalamique peptidique impliquée dans la régulation des émotions et des comportements prosociaux, ont été décrites: les patients avec TSA présentent une réduction des concentrations d'ocytocine plasmatique, associée à une augmentation des concentrations de précurseurs (Green et al., 2001). L'inhalation d'ocytocine améliore le comportement social chez les patients avec autisme de haut niveau (Andari et al., 2010).

2.5.2.3. Traits immunologiques

De nombreuses études ont mis en évidence des anomalies des marqueurs immunologiques périphériques dans les TSA (voir la méta-analyse de Rossignol et Frye, 2012b), même s'il n'a pas été identifié de profil dysimmunitaire récurrent. Les anomalies des biomarqueurs sanguins les plus fréquemment rapportées concernent les profils de cytokines, dominés chez les patients avec TSA par une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (dont les interleukines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13) (30 études dont Ashwood et al., 2011, Suzuki et al., 2011), ainsi que la prévalence élevée (20 à 35%) d'auto-anticorps dirigés contre les tissus cérébraux (23 études dont Cabanlit et al., 2007, Wills et al., 2009). Des anomalies de l'immunité cellulaire ont également été rapportées. Ces observations sont concordantes avec les études de neurobiologie et de neuropathologie évoquées précédemment, qui mettent en évidence une activation anormale du système immunitaire cérébral. Les mécanismes de ces dysfonctions immunitaires ne sont pas élucidés.

En marge de ces approches ciblées, une étude non biaisée des protéines sériques par une approche de protéomique, portant sur 69 enfants avec TSA et 35 témoins, a mis en évidence une augmentation de plusieurs protéines impliquées dans le système du complément et l'immunité innée (Complément C1q, Fibronectine 1 et FHR1) (Corbett et al., 2007).

2.5.2.4. Traits métaboliques

Cette même étude de protéomique a également mis en évidence une diminution de l'apolipoprotéine B100 plasmatique associée aux TSA (Corbett et al., 2007). Une diminution du cholestérol total avait par ailleurs été rapportée chez 20% des patients dans une étude antérieure (Tierney et al., 2006). Les mécanismes de ces anomalies ne sont pas élucidés ; elles pourraient être secondaires à des troubles gastro-intestinaux, ou encore à des anomalies de clivage de l'apolipoprotéine B100.

Par ailleurs, des dysfonctions mitochondriales ont été décrites chez les patients avec TSA, récapitulées par Rossignol et Frye (2012a) dans une méta-analyse portant sur 68 articles. Les TSA sont associés à une maladie mitochondriale dans 5% des cas (soit une prévalence plus de 100 fois plus élevée que dans la population générale). En outre, des marqueurs de dysfonction mitochondriale sont rapportés indépendamment de la présence ou non d'une maladie mitochondriale : les mieux documentés sont une élévation du lactate et du ratio lactate/pyruvate plasmatiques chez 30% des patients environ. Une élévation de la créatine kinase et de l'ammoniémie, ainsi qu'une réduction de la carnitine ont également été décrites. Les causes génétiques des dysfonctions mitochondriales ne sont généralement pas élucidées, même chez les patients avec un diagnostic de maladie mitochondriale (pour lesquels l'étiologie génétique est inconnue dans près de 80% des cas). Une délétion du gène *TMLHE*, lié à l'X, qui code pour une enzyme de biosynthèse de la carnitine, a été proposée comme facteur de risque de TSA à faible pénétrance (Celestino-Soper et al., 2012). Palmieri et Persico (2010) suggèrent que les dysfonctions mitochondriales sont secondaires à des anomalies de l'homéostasie calcique, qui pourraient elles-mêmes résulter d'altérations immunologiques.

Des anomalies de l'homéostasie redox ont également été décrites : une augmentation du glutathion oxydé (GSSG) plasmatique, associée à une diminution du glutathion réduit (GSH), de l'activité de la glutathion peroxydase et du ratio GSH/GSSG a été rapportée chez les patients avec TSA par plusieurs études synthétisées dans une méta-analyse de Frustaci et al. (2012), ainsi que chez leurs parents (James et al., 2008). Ces observations suggèrent qu'une réduction de la capacité antioxydante, et donc une vulnérabilité accrue au stress oxydant, sont associées aux TSA.

Le métabolisme du glutathion est étroitement lié au métabolisme des monocarbone (métabolismes des folates et de la transméthylation) par le cycle de la méthionine : ce cycle, qui implique des enzymes dépendantes des folates, produit la S-adénosylméthionine, qui sert de cosubstrat aux méthyltransférases, et l'homocystéine, qui, via la voie de transsulfuration, est le substrat de la synthèse du glutathion. Des anomalies de la transméthylation ont également été impliquées dans les TSA : les patients présentent une diminution de la S-adénosylméthionine (SAM, donneur de groupement méthyle), et une augmentation de la S-adénosine homocystéine (SAH, forme déméthylée), associées à une réduction du ratio SAM/SAH (James et al., 2006). Ces anomalies sont également retrouvées chez les parents (James et al., 2008). Une

supplémentation vitaminique est susceptible d'améliorer le statut redox des patients (James et al., 2009). Une étude épidémiologique suggère que la supplémentation vitaminique périconceptionnelle est un facteur protecteur pour les TSA (Schmidt et al., 2011). Les études d'associations gènes-candidats portant sur les gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbone ont produit des résultats contradictoires. En revanche, deux études ont rapporté une prévalence élevée (45 à 75%) d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur des folates (FR, qui assure le transport par endocytose à travers la barrière hémato-encéphalique et à travers la barrière placentaire) chez les patients avec TSA, ainsi que, dans une moindre mesure, chez les parents (Frye et al., 2012, Ramaekers et al., 2012). Ces résultats suggèrent, comme pour les dysfonctions mitochondriales, un lien entre anomalies métaboliques et anomalies immunologiques. Le titre d'anticorps était corrélé avec la concentration en folates dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), et une supplémentation à dose élevée améliorait les symptômes autistiques.

2.5.2.5. Traits microbiologiques

Des anomalies de composition de la flore intestinale ont été décrites par quelques études chez des patients présentant un autisme avec régression, caractérisées notamment par un excès des genres *Clostridium* et *Desulfovibro*. Ces déséquilibres ont été proposés comme facteurs de risque, en lien supposé avec les troubles digestifs fréquents chez les patients (Finegold et al., 2012). Parallèlement, des relations entre le microbiote intestinal et le développement du système nerveux central ont été documentées sur des modèles animaux (Heijtz et al., 2011), attribuées aux interactions entre la flore microbienne et le système immunitaire et/ou aux interactions entre la flore microbienne et le métabolisme. Par exemple, les souris dépourvues de flore intestinale présentent une augmentation des concentrations de tryptophane sanguin et de sérotonine cérébrale (Clarke et al., 2012).

L'approche centrée sur les endophénotypes biologiques et biomarqueurs a donc permis d'identifier plusieurs processus biologiques altérés dans les TSA. Les mécanismes de ces altérations ne sont pas élucidés, pas plus que les liens entre ces différents niveaux d'altérations. Ces dysfonctionnements peuvent être des facteurs de risque indépendants, mais il est probable que certains d'entre eux ne soient pas une *cause* du TSA mais plutôt

un phénomène secondaire au mécanisme physiopathologique causal. C'est par exemple ce qui a été suggéré pour les anomalies immunitaires, qui pourraient être secondaires aux anomalies du développement cérébral (Voineagu et al., 2011), de même que des atteintes métaboliques pourraient être secondaires à leur tour aux anomalies immunitaires. Toutefois, la distinction entre phénomène causal et phénomène secondaire est généralement difficile à établir. En outre, le caractère secondaire d'un dysfonctionnement n'invalide pas sa pertinence physiopathologique : ces mêmes atteintes immunitaires et métaboliques, quelles qu'en soient les causes, sont probablement délétères pour les patients. À ce titre, ces dysfonctionnements constituent potentiellement des cibles d'interventions pour le développement de thérapies spécifiques. Des approches intégratives, investiguant simultanément plusieurs atteintes biologiques, parallèlement à une bonne caractérisation clinique (en termes de symptômes autistiques mais également de comorbidités et signes associés) et génétique des patients permettront de mieux comprendre les liens entre ces différents niveaux de dysfonctionnement et leur impact sur le phénotype clinique. Avec le développement espéré de thérapies ciblées, on peut s'attendre à ce que les biomarqueurs acquièrent un intérêt crucial pour la classification des formes cliniques et la prédiction de réponse thérapeutique.

3. LES ANOMALIES DE LA VOIE SEROTONINE - MELATONINE, ENDOPHENOTYPES DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

Chapitre de livre :

**Alterations of the serotonin-melatonin pathway in autism spectrum disorders :
biological evidence and clinical consequences**

C. Pagan, R. Delorme, JM. Launay, T. Bourgeron.

**In : The Autisms. Molecules to model systems. C.M. Powell & L.M. Monteggia,
Oxford Press. (sous presse)**

OBJECTIFS

Une précédente étude du laboratoire a mis en évidence une diminution de l'activité de l'enzyme ASMT et suggéré l'implication d'anomalies du gène *ASMT* dans le déficit en mélatonine observé chez les patients avec TSA, proposant ainsi un mécanisme biochimique et génétique à ce déficit (Melke et al., 2008).

L'objectif de ce travail est de poursuivre l'étude des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine comme endophénotype des TSA, en combinant les trois grandes stratégies d'investigation physiopathologique utilisables chez l'homme : étude d'endophénotypes, génétique et étude de tissus post mortem.

Ce travail se décompose en trois approches :

- (i) **Caractérisation biochimique du métabolisme de la sérotonine et de la mélatonine dans les TSA.** Une cohorte incluant plus de 200 patients et leurs apparentés au premier degré, ainsi que des témoins, a été investiguée pour le métabolisme de la sérotonine et de la mélatonine (enzymes et métabolites) à partir de prélèvements périphériques (sang, salive), en collaboration avec Jean-Marie Launay et Jacques Callebert (Hôpital Lariboisière), Didier Chevenne (Hôpital Robert Debré) et Odile Varoquaux (Hôpital André Mignot). En complément des prélèvements périphériques, des tissus post mortem (glandes pinéales et tractus gastro-intestinal) de patients avec TSA ont également été étudiés.
- (ii) **Exploration des mécanismes génétiques du déficit en mélatonine.** Les gènes intervenant directement dans la synthèse de la mélatonine (*AANAT* et *ASMT*) ont été étudiés sur le plan moléculaire (étude des polymorphismes, recherche de mutations rares et détermination de l'impact fonctionnel de ces mutations, études d'expression génique), dans le contexte des TSA mais également dans d'autres pathologies neurodéveloppementales, avec l'aide de Nathalie Lemièrre, Hany Goubran-Botros, Kerren Murray, Anne-Marie Le Sourd et Pauline Chaste (Institut Pasteur).
- (iii) **Détermination des corrélats cliniques des anomalies biochimiques.** Les associations entre les phénotypes biochimiques et cliniques ont été étudiées en

utilisant les données issues de différents instruments d'évaluation clinique, recueillies par les cliniciens (Richard Delorme, Pauline Chaste, Frédérique Amsellem, Laurence Letellier, Laura Delacombe, Evelyn Herbrecht - Hôpital Robert Debré et Hôpital Albert Chenevier, avec le support de la Fondation Fondamental pour l'ensemble de cette étude).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. EXPLORATION BIOCHIMIQUE DU METABOLISME DE LA SEROTONINE ET DES CATECHOLAMINES CHEZ LES PATIENTS AVEC TSA

Si l'hypersérotoninémie périphérique est un endophénotype bien décrit des TSA, ses mécanismes biochimiques et génétiques ne sont pas élucidés. Des anomalies de la synthèse, du catabolisme, et du transport de la sérotonine ont été alternativement évoquées. La majorité des travaux publiés a porté sur les mécanismes de transport de la sérotonine par le transporteur 5-HTT (ou SERT), avec des résultats contradictoires et globalement peu concluants. Nous proposons ici une étude globale du métabolisme de la sérotonine : synthèse par la TPH (tryptophane hydroxylase) et l'AADC (aminoacide décarboxylase) à partir du tryptophane, et catabolisme par la MAO (monoamine oxydase) et par la voie catabolique plus minoritaire de la sulfoconjugaison. La figure 1.1 récapitule les paramètres explorés (voir aussi annexe 1 : Manivet et al, 2012). Les données relatives au catabolisme de la sérotonine sont mises en perspective avec le catabolisme des catécholamines, et en particulier de la noradrénaline, par la MAO et par la COMT (catéchol-O-méthyltransférase). Cette exploration est basée, d'une part, sur des prélèvements sanguins (sang total, plasma et plaquettes), qui permettent d'investiguer un grand nombre de sujets (témoins, patients avec TSA et leurs apparentés au premier degré : parents, frères et sœurs non atteints), et d'autre part, sur l'analyse de tissus gastro-intestinaux (iléons) post mortem de patients avec TSA. Le tractus gastro-

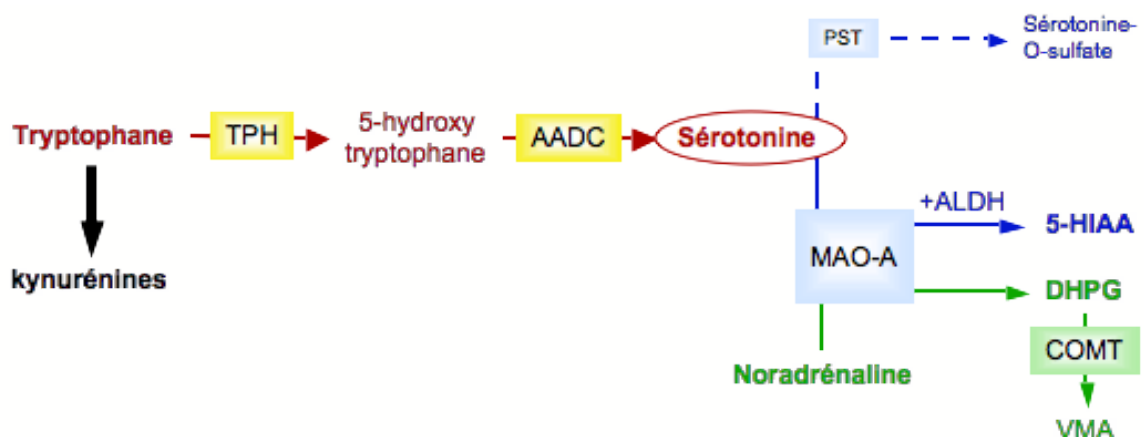


Figure 1.1 : paramètres du métabolisme de la sérotonine et des catéchomamines explorés dans cette étude. En rouge : voie de synthèse de la sérotonine. En bleu : catabolisme de la sérotonine. En vert : catabolisme de la noradrénaline. Les métabolites dosés sont en gras. TPH : tryptophane hydroxylase, AADC : aminoacide décarboxylase, MAO : monoamine oxydase, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, 5-HIAA : acide 5-hydroxyindolacétique, PST : phénol-sulfotransférase, DHPG : dihydroxyphénylglycol, COMT : catéchol-O-méthyltransférase, VMA : acide vanylmandélique.

intestinal est en effet la principale source de sérotonine de l'organisme. La sérotonine sanguine, localisée à 90% dans les plaquettes et augmentée dans les TSA, est pour l'essentiel d'origine gastro-intestinale, puisque les plaquettes ne synthétisent pas de sérotonine mais captent activement la sérotonine plasmatique, et puisque la sérotonine ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique (cf annexe 2 : Hercend et al, 2012). En outre, les tissus gastro-intestinaux permettent d'explorer des enzymes non exprimées dans les cellules sanguines et donc inaccessibles en périphérie, comme les enzymes de synthèse de la sérotonine (TPH et AADC) et la MAO-A.

1.1. Méthodes

1.1.1. Patients, prélèvements sanguins, tissus post mortem

Les patients, leurs apparentés au premier degré et les témoins ont été inclus et prélevés selon les critères et modalités décrits au paragraphe 2.1.2 (infra). Les tissus post mortem sont décrits au paragraphe 2.1.8. Le tableau 1.1 indique les effectifs étudiés pour chaque paramètre.

Paramètre biochimique	Matériel biologique	n témoins	n patients avec TSA	n parents	n frères et sœurs non atteints
Activité TPH	Iléon	11	13	/	/
Activité AADC					
Sérotonine					
5-HIAA					
Activité MAO-A	Plasma	45	32	49	14
Trp total					
Trp libre					
Kynurénine					
Noradrénaline					
DHPG	Sang total	270	241	377	129
Sérotonine					
5-HIAA	Plasma	98	82	138	56
Activité COMT	Erythrocytes				
Activité PST	Plaquettes sanguines				

Tableau 1.1. Récapitulatif des paramètres investigués et des effectifs.

1.1.2. Dosages biochimiques.

La sérotonine et le 5-HIAA ont été dosés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans le service de Biochimie de l'Hôpital Lariboisière (Jacques Callebert), selon la méthode décrite par Kema et al. (1993).

Le tryptophane total et le tryptophane libre (séparé par microdialyse), la kynurénine, la noradrénaline et le DHPG plasmatiques ont été dosés par HPLC dans le service de Biochimie de l'Hôpital André Mignot (Odile Varoquaux), selon les méthodes décrites par Maneglier et al. (2004) et Berlin et al. (1995).

Les activités enzymatiques tissulaires de la TPH, de l'AADC, et de la MAO (en utilisant un substrat spécifique de la MAO-A, la [¹⁴C]-5-HT créatinine sulfate) ainsi que l'activité PST plaquettaire (en utilisant comme substrat de la sérotonine) ont été dosées par radioenzymologie, selon des méthodes décrites (Launay et al., 2009, Launay et al., 1984). L'activité COMT érythrocytaire a été dosée par fluorimétrie, selon la méthode décrite par Dingemans et al. (2000). Les dosages ont été réalisés dans le service de Biochimie de l'Hôpital Lariboisière (Jean-Marie Launay).

1.2. Hypersérotoninémie chez les patients avec TSA

Le dosage de la sérotonine sanguine confirme l'hypersérotoninémie périphérique décrite à de nombreuses reprises dans les TSA (figure 1.2). Si l'on prend pour seuil le 90^{ème} percentile des témoins (680 nM), 47% des patients avec TSA présentent une hypersérotoninémie.

Toutefois, les apparentés (parents et frères et sœurs non atteints) ne présentent pas de variations significatives des concentrations de sérotonine par rapport aux témoins. Ceci diffère des études précédentes, portant sur de plus petits effectifs, qui montraient une hypersérotoninémie également chez les parents (Kuperman et al., 1985, Abramson et al., 1989, Cook et al., 1990, Leventhal et al., 1990, Leboyer et al., 1999, Melke et al., 2008).

Les variations de la sérotonine sanguine en fonction de l'âge seront discutées plus loin

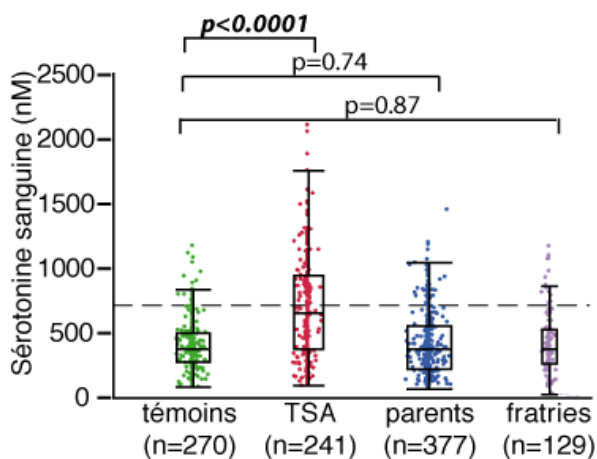


Figure 1.2. Dosage de la sérotonine sanguine chez les patients avec TSA et leurs apparentés. La ligne en pointillés correspond au 90^{ème} percentile des témoins (680 nM). Les rectangles indiquent la médiane et les quartiles. Chaque groupe a été comparé au groupe témoins par le test de Wilcoxon à deux échantillons. Les « fratries » désignent les frères et sœurs non atteints.

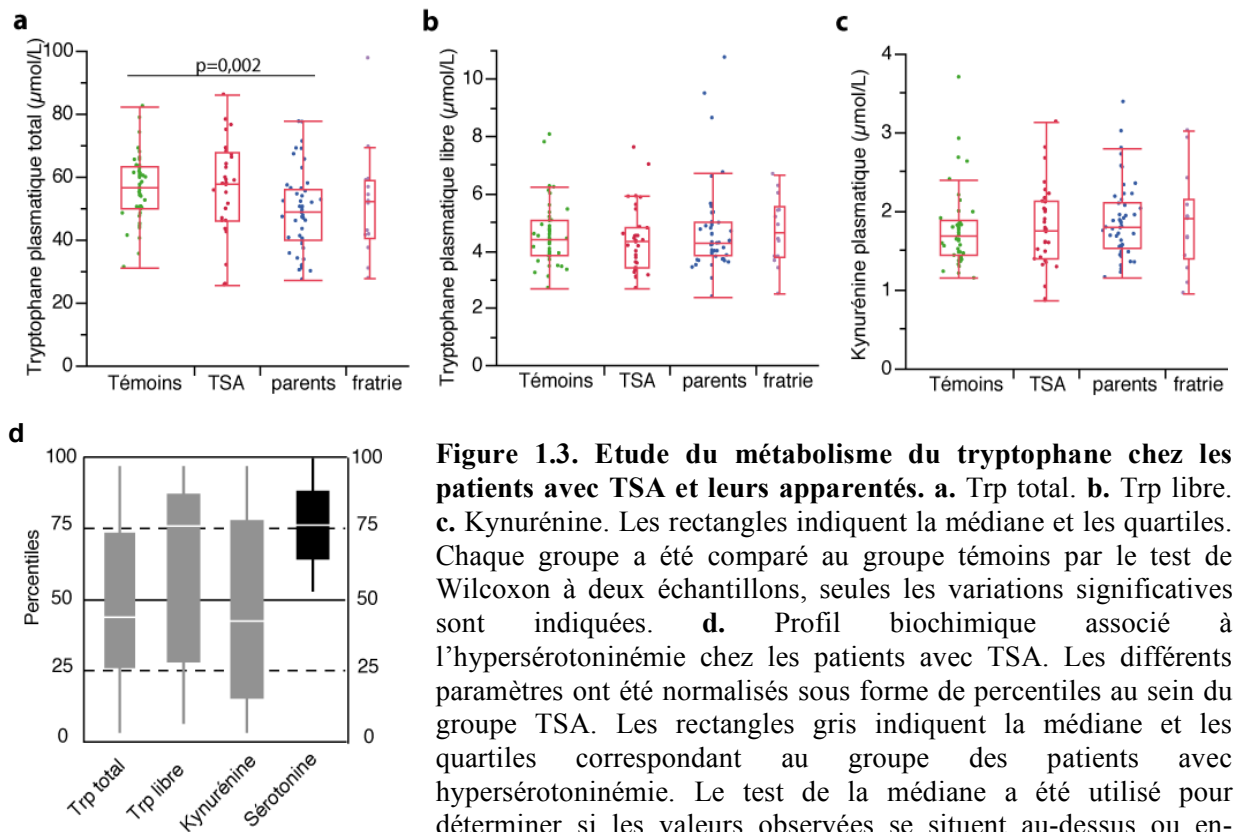


Figure 1.3. Étude du métabolisme du tryptophane chez les patients avec TSA et leurs apparentés. **a.** Trp total. **b.** Trp libre. **c.** Kynurénine. Les rectangles indiquent la médiane et les quartiles. Chaque groupe a été comparé au groupe témoins par le test de Wilcoxon à deux échantillons, seules les variations significatives sont indiquées. **d.** Profil biochimique associé à l’hypersérotoninémie chez les patients avec TSA. Les différents paramètres ont été normalisés sous forme de percentiles au sein du groupe TSA. Les rectangles gris indiquent la médiane et les quartiles correspondant au groupe des patients avec hypersérotoninémie. Le test de la médiane a été utilisé pour déterminer si les valeurs observées se situent au-dessus ou en-dessous du 50^{ème} percentile (non significatif).

(paragraphe 2.2.1).

1.3. Synthèse de la sérotonine

1.3.1. Métabolisme du tryptophane

Le dosage du Trp chez 32 patients avec TSA n’a pas mis en évidence d’anomalie, ce qui confirme les études antérieures. En revanche, une diminution significative de la concentration du Trp plasmatique est observée chez les parents des patients avec TSA (figure 1.3.a), qui concerne aussi bien les mères que les pères. Le Trp circule sous deux formes : une forme liée à l’albumine, et une forme libre, biologiquement active. Le dosage du Trp libre ne montre pas d’altérations chez les patients avec TSA ni chez leurs apparentés (figure 1.3.b). En outre, les concentrations de Trp total chez les patients avec hypersérotoninémie ne sont pas différentes de celles observées chez les patients sans hypersérotoninémie (figure 1.3.d). Une tendance non significative à l’augmentation du Trp libre semble associée à l’hypersérotoninémie, et serait à confirmer sur de plus grands effectifs. En outre, la concentration de Trp libre semble varier avec l’âge dans le

groupe témoin (plus élevé chez les enfants que chez les adultes), mais les effectifs étudiés ici ne sont pas suffisants pour stratifier les analyses par classe d'âge.

La voie des kynurénines constitue un métabolisme quantitativement majeur du Trp, puisque 80% du Trp non utilisé pour la synthèse protéique est converti en kynurénines, et seulement 20% en sérotonine. Les kynurénines sont des composés biologiquement actifs, qui présentent des propriétés immunomodulatrices, et, pour certains composés, des propriétés neuroactives (voir pour revue Schwarcz et al. (2012)). La kynurénine, produite à partir du Trp sous l'effet des dioxygénases (TDO Trp dioxygénase TDO et IDO indolamine dioxygénase), est ensuite métabolisée pour former d'autres composés apparentés (kynuramine, acide kynurénique, 3-hydroxykynurénine...). Étant donné le rôle majeur des kynurénines dans le métabolisme du Trp et de la cellule (synthèse de NAD^+), et leurs fonctions biologiques potentiellement intéressantes dans le contexte des TSA, l'exploration de cette voie chez les patients avec TSA est pertinente. Toutefois, le dosage de la kynurénine chez les patients avec TSA n'a pas mis en évidence de variations significatives de ce composé comparativement aux témoins (figure 1.3.c), ce qui n'est pas en faveur d'altérations de cette voie dans les TSA.

1.3.2. Synthèse intestinale de la sérotonine

L'étude du métabolisme de la sérotonine dans des échantillons autoptiques d'iléons provenant de 13 patients avec TSA et de 11 témoins appariés pour l'âge et le sexe n'a pas permis de mettre en évidence une altération de la synthèse de sérotonine chez les patients : les taux de sérotonine tissulaire, de même que les activités TPH et AADC, ne sont pas différents entre les patients et les témoins (figure 1.4.a-c).

Ces données ne fournissent pas d'arguments en faveur d'une anomalie de la synthèse de la sérotonine dans les TSA.

1.4. Catabolismes de la sérotonine et de la noradrénaline

1.4.1. Catabolismes MAO-dépendants

Le dosage du 5-HIAA plasmatique, produit du catabolisme de la sérotonine par la MAO, chez 241 patients avec TSA montre une diminution significative par rapport au groupe témoins, chez les patients et chez leurs apparentés (figure 1.5.a). Paradoxalement, on s'attendrait à ce que l'hypersérotoninémie s'accompagne d'une élévation du 5-HIAA plasmatique, comme c'est le cas dans les syndromes carcinoïdes

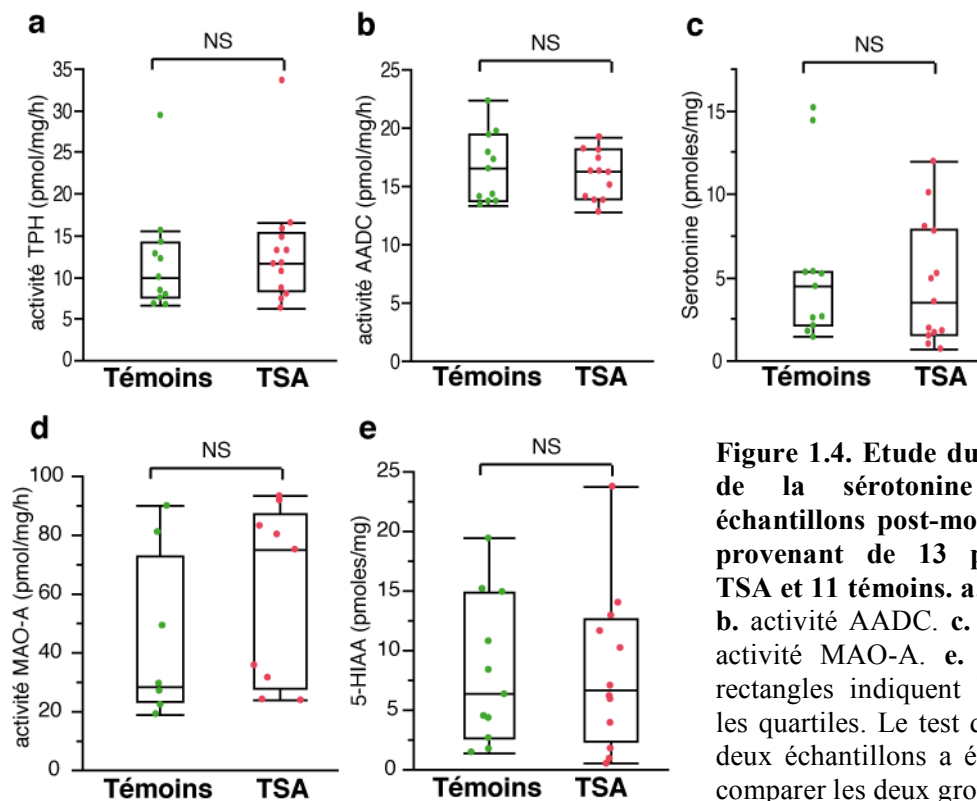
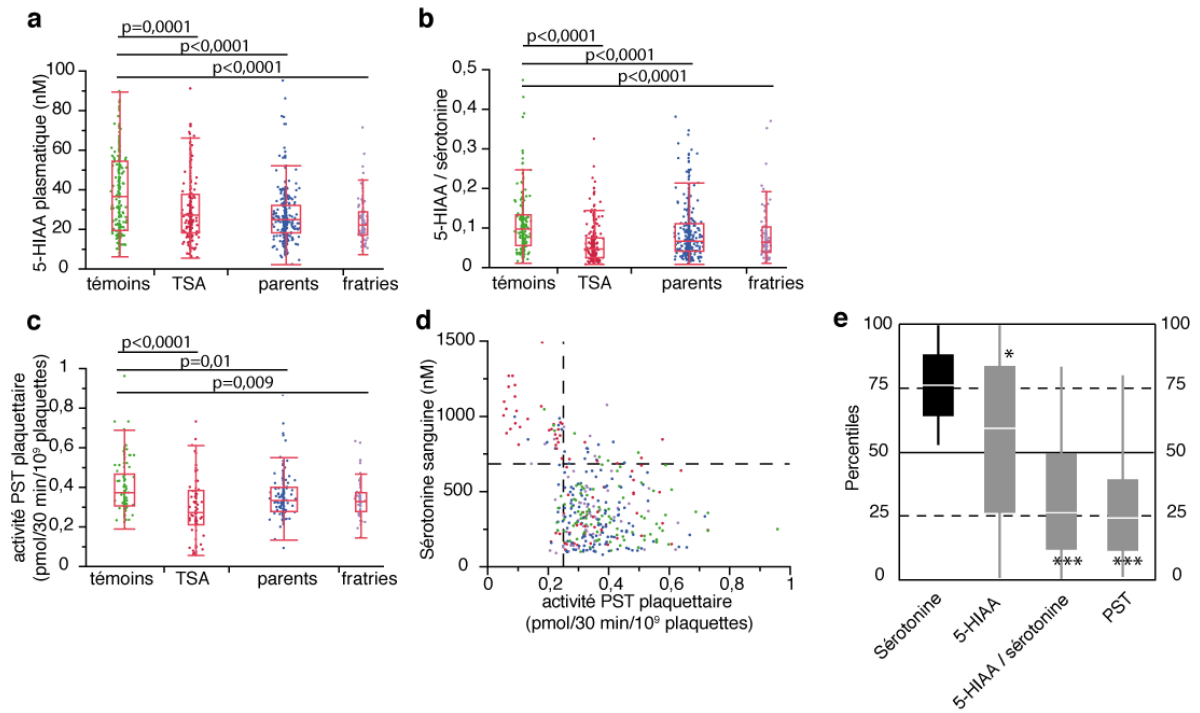


Figure 1.4. Étude du métabolisme de la sérotonine dans des échantillons post-mortem d'iléons provenant de 13 patients avec TSA et 11 témoins. a. activité TPH. b. activité AADC. c. sérotonine. d. activité MAO-A. e. 5-HIAA. Les rectangles indiquent la médiane et les quartiles. Le test de Wilcoxon à deux échantillons a été utilisé pour comparer les deux groupes.

(qui accompagnent les tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales sécrétant de la sérotonine). Si les patients présentent globalement une diminution du 5-HIAA, les taux mesurés chez les patients avec hypersérotoninémie sont légèrement augmentés comparativement aux patients sans hypersérotoninémie (figure 1.5.e), ce qui réplique des études antérieures (Hanley et al., 1977, Mulder et al., 2010). Toutefois l'amplitude de cette élévation est inférieure à celle attendue compte tenu de l'amplitude d'augmentation de la sérotonine. En conséquence de ce « découplage » de la sérotonine et du 5-HIAA, le ratio 5-HIAA/sérotonine, qui peut être considéré comme le reflet de l'activité MAO, est significativement diminué chez les patients avec TSA (figure 1.5.b), en particulier en cas d'hypersérotoninémie (figure 1.5.e), ce qui suggère une altération de l'activité MAO. Les concentrations de 5-HIAA et le ratio 5-HIAA/sérotonine semblent influencés par le sexe : ils sont significativement plus élevés chez les hommes que chez les femmes dans le groupe témoin. Toutefois, la réduction du 5-HIAA et du ratio 5-HIAA/sérotonine est observée chez les patients avec TSA quel que soit le sexe.

Il existe deux isoformes (A et B) de la MAO, codées par deux gènes contigus sur le chromosome X. La sérotonine et les catécholamines sont les substrats privilégiés de la MAO-A, tandis que la MAO-B métabolise principalement les monoamines exogènes. Seule la MAO-B est exprimée dans les cellules sanguines humaines. Les tissus gastro-

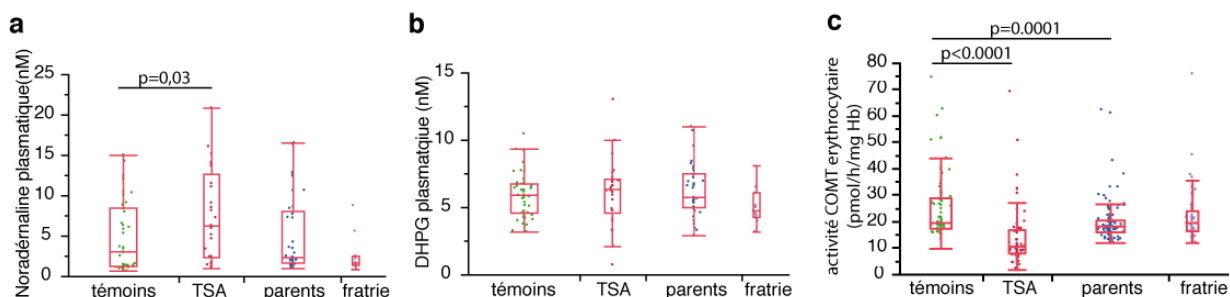
Figure 1.5. Etude du catabolisme de la sérotonine chez les patients avec TSA et leurs apparentés. **a.** 5-HIAA. **b.** ratio 5-HIAA/sérotonine. **c.** activité PST plaquettaire. **d.** corrélation avec la sérotonine. Les rectangles indiquent la médiane et les quartiles. Chaque groupe a été comparé au groupe témoins par le test de Wilcoxon à deux échantillons, seules les variations significatives sont indiquées. **e.** Profil biochimique associé à l'hypersérotoninémie chez les patients avec TSA. Les différents paramètres ont été normalisés sous forme de percentiles au sein du groupe TSA. Les rectangles gris indiquent la médiane et les quartiles correspondant au groupe des patients avec hypersérotoninémie. Le test de la médiane a été utilisé pour déterminer si les valeurs observées se situent au-dessus ou en-dessous du 50^{ème} percentile (* p<0.05 ; ***p<0.0001).



intestinaux donnent accès au dosage de l'activité MAO-A : celle-ci apparaît similaire chez les patients avec TSA et chez les témoins (et caractérisée par une importante variabilité interindividuelle). Le 5-HIAA tissulaire est également similaire dans les deux groupes (figure 1.4.d-e).

La MAO métabolise également d'autres monoamines, dont la noradrénaline. Les dosages réalisés chez 26 patients montrent une élévation de la noradrénaline plasmatique, ce qui réplique les résultats d'études antérieures (Lake et al., 1977, Launay et al., 1987). En revanche, le DHPG (dihydroxyphénylglycol), métabolite de la noradrénaline par la MAO, n'est pas augmenté (figure 1.6.a-b). On retrouve donc des anomalies parallèles des systèmes sérotonine/5-HIAA et noradrénaline/DHPG, qui peuvent suggérer une « saturabilité » anormale de la MAO chez les patients avec TSA.

Figure 1.6. Etude du catabolisme de la noradrénaline chez les patients avec TSA et leurs apparentés. a. Noradrénaline plasmatique. b. DHPG plasmatique. c. Activité COMT érythrocytaire. Les rectangles indiquent la médiane et les quartiles. Chaque groupe a été comparé au groupe témoins par le test de Wilcoxon à deux échantillons, seules les variations significatives sont indiquées.



1.4.2. Catabolisme COMT-dépendant

Le catabolisme des catécholamines (contrairement à la sérotonine) fait intervenir non seulement la MAO mais également la COMT (catéchol-O-méthyltransférase). L'action séquentielle de ces deux enzymes produit les catabolites majoritaires (acide vanylmandélique VMA dans le cas de la noradrénaline). De manière intéressante, le dosage de l'activité COMT dans les érythrocytes montre une diminution de cette activité chez les patients et leurs parents par rapport aux témoins (figure 1.6.c, l'absence de variation significative chez les frères et sœurs non atteints est probablement liée au plus faible effectif).

1.4.3. Sulfoconjugaison

Si la désamination oxydative par la MAO constitue la voie catabolique prépondérante de la sérotonine (et dans une moindre mesure des catécholamines), une fraction minoritaire subit une glucuro- ou une sulfo-conjugaison, catalysées par des enzymes largement répandues. Les enzymes qui catalysent la sulfo-conjugaison sont les phénol sulfotransférases (PST), exprimées notamment au niveau plaquettaire. Le dosage de l'activité PST plaquettaire chez 82 patients avec TSA met en évidence une diminution significative de cette activité par rapport au groupe témoin (figure 1.5.c). Si l'on prend pour seuil le 10^{ème} percentile des témoins (0,25 pmol/30 min/10⁹ plaquettes), 43% des patients avec TSA présentent un déficit de l'activité PST. L'hypersérotoninémie est fortement associée à ce déficit en PST (figures 1.5.d et 1.5.e), mais pas l'augmentation de la noradrénaline – ce qui apparaît paradoxal car les catécholamines sont fortement sulfoconjuguées.

1.5 Discussion : anomalies du catabolisme de la sérotonine et des monoamines dans les TSA

En dehors des TSA, les principales situations pathologiques associées à une hypersérotoninémie sont les tumeurs carcinoïdes et la trisomie 21. Dans le cas des tumeurs carcinoïdes, tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales sécrétant de la sérotonine, il s'agit alors d'une augmentation de la synthèse de sérotonine, associée, sur le plan clinique, à des troubles digestifs souvent majeurs (diarrhée), un flush cutané et une cardiopathie. Sur le plan biochimique, l'augmentation de la sérotonine sanguine s'accompagne d'une augmentation du 5-HIAA plasmatique et urinaire (également observée dans la trisomie 21) ; ces paramètres sont utilisés comme marqueurs diagnostiques.

Le contexte clinique et biochimique est très différent dans les TSA. La synthèse de sérotonine n'apparaît pas altérée. En revanche, les données présentées ici suggèrent que plusieurs anomalies du catabolisme de la sérotonine et des catécholamines sont associées aux TSA. L'hypersérotoninémie est associée à un déficit de l'activité PST plaquettaire (qui catalyse la sulfoconjugaion), non compensée par une augmentation du catabolisme par la MAO. Ces deux altérations, auxquelles s'ajoute une réduction de l'activité COMT, sont également susceptibles d'affecter le catabolisme des catécholamines. Ces données permettent de proposer pour la première fois un mécanisme biochimique à l'hypersérotoninémie observée dans les TSA, et suggèrent une altération générale du catabolisme des monoamines.

Les PST sont des enzymes cytoplasmiques, et la sérotonine sulfoconjuguée correspond au pool extragranulaire de sérotonine plaquettaire, quantitativement minoritaire par rapport à la sérotonine stockée dans les granules denses. Dans les plaquettes humaines normales, la sérotonine sulfoconjuguée représente environ 10% de la sérotonine totale (cf annexe 2 : Hercend et al, 2012). Il est plausible qu'un blocage de la sulfoconjugaion aboutisse à une perturbation significative de l'homéostasie des pools subcellulaires plaquettaires. Il existe 4 isoformes de PST (codées par 4 gènes *SULT1A1* à 4), qui diffèrent par leurs spécificités de substrats et leur expression tissulaire. Outre la sérotonine, les PST interviennent dans le métabolisme des catécholamines, des estrogènes, ou encore des xénobiotiques – un déficit de l'une ou de plusieurs des isoformes est donc susceptible d'affecter plusieurs systèmes physiologiques. Les PST ont notamment un rôle de détoxification des dérivés aromatiques hydroxylés,

générateurs de radicaux libres et de stress oxydant (Yasuda et al., 2007) – ce qui suggère un lien possible entre déficit en PST et stress oxydant dans les TSA. Des isoformes de PST sont exprimées dans le système nerveux central (Salman et al., 2009). Un déficit d'activité PST plaquettaire a été associé aux migraines alimentaires (Littlewood et al., 1982). Des anomalies ont également été rapportées dans des pathologies psychiatriques : augmentation chez les patients présentant des TOC ou des épisodes maniaques, diminution associée à la dépression (Marazziti et al., 1996). Bien que les PST ne semblent pas avoir été spécifiquement étudiées dans les TSA jusqu'à présent, des anomalies de la sulfoconjugaison du paracétamol (également de structure phénolique) ont été rapportées (Alberti et al., 1999).

Les mécanismes de cette diminution de l'activité PST restent à élucider. Une étude biochimique plus détaillée permettrait de déterminer si le déficit est spécifique ou s'il affecte plusieurs isoformes. Les gènes *SULT1A1* à 4 sont tous localisés au locus 16p11.2. Ce locus instable est fréquemment soumis à des réarrangements, et les CNV 16p11.2 sont parmi les plus fréquemment identifiés dans les TSA. En outre, il existe des polymorphismes codants non synonymes dans les gènes *SULT1A*, susceptibles de modifier l'activité des enzymes. L'étude de la sérotoninémie chez les patients porteurs d'un CNV 16p11.2, ainsi que la recherche d'associations entre les polymorphismes des gènes *SULT1A* et l'hypersérotoninémie, permettraient de déterminer le rôle de ces facteurs génétiques dans l'hypersérotoninémie des TSA.

Contrairement aux tumeurs carcinoïdes, l'hypersérotoninémie des TSA ne s'accompagne pas d'une augmentation du 5-HIAA. Ces résultats confirment plusieurs études antérieures (Hanley et al., 1977, Launay et al., 1988). On ne peut exclure que l'absence d'élévation des concentrations de 5-HIAA résulte de la compartimentation du métabolisme de la sérotonine : l'hypersérotoninémie des TSA semble localisée aux plaquettes sanguines, qui n'expriment pas la MAO-A, enzyme prépondérante dans le catabolisme des monoamines endogènes. Les plaquettes humaines n'expriment que la MAO-B, qui catabolise préférentiellement les monoamines exogènes. Toutefois, la dégradation des plaquettes au niveau splénique devrait s'accompagner d'un catabolisme de leur contenu, incluant la sérotonine, et donc d'une production de catabolites, incluant le 5-HIAA. En outre, un « découplage » similaire est observé entre la noradrénaline et le DHPG, ce qui évoque une anomalie de l'activité MAO. L'activité MAO-A mesurée dans les échantillons d'iléons des patients avec TSA est normale, et les concentrations

de 5-HIAA et de DHPG ne sont pas effondrés, ce qui n'est pas en faveur d'un déficit majeur. De même, l'activité MAO-B mesurée dans les plaquettes semble normale chez les patients avec TSA (Cohen et al., 1977, Launay et al., 1988). Toutefois, les mesures d'activités enzymatiques *in vitro* s'effectuent dans les conditions optimales d'activité enzymatique (concentrations de substrats, pH), qui ne sont pas nécessairement les conditions d'activité *in vivo*. Il est possible que les patients avec TSA présentent une diminution modérée ou une saturabilité anormale de la MAO *in vivo*. Une étude des paramètres cinétique de la MAO pourrait permettre de documenter des anomalies plus fines. L'hypersérotinémie pourrait donc résulter de deux anomalies combinées du catabolisme : un déficit de la sulfoconjugaison, combiné à une réduction de l'activité MAO, qui ne permet pas de compensation.

Sur le plan des mécanismes, des polymorphismes affectant l'expression du gène *MAO-A*, en particulier des variations de séquences répétées dans le promoteur, ont été proposés comme facteur modulateur du phénotype clinique des TSA (Cohen et al., 2003). Les corrélats biochimiques de ces polymorphismes n'ont pas été décrits, mais ils pourraient être associés à l'hypersérotinémie. Une autre hypothèse est que les anomalies mitochondriales décrites chez les patients avec TSA (Rossignol et Frye, 2012a) pourraient être associées à une diminution de l'activité MAO, l'enzyme étant associée à la membrane externe des mitochondries.

MAO et PST interviennent à la fois dans le catabolisme de la sérotonine et dans celui des catécholamines, ce qui implique que des anomalies de ces enzymes pourraient affecter ces deux systèmes neurochimiques. Une augmentation de la noradrénaline est retrouvée chez les patients avec TSA. Les dosages effectués ici ne reflètent probablement pas la concentration basale de noradrénaline, mais correspondent plutôt à un test dynamique : les catécholamines sont sécrétées en réaction au stress, et cette augmentation pourrait donc traduire une hyperréactivité biologique au stress généré par le prélèvement sanguin. Toutefois, l'augmentation de la noradrénaline peut également être le reflet de ce défaut de catabolisme. La diminution de l'activité COMT érythrocytaire constitue une troisième atteinte, apparemment indépendante, du métabolisme des monoamines. Tout comme les deux atteintes précédentes, le mécanisme en est inconnu. Une association d'un polymorphisme codant (G472A) du gène *COMT* avec le risque de TSA a été rapportée dans une étude gènes-candidats (James et al., 2006), mais n'a pas été retrouvée dans les études pangénomiques. Le gène

COMT est également l'un des gènes candidats au locus 22q11.2, qui présente des délétions récurrentes associées aux troubles neurodéveloppementaux, ce qui suggère que des anomalies de la *COMT* pourraient intervenir dans ces pathologies. Par ailleurs, une diminution de la 3-O-méthyl-DOPA (métabolite de la *COMT*), associée au polymorphisme V158M du gène *COMT*, a été mise en évidence chez des patients avec TOC (Delorme et al., 2010).

Globalement, ces données documentent des altérations multiples du catabolisme des monoamines. Les mécanismes de ces altérations, ainsi que leur impact au niveau du système nerveux central, restent à élucider.

Une troisième voie du métabolisme de la sérotonine, qui aboutit à la synthèse de la mélatonine, est également altérée dans les TSA.

2. EXPLORATION DES MECANISMES BIOCHIMIQUES ET GENETIQUES ET DES CONSEQUENCES DU DEFICIT EN MELATONINE OBSERVE DANS LES TSA

À la suite de l'étude précédente du laboratoire (Melke et al., 2008), nous avons poursuivi la caractérisation biochimique exhaustive de la voie de synthèse de la mélatonine, dans des prélèvements périphériques (sang, salive) issus d'une cohorte constituée d'environ 200 patients avec TSA, leurs apparentés au premier degré (parents, frères et sœurs) et de témoins. La voie de synthèse de la mélatonine a également été explorée dans des tissus post mortem issus de patients avec TSA et de témoins : la glande pinéale, source majeure de mélatonine de l'organisme, et le tractus gastro-intestinal (iléon), source périphérique mineure. Les mécanismes du déficit en mélatonine ont été étudiés par une approche gènes-candidats portant sur les gènes *AANAT* et *ASMT* : recherche de variants rares et études d'expression génique (dans des lignées issues des cellules sanguines de patients, et dans les échantillons de glandes pinéales). Enfin, les corrélats cliniques des anomalies biochimiques de la voie sérotonine-mélatonine ont été investigués.

Les sections décrivant les méthodes et les résultats sont constituées par une ébauche d'article, rédigée en Anglais pour publication.

Article : Characterization, mechanisms and consequences of the alterations of melatonin synthesis in Autism Spectrum Disorders (en préparation)

Cécile Pagan^{1,2,3}, Hany Goubran-Botros¹, Richard Delorme^{1,4,10}, Nathalie Lemièrè¹, Kerren Murray¹, Anne-Marie Le Sourd¹, Jacques Callebert^{2,3}, Didier Chevenne⁵, Fabien Fauchereau^{1,6}, Guillaume Huguet^{1,2}, Pauline Chaste^{1,4,10}, Frédérique Amsellem^{4,10}, Laurence Letellier^{4,10}, Laura Delacombe^{7,10}, Katia Le Dudal^{7,10}, Stéphane Jamain^{8,10}, Flavie Mathieu^{8,10}, Nita Ngo-Nguyen¹⁰, Hakim Laouamri¹⁰, Nicolas Torquet¹, Françoise Gray⁹, Marion Leboyer^{10,11}, Jean-Marie Launay*^{2,3,10} & Thomas Bourgeron*^{1,6,10}.

[title and authors list are not final]

* Corresponding authors. These authors contributed equally to this work.

¹ Human Genetics and Cognitive Functions, CNRS URA 2182 « Genes, synapses and Cognition », Institut Pasteur, 75015 Paris France.

² University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75005 Paris, France.

³ Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, APHP, 75010 Paris, France

⁴ Service de Psychiatrie de l'Enfant et de l'Adolescent, Hôpital Robert-Debré, APHP, 75019 Paris, France

⁵ Service de Biochimie-Hormonologie, Hôpital Robert-Debré, APHP, 75019 Paris, France

⁶ University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France.

⁷ Centre d'investigations cliniques, Hôpital Henri-Mondor, APHP, 94000 Créteil, France

⁸ INSERM U955, Psychiatrie génétique, 94000 Créteil, France

⁹ Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Lariboisière, APHP, 75010 Paris, France

¹⁰ Fondation FondaMental, 94000 Créteil, France

¹¹ Département de psychiatrie, Hôpital Henri-Mondor – Albert Chenevier, APHP, Université Paris Est, 94000 Créteil, France

2.1. Materials and methods

2.1.1. Ethics statement

This study was approved by the local Institutional Review Boards (IRB), namely, for France, the “Comité de Protection des Personnes Ile de France IV”, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, and “Comité de Protection des Personnes Ile de France IX”, Henri Mondor Hospital, Creteil, and for Sweden, the Sahlgrenska Academy of Ethics committee, University of Gothenburg. Written consents were obtained after oral and written information from all adult participants of the study, and from the children’s parents.

2.1.2. Subjects and clinical evaluations

Patients and their first-degree relatives, as well as controls, were recruited by the PARIS (Paris Autism Research International Sibpair) study at specialized centers in France and Sweden.

The Autism Diagnostic Interview-revised (ADI-R) and/or Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) were used for clinical evaluation and diagnosis of patients with ASD. Patients were included after a clinical and medical check-up with psychiatric and neuropsychological examination, standard karyotyping, fragile-X testing, and brain imaging and EEG whenever possible. Patients diagnosed with medical disorders, such as fragile X syndrome or chromosomal anomalies, were excluded from the study.

The controls were clinically evaluated by experienced clinicians and were free of neurodevelopmental disorders.

For 118 patients, additional detailed clinical evaluations were performed, including personal and familial general medical history, general psychiatric evaluation using the Diagnostic Interview for Genetic Studies (DIGS) for adults and Kiddie-Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia (K-SADS) for children, cognitive level evaluation using appropriate tests (WAIS-R, WISC-IV, WIPSI-R, Raven’s progressive matrices), sleep evaluation, and additional autistic symptoms evaluation using the Social Responsiveness Scale (SRS) (Constantino et al., 2000) and the Repetitive Behavior Scale (RBS) (Lam and Aman, 2007).

2.1.3. Blood samples and biochemical measurements in whole blood, plasma and platelets

Blood and platelet biochemical analyses were performed for at least 162 probands with ASD, their first-degree relatives, and at least 222 controls, in addition to the 43 patients, 34 parents and 48 controls previously published (Melke et al., 2008). Groups characteristics and details of sample sizes for each parameter are described in supplementary table 2.1.

Subjects were asked to avoid food with a high content of monoamines (including chocolate, bananas, nuts, citrus, cheese, tomatoes...) for the two days preceding blood sampling. The patients receiving a melatonin treatment were excluded from the study.

Blood samples were collected in the morning between 8:30 and 10:30, using ACD-A as an anticoagulant (1 vol to 9 vol of whole blood) (Vacutainer, Beckton-Dickinson). The procedure for blood collection and processing were designed to prevent platelet release reactions. Within two hours after collection, samples were fractioned by iterative centrifugation into whole blood, plasma, and platelet pellet aliquots. Aliquots were stored at -80°C.

Biochemical analyses were performed in the Biochemistry and Molecular Biology Department of Lariboisière Hospital. Whole blood serotonin and plasma 5-HIAA were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Kema et al., 1993). Plasma melatonin was measured using a radioimmunoassay (RK-MEL, Bühlmann, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. N-acetylserotonin, as well as enzyme activities of AANAT (EC 2.3.1.87) and ASMT (EC 2.1.1.4) were determined in platelet pellets by radioenzymology (Launay et al., 1984).

2.1.4. Saliva samples and biochemical measurements

The nyctohemeral cycles of melatonin and cortisol were determined for 69 patients with ASD, their first degree relatives (n=66 parents and 26 unaffected sibs) and 80 controls. The patients receiving a melatonin treatment were not included in the study.

Saliva collection was performed using Cortisol Salivette system (Sarstedt, Germany). Subjects were asked to collect several saliva samples throughout the day, at home, preferably on a non-working day. For 45 patients with ASD, 42 parents, 14 unaffected sibs and 80 controls, a seven-points schedule was planned as follows: at wake up time,

12:00, 16:00, 18:00, 20:00, 22:00, and at bed time (for subjects going to bed before 22:30, a single sampling was performed for 22:00 and bed time). For 24 patients with ASD, 24 parents and 12 unaffected sibs, a four-points schedule was planned as follows: at wake up time, 18:00, 20:00 and 22:00. Subjects were asked to report the exact time of each sampling. Samples were kept refrigerated at +4°C and brought to the investigation center within 3 days. They were centrifuged and stored at -80°C.

Saliva analyses were performed in the Biochemistry-Hormonology Department of Robert-Debré Hospital. Melatonin was measured using Non Extraction Melatonin Saliva ELISA assay (IBL, Germany) according to the manufacturer's instruction. Cortisol was measured using High Sensitivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay (Salimetrics, USA) according to the manufacturer's instructions.

The threshold for melatonin peak was set at 5 ng/L, consistently with previous reports (Burgess et al., 2008), with the concentrations measured for daytime samples, and with the analytical performances of the assay. Seventeen subjects (6 controls, 4 patients with ASD, 4 parents, 3 unaffected sibs) displayed inconsistent melatonin profile with moderately increased melatonin concentrations (5-15 ng/L) for at least two diurnal time points. They were considered to have blood contamination in saliva and were excluded from the study.

2.1.5. Sequencing of AANAT and ASMT

The 3 coding exons of *AANAT* were sequenced for 431 patients with ASD and 145 controls. Promoter B and the 9 coding exons of *ASMT* were sequenced for 132 patients with ASD and 50 controls.

Primers for exon amplification and sequencing, as well as PCR conditions, are listed in supplementary table 2.2. PCR amplifications were performed on 20–40 ng of genomic DNA template with HotStar Taq polymerase (Qiagen). The protocol used was 95°C for 15 min, followed by 35–40 cycles at 95°C for 30 sec, 55–62°C for 30 sec, 72°C for 30 sec to 90 sec, with a final cycle at 72°C for 10 min. PCR products were sequenced with BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (V3.1, Applied Biosystems, Life Technologies Inc., USA), followed by sequence analysis on 373A automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Life Technologies Inc., USA). Non-synonymous mutations were confirmed by sequencing an independent PCR product. The segregation of mutation within families was determined when DNA was available for relatives.

The nomenclature of genetic variations was determined according to the following reference protein sequences in Ensembl database: ENSP00000370627 (345 aminoacids) for ASMT, and ENSP00000376282 (207 aminoacids) for AANAT. Exon 6 of ASMT is a LINE insertion and yields an inactive form of the protein, thus it was sequenced for SNP genotyping, but rare variants were not taken into account as coding mutations.

The functional impact of each non-synonymous coding mutation was assessed both in silico using Polyphen2 algorithm (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and in vitro by targeted mutagenesis, as described previously (Goubran-Botros et al., 2012)

A meta-analysis of mutation frequencies was performed by searching Pubmed database for studies including mutation screening by direct sequencing of all exons of ASMT or AANAT, in patients with ASD and/or in controls, thus allowing the assessment of the global frequency of mutations in these genes in the populations considered. Results obtained by genotyping or partial sequencing were excluded.

In addition, for a population-scale assessment of the frequency of mutations, the Exome Variant Server database (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) was searched for non-synonymous, coding variants and essential splice-site variants.

2.1.6. Mapping and genotyping of ASMT CNV

The partial duplication of *ASMT* gene was first screened by MLPA as previously described (Cai et al., 2008). Four independent DNA samples positive for MLPA screening were then subjected to a genome walker experiment for CNV mapping, using Genome Walker Universal kit (Clontech, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, DNAs were submitted to digestion by restriction enzymes (EcoRV, PvuII, StuI, SspI ; one reaction for each enzyme and each DNA), followed by ligation of adapters. Nested PCRs were performed on the ligation products using the Advantage II Taq polymerase (Clontech, USA) with the provided adaptor primers, together with two pairs of gene-specific primers : one pair designed for the putative 5' end of the CNV (first primer: GGATCATTGAGGTCAGCAGTTTGAGA, nested primer: TGGGCGACAGAAGGAGACTCCATCTCA), and a second pair designed for the putative 3' end of the CNV (first primer: GGAGCTCTGGCTAAGGAATGCATGTCT, nested primer: GCAGCACTTCTCATTCCAGGAGGAAGAA). PCR products of unexpected sizes

were obtained after amplification with primers specific for the 3' end of the CNV. These PCR products were purified and sequenced to obtain the CNV breakpoint.

A specific genotyping test was designed according to the sequence of the CNV breakpoint. The test was made of two PCR reactions performed simultaneously, one CNV-specific and one control PCR. Primers and PCR conditions are listed in supplementary table 2.2. The test was performed on 20-40 ng of genomic DNA using Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen) with the following conditions: activation step at 95°C for 15 min, 35 cycles at 94°C for 30 sec, 66°C for 90 sec, 72°C for 90 sec, final extension step at 72°C for 10 min. The presence of PCR products was assessed by migration in 2% agarose gel.

The *ASMT* partial duplication was genotyped for 290 patients with ASD and 324 controls.

2.1.7. Lymphoblastoid cell lines cultures, RNA extraction and quantitative PCR

Quantification of *ASMT* mRNA in lymphoblastoid cell lines (BLCL) was performed for 105 patients with ASD and 78 controls, in addition to the 38 patients and 29 controls previously published (Melke et al., 2008). Quantification of *AANAT* mRNA was performed for 69 patients and 65 controls.

Lymphoblastoid cell lines were established from EBV-transformed lymphocytes and grown at 37°C in RPMI-1640 medium (Life Technologies Inc., USA) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 2.5 mM sodium pyruvate, 100 mg/mL streptomycin and 100 IU/mL penicillin, under standard conditions. Culture medium was replaced one day before harvesting the cells.

Total RNA was extracted using the Ambion TotallyRNA kit (Life Technologies Inc., USA). RNAs were DNase-treated with Ambion Turbo DNA-free kit (Life Technology Inc., USA) (4 IU DNase / 10 µg RNA).

For a first set of 96 samples from patients with ASD and 30 controls (including samples published in Melke et al. study), reverse transcription was performed from 5µg of RNA using SuperScript II (Life Technology Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. *ASMT* (as target) and *GAPDH* (as reference) mRNAs were quantified using commercially available TaqMan assays: Hs00187839_m1 and Hs99999905_m1,

respectively (Applied Biosystems, Life Technology Inc., USA). The mean of ΔCt values obtained for controls was used as a reference sample to calculate $\Delta\Delta\text{Ct}$.

A second set of 75 samples from patients with ASD and 75 controls, included samples from 50 subjects previously assessed in the first set. RNA quality was assessed using a Bioanalyzer platform with RNA Nano chips (Agilent Technologies, USA). RINs mean \pm sd was 9.8 ± 0.3 ; all RINs were >8 . Reverse transcription was performed with SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Life Technology Inc., USA)(2 μg RNA / 20 μL reaction), displaying better performances to detect low-expressed genes. *ASMT*, *AANAT*, *DDC* and *TPHI* were quantified as target genes using Hs00187839_m1, Hs01063208_g1, Hs01105042_m1 and Hs00188220_m1 TaqMan assays, respectively. GAPDH and ACTB were quantified as references using Hs99999905_m1 and Hs99999903_m1 TaqMan assays, respectively (Applied Biosystems, Life Technology Inc., USA). The mean of Ct obtained for GAPDH and ACTB was used as a reference to calculate ΔCt . The mean \pm sd of reference genes Ct was 19.2 ± 1.8 . Samples with mean reference Ct >22 were excluded from analyses. Ct >35 for target genes were excluded from analyses. The mean of ΔCt values obtained for controls was used as a reference sample to calculate $\Delta\Delta\text{Ct}$. The Relative Quantity (RQ) of each target gene to the mean of the control group was calculated as $\text{RQ}=2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$.

All samples were run in duplicate on 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technology Inc., USA). Samples with discordant duplicate values ($\Delta > 2$ Ct) were excluded.

For *ASMT* expression, data of $\Delta\Delta\text{Ct}$ obtained for the 50 samples assessed in both sets, with independent RNA extraction, displayed good correlation ($r^2=0.66$, $p<0.0001$, regression parameters: $y= -0,76 +0,88x$). Thus, both procedures were considered to yield comparable results, and *ASMT* $\Delta\Delta\text{Ct}$ from the 63 patients with ASD and 8 controls only assessed in the first set were pooled with data from the second set for the final sample size of 138 patients and 83 controls.

2.1.8. Autoptic tissue samples

13 ileum samples from patients with ASD and 11 from age- and sex- matched controls were assessed, as well as 9 pineal gland samples from patients with ASD and 22 from controls. Groups characteristics are described in supplementary table 2.3.

All ileum samples, 5 pineal glands samples from patients and 13 from controls were obtained from the NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders at the University of Maryland, Baltimore, MD, USA. Four pineal glands from patients with ASD were obtained from Autism Tissue Program – Autism Speaks, Princeton, NJ, USA. Nine pineal glands from controls were obtained from the Anatomy Department of JW Goethe Universität, Frankfurt, Germany (Pr Erik Maronde). Samples were frozen after autopsy and kept at -80°C.

Among the 13 patients with ASD from whom ileum samples were obtained, 8 had a diagnosis of autism, 1 had autism and severe intellectual disability, 1 had PDD-NOS, 3 were suspected autism cases, 1 was a suspected autism case with intellectual disability. For all samples, the presence of enterochromaffin cells (synthesizing serotonin and melatonin) was confirmed by immunohistology using an anti-chromogranin A antibody.

Among the 9 patients with ASD from whom pineal gland samples were obtained, 3 had a diagnosis of autism, 1 had 15q duplication syndrome, 1 had PDD-NOS, 3 were suspected autism cases, 1 was a suspected autism case with intellectual disability.

Biochemical analyses were performed after tissue disruption and homogenization with the methods described for blood investigation. In order to take into account the post mortem stability of the parameter investigated, the impact of post mortem interval (PMI) was assessed by linear regression (parameter measured = f(PMI)). For ileum samples, because there was no significant difference of PMI between patients and controls, the regressions were performed using all samples. For pineal gland samples, because PMI was significantly different between patients and controls, the regressions were performed using samples from the control group only, in order not to introduce a status bias. For parameters displaying correlation with PMI, a correction was applied as follows: parameter corrected = parameter measured x correlation coefficient. All figures present the raw (uncorrected) data. Analyses performed with corrected data are described in main text.

For pineal gland samples, total RNA was extracted and DNase-treated using miRNeasy kit (Qiagen). RNA quality was assessed using a Bioanalyzer platform with RNA Nano chips (Agilent Technologies, USA). RINs ranged from 4 to 8.3, with a median of 6.25 for both patient and control groups. Reverse transcription was performed with SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Life Technology Inc., USA)(2 µg RNA / 20 µL reaction). *ASMT* cDNA (exons 4 to 9) was amplified by PCR in order to confirm that

cDNA samples were suitable for amplification (as a second quality control), and to address the splicing status of the gene. Primers and PCR conditions are listed in supplementary table 2.2. Quantitative PCR was performed as described for lymphoblastoid cell lines. Three reference genes were used for this tissue (GAPDH, ACTB and POLR2A - Hs00172187_m1 TaqMan Assay); the median[range] of reference genes Ct was 22.4[21.4-24.6]. The medians[range] of ASMT and AANAT Ct were 21.5[20.2-24.4] and 18.8[16.1-23.1], respectively. For one sample from a patient, cDNA was not suitable for amplification and had AANAT and ASMT Ct>30. This sample was excluded from analyses.

For ileum samples, RNA quality was not sufficient to perform quantitative PCR.

2.1.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using JMP Pro 9 (SAS, USA) and Stata 11.0 (StataCorp LP, USA). The statistical tests used for this study were Wilcoxon two-sample test, Kruskal-Wallis test, Pearson's chi-square test, Fisher's exact test, linear regression, Student's t-test and one-way ANOVA. Because most biochemical parameters are not normally distributed, categorical and non-parametric statistical tests were preferred.

2.2. Biochemical characterization of the serotonin-melatonin pathway in patients with ASD

2.2.1. The serotonin-melatonin pathway in the blood of patients with ASD and their relatives

The entire serotonin-melatonin pathway, including serotonin, melatonin, the intermediate metabolite N-acetylserotonin, and the two enzymes AANAT and ASMT (figure 2.1.a), was assessed in the blood (whole blood, plasma, or platelets according to the parameters considered) of more than 193 patients with ASD, their first-degree relatives (at least 226 parents and 60 unaffected sibs) and a group of more than 222 controls (figure 2.1, exact sample sizes for each parameter are detailed in supplementary table 2.1). These data result from two phases of inclusions: one set published in our previous study (Melke et al) for serotonin, melatonin and platelet ASMT activity, and one independent, original set. A separate analysis of both phases was performed in supplementary figure 2.1. None of the biochemical parameters studied here was found

to be sex-dependent (data not shown), thus no systematic stratification by sex was performed. In contrast, most of these parameters are age-dependent, and analyses stratified by age are presented in supplementary figure 2.2.

As previously described in many studies in ASD, patients displayed elevated blood serotonin (figure 2.1b). Taking as a threshold the 90th percentile of the control group (680 nM), hyperserotonemia was observed in 47% of patients with ASD. Serotonin was not found to be significantly elevated in their first-degree relatives. Serotonemia is known to be age-dependent (Ritvo and Yuviler, 1975, Leboyer et al., 1998), with higher values observed in children. A non-significant trend for age-dependency was observed in this data set (Kruskall-Wallis test for age category $p=0.09$ in controls and $p=0.12$ in patients). When comparing patients and controls within age categories, hyperserotonemia remained significant for patients within all age groups (supplementary figure 2.2.a). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) antidepressants have been reported to decrease platelet serotonin content (Bismuth-Evenzal et al., 2012). In this study, SSRI-medicated patients displayed a slight but non-significant reduction of blood serotonin compared with SSRI-free patients. The other biochemical parameters were not affected by SSRI or other psychotropic drugs (data not shown).

In contrast, plasma melatonin was significantly decreased in patients with ASD and their relatives compared to controls (figure 2.1.d), consistently with our previous study (Melke et al., 2008). Taking as a threshold the 10th percentile of the control group (0.09 nM), melatonin deficit was observed in 63% of patients with ASD, 35% of their parents and 31% of sibs. The melatonin decrease was associated with significantly reduced activities of both enzymes involved in melatonin synthesis, AANAT and ASMT, measured in blood platelets (figure 2.1.e and f). Plasma melatonin and platelet ASMT activity, were age-dependent in the control group, with higher values in children, although this trend was not significant in the ASD group (supplementary figure 2.2.c and e)(Kruskall-Wallis test for effect of age category on plasma melatonin: $p=0.002$ in the control group, $p=0.12$ in the ASD group. Kruskall-Wallis test for effect of age category on platelet ASMT activity: $p=0.05$ in the control group, $p=0.14$ in the ASD group.). The decrease observed in ASD patients remained significant within all age

categories. AANAT activity displayed significant variations across age categories in the ASD group only, with lower values observed in adults (supplementary figure 2.2.d)(Kruskall-Wallis test for age category: $p=0.72$ in the control group, $p=0.02$ in the ASD group). Patients displayed significantly reduced AANAT activity in the adult group and the 12-17 years old group, but not in children below 12.

Melatonin was significantly correlated with ASMT activity in all status groups (figure 2.1.h), and the strongest correlation was observed for patients with ASD ($n=201$, linear regression: $r^2=0.57$, $p<0.0001$). Figure 2.2 displays a biochemical profiles approach: low melatonin in patients with ASD was significantly associated with lower platelet activities of both ASMT and AANAT (figure 2.2.a, patients with low melatonin)(Median test: $p<0.0001$ for ASMT activity, $p=0.008$ for AANAT activity). Figure 2.2.c shows the contour plots of plasma melatonin and ASMT and AANAT activities in platelets, for controls, patients with ASD, parents and unaffected sibs: plasma melatonin appeared to be mostly associated with ASMT activity in controls, patients and parents groups, as expressed by the color gradients following mainly the ASMT axis. However, in the ASD group (but not in the other groups), AANAT activity displays a significant correlation with ASMT activity (Spearman's $\rho=0.18$, $p=0.009$) and is also associated with melatonin levels. Among the patients with melatonin deficit (defined as plasma melatonin <0.09 nM), 93% had reduced platelet ASMT activity, and 43% had an associated reduction in AANAT activity (as defined by the 10th percentile of the control group: 3.1 pmoles/ 10^9 platelets/30 min for AANAT and 1.0 pmoles/ 10^9 platelets/30 min for ASMT activity). An isolated reduction in AANAT activity, without decrease of ASMT activity, was observed for 4% of patients with melatonin deficit (figure 2.2.d). Thus, melatonin deficit in ASD was strongly correlated with a reduction of ASMT activity, suggesting that ASMT activity is the main limiting factor for melatonin synthesis in ASD, though it is often associated with a reduction of AANAT activity.

N-acetylserotonin (NAS) is the product of AANAT and the substrate of ASMT. N-acetylserotonin, measured in blood platelets, was significantly elevated in patients with ASD and in their relatives compared to the control group (figure 2.1.c). Taking as a threshold the 90th percentile of the control group (37.3 nmol/ 10^9 platelets), NAS was elevated in 60% of patients, 29% of parents and 35% of unaffected sibs. NAS was

found to be age-dependent, with higher values observed in teenagers (12-17 years old) both for patients with ASD and for controls (Kruskall-Wallis test for effect of age category: $p=0.0009$ in the control group and $p=0.04$ in the ASD group). NAS was elevated in patients with ASD compared to controls in all age categories (supplementary figure 2.2.b). A significant correlation between NAS and ASMT activity in platelets was observed for all groups (figure 2.1.g), and particularly for patients with ASD (regression after log transformation of ASMT: $n=193$, $r^2=0.57$, $p<0.0001$). A profile analysis (figure 2.2.a, patients with high NAS) shows that elevated NAS in patients was associated with significantly lower platelet activities of both ASMT and AANAT (Median test: $p<0.0001$ for ASMT and $p=0.01$ for AANAT). The contour plots (figure 2.2.b) show that platelet NAS was associated with both ASMT and AANAT activities in patients with ASD. In the control group, the pattern appeared more complex, while in the parents and sibs groups, NAS seemed to be mostly determined by ASMT activity. Among the patients with elevated platelet NAS, 87% had reduced ASMT activity, and 44% had an associated reduction in AANAT activity. These data suggest that the accumulation of NAS observed in ASD results from a reduction of ASMT activity.

Thus, a large proportion (74%) of patients with ASD displayed reduced ASMT activity, associated with a decreased plasma melatonin and an increase in platelets NAS, and, in some cases, with a reduced AANAT activity (figure 2.2.a). Supplementary figure 2.3 recapitulates the frequencies of the different biochemical profiles observed in patients with ASD: the most frequently observed profiles associated low melatonin, low ASMT activity and high NAS (40% of patients), with or without increased serotonin or decreased AANAT activity. Only 6% of patients displayed a totally normal biochemical profile for the serotonin-melatonin pathway.

The disruption of melatonin and NAS levels were shared with the first-degree relatives of patients. Decreased plasma melatonin as well as increased platelet NAS were found more frequently in mothers than in fathers of patients with ASD (Low melatonin: 45% of mothers, 29% of fathers, Pearson's chi-square: $p=0.004$. High NAS: 36% of mothers, 21% of fathers, $p=0.01$). However, decreased plasma melatonin in parents was not significantly associated with decreased plasma melatonin in patients, as indicated by logistic regression analyses (logistic regression taking melatonin category of the patient as a dependent variable: $p=0.49$ for the effect of low melatonin in the father, $p=0.96$ for

the effect of low melatonin in the mother, $p=0.34$ for interaction. Logistic regression taking NAS category of the patient as a dependent variable: $p=0.13$ for the effect of high NAS in the father, $p=0.45$ for the effect of high NAS in the mother, $p=0.94$ for interaction). These data suggest that melatonin deficit and NAS accumulation in patients with ASD have a complex inheritance and/or a non-inherited component. The high frequency of melatonin deficit observed in parents, especially in mothers, also suggests that this deficit may be in itself a risk factor of having a child with ASD.

As in many previous studies, hyperserotonemia was observed in patients with ASD. However, it was not observed in the first-degree relatives of patients (fathers, mothers and unaffected sibs), in contrast to our previous reports (Leboyer et al. 1999, Melke et al, 2008). Blood serotonin was reported to be a highly inherited trait (Abney et al., 2001). These results suggest that the determinism of serotonin level in ASD relies on different mechanisms than in the general population. As for melatonin deficit, hyperserotonemia in ASD may also have a complex inheritance and/or a non-inherited component.

Furthermore, although serotonin and melatonin belong to the same biochemical pathway, no significant association was observed between high serotonin and alterations of platelet AANAT or ASMT activities, or NAS levels (figure 2.2.a). An isolated association was observed between hyperserotonemia and decreased melatonin. These results suggest that alterations of the melatonin synthesis pathway observed in ASD are not sufficient to cause serotonin accumulation. This is consistent with the fact that melatonin synthesis represents only a small minority (about 1%) of serotonin catabolism.

2.2.2. The serotonin-melatonin pathway in autaptic ileum samples and pineal glands from patients with ASD

Blood samples allow the investigation of a large number of individuals. However, blood platelets are only a very minor source of melatonin. Thus, we extended our study to other tissues, in order to address if the disturbances of melatonin synthesis observed in platelets of patients with ASD were also observed in the major sources of serotonin and melatonin. The gastro-intestinal tract was chosen as the main source of serotonin and a secondary source of melatonin, and the pineal gland as the main source of melatonin.

Thirteen autoptic samples of ileum were obtained from patients with ASD and compared with eleven samples from age- and sex-matched controls (figure 2.3). The patient and control groups characteristics are described in supplementary table 2.3. Samples were investigated for the whole serotonin-melatonin pathway, including both serotonin and melatonin synthesis enzymes activities. Because tissue conservation is a critical issue for autoptic samples, and especially for gastro-intestinal tissues, the conservation state of samples and the presence of enterochromaffin cells (synthesizing serotonin and melatonin) was confirmed by immunohistochemistry using an anti-chromogranin A antibody as a marker of enterochromaffin cells. Supplementary figure 2.4 shows examples of immunohistological staining. Enterochromaffin cells were detectable in all samples, including those displaying altered histological structure.

No difference was observed between patients with ASD and controls for the serotonin content of ileum samples, nor for the serotonin synthesis enzyme activities, tryptophan hydroxylase (TPH) and aromatic aminoacid decarboxylase (AADC) (figure 2.3.b-d). The serotonin content of tissues was positively correlated with TPH activity (Spearman's $\rho=0.45$, $p=0.02$).

Consistently with the results obtained in blood platelets, the melatonin content of ileum samples was decreased in patients with ASD compared with controls (median[quartiles]: 143 [120-155] fmoles/mg for controls, 109 [101-124] fmoles/mg in patients, Wilcoxon two-sample test: $p=0.02$)(figure 2.3.f). Nine out of 13 samples from patients had melatonin content within the first quartile of the control samples. Reduced melatonin was correlated with a decrease in the activities of both melatonin synthesis enzymes, AANAT (median[quartiles]: 4.8 [3.9-5.1] pmoles/mg/h for controls, 3.8 [3.3-4.2] pmoles/mg/h in patients, Wilcoxon two-sample test: $p=0.009$) and ASMT (median[quartiles]: 1.2 [0.9-1.5] pmoles/mg/h for controls, 0.7 [0.6-0.9] pmoles/mg/h in patients, Wilcoxon two-sample test: $p=0.02$)(figure 2.3.g and j). Melatonin and AANAT activity were negatively correlated with post mortem interval (PMI)($r^2=0.14$, slope=1.22 fmoles/mg/h post mortem, $p=0.07$ for melatonin and $r^2=0.22$, slope=0.36 pmoles/mg/h /h post mortem, $p=0.02$ for AANAT), but the difference between patients and controls remained significant after correction for PMI ($p=0.01$ and $p=0.005$, resp.). As observed with blood data, melatonin was strongly correlated with ASMT activity (linear regression: $r^2=0.89$, $p<0.0001$)(figure 2.3.l), a finding consistent with the fact that

ASMT activity is lower in this tissue than AANAT activity and is thus likely to be the limiting factor for melatonin synthesis. A significant correlation was also observed between melatonin and AANAT activity, which is likely due to the fact that AANAT and ASMT activities within samples are correlated (linear regression: $r^2=0.42$, $p=0.0006$). The contour plot of melatonin, AANAT and ASMT activities (figure 2.3.n) confirms that ASMT activity appears as the main factor determining melatonin content in ileum samples.

N-acetylserotonin was increased in ileum samples of patients with ASD compared with controls (median[quartiles]: 0.015 [0.011-0.035] fmoles/mg for controls, 0.058 [0.027-0.080] fmoles/mg in patients, Wilcoxon two-sample test: $p=0.02$)(figure 2.3.e), and strongly correlated with ASMT activity (regression after log transformation of NAS: $r^2=0.84$, $p<0.0001$)(figure 2.3.k), as observed in blood platelets. As for melatonin, a significant correlation was also observed between NAS and AANAT activity (figure 2.3.h), which is, again, probably a consequence of the correlation between AANAT and ASMT activities (figure 2.3.m).

Thus, consistently with our findings in plasma and blood platelets, melatonin was decreased in autaptic ileum samples from patients with ASD, and associated with a decrease of both AANAT and ASMT enzyme activities and with an accumulation of N-acetylserotonin. In contrast, no alteration of serotonin level and synthesis was observed.

Nine autaptic pineal glands were obtained from patients with ASD and compared with twenty-two pineal glands controls (figure 2.4). Patient and control groups characteristics are described in supplementary table 2.3.

The serotonin content of pineal glands was decreased in patients with ASD compared to controls. However, serotonin would tend to be negatively correlated with PMI ($r^2=0.14$, slope=7.9 pmoles/mg/h post mortem, $p=0.09$), and no significant difference was observed between patients and controls after correction for PMI. Serotonin levels, and serotonin synthesis enzymes (TPH, AADC) were not influenced by time of death (figure 2.4.b-c). Consistently with our findings in the gastro-intestinal tract, no difference was observed between patients and controls for TPH and AADC activities.

The melatonin and NAS content of pineal glands as well as AANAT and ASMT activities were strongly associated with time of death, with higher values observed in

subjects deceased at night than in subjects deceased during the day, although some phase differences were observed between these four parameters (Figure 2.4.d,e,f,i). Overall, melatonin, ASMT and AANAT activities were decreased in patients with ASD as compared to controls (Melatonin, median[quartiles]: 0.54 [0.34-1.17] pmoles/mg/h for controls, 0.17 [0.06-0.28] pmoles/mg in patients, Wilcoxon two-sample test: $p=0.0008$, AANAT activity: 24 [6-35] pmoles/mg/h for controls, 7 [3-9] pmoles/mg/h in patients, Wilcoxon two-sample test: $p=0.03$. ASMT activity: 205 [174-369] pmoles/mg/h for controls, 51 [17-90] pmoles/mg/h in patients, Wilcoxon two-sample test: $p=0.0003$). All pineal glands from patients but one had a melatonin content within the first quartile of the pineal glands from controls (figure 2.4.e).

The melatonin content of pineal glands was significantly correlated with both AANAT and ASMT activities (figure 2.4.f-i)(linear regressions: $r^2=0.56$, $p<0.0001$ for AANAT and $r^2=0.46$, $p<0.0001$ for ASMT). Figure 2.4.n shows the contour plot of melatonin, ASMT and AANAT activities: the determinism of melatonin levels appears more complex in the pineal gland than in peripheral tissues. Thus, in contrast with the results obtained in peripheral tissues, ASMT activity does not seem to be the main limiting factor of melatonin synthesis in the pineal gland, and the activities of both enzymes determine melatonin level. This is consistent with the fact that, unlike in peripheral tissues, ASMT activity is much higher than AANAT activity in pineal glands. Furthermore, considering the phase differences in the circadian variations of enzyme activities, it is likely that one or the other enzyme will be the limiting factor depending on the time of the day.

N-acetylserotonin was not increased in the pineal glands of patients with ASD, in contrast to our findings in peripheral tissues. NAS was negatively correlated with PMI ($r^2=0.20$, slope=3.6 fmoles/mg/h post mortem, $p=0.04$); no difference was observed between patients and controls after correction for PMI. In contrast with data from peripheral tissues, NAS was not correlated with ASMT activity, but with AANAT activity, although with a complex pattern as observed for melatonin (figure 2.4.g,j,l). The best fit was obtained between NAS and the ASMT/AANAT ratio of activities (figure 2.4.m), suggesting that NAS level in the pineal gland is determined by the ratio of its degradation (by ASMT) and synthesis (by AANAT)(linear regression after log transformation of NAS: $r^2=0.51$, $p<0.0001$). Because both AANAT and ASMT activities are decreased in the pineal glands of patients with ASD, this ratio is not

modified. Therefore, the absence of accumulation of NAS observed in the pineal gland of patients with ASD, in contrast with the results obtained in peripheral tissues, is related to the stoichiometry of AANAT and ASMT enzymes in this tissue.

Thus, as in peripheral tissues, melatonin was decreased in the pineal gland of 8 out of 9 patients with ASD. This decrease was associated with a reduction of both AANAT and ASMT activities. No increase was observed for serotonin or N-acetylserotonin.

These data from autaptic tissues support the hypothesis of a disruption of melatonin synthesis associated with ASD, affecting both ASMT and AANAT enzymes. No alteration of tissue serotonin levels was associated with melatonin deficit.

2.2.3. Exploration of the nyctohemeral cycles of melatonin and cortisol of patients with ASD and their relatives.

Blood and tissue investigations suggest that ASD is frequently associated with abnormal melatonin synthesis. Since melatonin secretion displays strong circadian variations, we assessed if the circadian phase of melatonin secretion was disrupted in patients with ASD and their relatives. The nyctohemeral cycle of melatonin was assessed from saliva samples collected at seven time points throughout the day, from wake time to bed time, for 69 patients with ASD, their first-degree relatives (n=66 parents and 27 unaffected sibs) and 81 controls. The nyctohemeral cycle of cortisol was also determined from the same samples, as an additional circadian marker.

No major phase disruption of melatonin secretion, such as phase inversion, was observed in patients: one male control and one male unaffected sib, but no patient with ASD, displayed diurnal melatonin peak (maximum values of 173 and 55 ng/L, respectively, observed at 12:00).

Because the amount and phase of melatonin secretion vary with age (with earlier and higher peaks observed in children), the detailed analyses of melatonin nyctohemeral cycle were stratified in two age categories (adults and children, defined below 17 years old).

Overall, 60% of adult patients and 67% of child patients had a detectable saliva melatonin peak, either in the morning or in the evening, considering a peak threshold of

5 ng/L (table 2.1). These proportions were not significantly different from the control groups (61% and 72%, resp.). In contrast, only 40% of parents of patients with ASD had a detectable melatonin peak, which is significantly less than adult controls (Pearson's chi-square, $p=0.04$).

Considering melatonin onset in the evening, a trend for earlier phase was observed in adult patients, with 5 patients out of 54 (10%) displaying melatonin onset before 20:00, vs no adult control (Fisher's exact test, $p=0.10$)(table 2.1). Consistently with this finding, saliva melatonin at 20:00 was higher in patients than in controls (median[quartiles]: 1.8 [0.9-3.0] ng/L for controls, 3.2 [2.0-5.7] ng/L for patients, Wilcoxon two-sample test, $p=0.005$)(figure 2.5.a). However, most adult patients and controls (67% and 72%, resp) had no detectable melatonin peak at 22:00 or at bedtime (55% and 60%, resp), suggesting a late onset. In child patients, no difference in melatonin secretion phase was observed in the evening, although this may reflect a lack of statistical power due to small sample sizes. No differences were observed either between parents and controls or between sibs and controls.

At wake up, 39% of adult patients still had saliva melatonin above 5 ng/L, a proportion similar to adult controls (43%). In contrast, saliva melatonin measured in child patients would tend to be lower than for controls (median[quartiles]: 4.0 [1.1-10.4] ng/L for controls, 2.0 [0.5-3.6] ng/L for patients, Wilcoxon two-sample test, $p=0.10$)(figure 2.5.b). Only one child patient (7%) displayed saliva melatonin above 5 ng/L at wake up, a proportion significantly lower than for child controls (46%, Fisher's exact test: $p=0.01$). A similar trend was observed for parents.

Finally, a minor but significant increase of daytime melatonin baseline was observed in adult patients: patients displayed higher saliva melatonin than adult controls for the 12:00 sample (median[quartiles]: 1.0 [0.5-1.8] ng/L for controls, 1.4 [1.1-3.1] ng/L for patients, Wilcoxon two-sample test, $p=0.009$). A similar trend was observed for the 16:00 sample (figure 2.5.a). This finding appears as a discrepancy with the lower daytime melatonin levels observed in plasma. However, ELISA assays for melatonin have poor analytical performances for low ranges of concentrations, such as those measured for daytime saliva melatonin levels. This approach is likely to be inadequate for detecting variations within this range.

Considering the nyctohemeral cycle of cortisol, no difference was observed between patients and controls for the morning peak. Patients with ASD and their parents would tend to display higher cortisol levels in the evening (figure 2.5.c), which could reflect a minor circadian disturbance and/or higher stress levels.

Thus, no major disruption of the nyctohemeral cycles of melatonin and cortisol was found in patients with ASD and their relatives, based on saliva samples. Minor circadian alterations were observed, including a trend to phase advance in some adult patients, a trend to earlier melatonin offset in child patients and parents, and increased cortisol levels in the evening in patients and parents. Overall, although our protocol did not allow the assessment of late melatonin onsets, a melatonin peak was detectable in about 2/3 of patients and controls.

2.3. Exploration of the mechanisms of melatonin deficit observed in ASD

2.3.1. Genetic study of melatonin synthesis enzymes

In order to investigate the mechanisms of ASMT and AANAT activity reduction observed in ASD, a mutation screening of *AANAT* and *ASMT* genes was performed by direct sequencing of all coding exons of the genes. The data generated for this study were analyzed together with previously published sequencing data (Melke et al., 2008, Chaste et al., 2011, Johnson et al., 2010, Pagan et al., 2011), allowing an assessment of variants frequency for 350 controls and 431 patients with ASD sequenced for *AANAT*, and 490 controls and 491 patients with ASD sequenced for *ASMT* (table 2.2). These results were interpreted in light of the data available on the Exome Variant Server (EVS) database, as an indication of the frequency of variants based on population-scale sequencing (n=3501 European-Americans and 1866 African-Americans)(supplementary table 2.4), and on dbSNP database.

Eight non-synonymous variants were identified for *AANAT*, five of which were shown to reduce enzyme activity *in vitro* and/or predicted *in silico* to be damaging. All mutations were heterozygous, and all those for which transmission could be assessed were inherited (6 cases from the father, 3 from the mother, with the remaining cases missing at least one parent). Two of them (A157V and G177D) were not referenced in the Exome Variant Server database. All variants had a minor allele frequency below

0.5%, except for T3M variant (rs61739395), which has a MAF of 5.5% in African-American population, and A163V variant (rs72466448), which has a MAF of 0.6% in European-American population. A small, non significant enrichment of total mutations and damaging mutations was observed in patients with ASD compared to controls based on direct sequencing data (Total mutations: 3% of patients with ASD vs 2.2% of controls, Fisher's exact test: $p=0.51$. Damaging mutations: 2.3% of patients with ASD vs 1.9% of controls, Fisher's exact test: $p=0.81$).

Fifteen non-synonymous variants (twelve of which were shown to reduce enzyme activity *in vitro* and/or predicted *in silico* to be damaging), one nonsense variant and one essential splice-site variant were identified for ASMT. All mutations were heterozygous, and all those for which transmission could be assessed were inherited (7 cases from the father, 7 from the mother). Five of them (E61Q, D210G, K219R, G278A, R291Q) were not referenced in the Exome Variant Server data. All variants had a minor allele frequency below 0.5%, except for V46M variant (rs145866337), which has a MAF of 2.8% in African-American population, K81E variant (rs141964565), which has a MAF of 1.2% in African-American population, and N17K variant (rs17149149), which has a MAF of 6.7% in Han Chinese population according to HapMap data. No significant enrichment of total mutations or damaging mutations was observed in patients with ASD compared to controls based on direct sequencing data (Total mutations: 2.9% of patients with ASD vs 2.2% of controls, Fisher's exact test: $p=0.69$. Damaging mutations: 2.4 patients with ASD vs 2.0% of controls, Fisher's exact test: $p=0.83$).

Thus, for all mutation categories (*AANAT/ASMT*, total/damaging), a small, non-significant enrichment of mutation frequency was observed in patients with ASD. The absence of significant difference may be a consequence of a lack of statistical power for such rare events. Indeed, when comparing our sequencing data in patients with ASD with population-scale data obtained from the Exome Variant Server database, the enrichment of mutation frequency observed in patients was significant for all mutation categories (supplementary table 5)(e.g. total damaging mutations: 4.7% in patients with ASD, 2.4% in EVS populations, $OR=2.0[1.3-3.2]$, Pearson's chi-square: $p=0.003$).

Overall, 4.7% of patients with ASD and 3.9% of sequenced controls had a damaging mutation in one of the two genes of melatonin synthesis enzymes ($OR=1.2[0.6-2.3]$,

Fisher's exact test: $p=0.56$). Thus, loss-of-function mutations in *AANAT* or *ASMT* may account for some cases of melatonin deficit associated with ASD, however it remains a minor mechanism.

Supplementary table 2.5 recapitulates the biochemistry data, clinical data and sleep disorders for the families carrying rare variants and investigated for blood biochemistry and/or sleep disorders. Consistently with our previous report (Melke et al., 2008), *ASMT* mutations were associated with reduced platelet *ASMT* activity in 3 out of 4 patients and in all relatives carrying the variants. In contrast, only one patient out of 9 carrying *AANAT* mutations (including 7 mutations predicted as damaging) displayed reduced platelet *AANAT* activity, suggesting that heterozygous *AANAT* mutations may not have a major impact in vivo, at least for peripheral, low-level enzyme expression. However, out of 9 patients carrying a variant in *AANAT* or *ASMT* and investigated for sleep disorders, 4 displayed sleep phase delay (2 patients with *AANAT* variants and 2 with *ASMT* variants), a proportion higher than observed in the whole cohort of patients (44% vs 16%) (see table 2.4 below). One of these patients was carrying both an *AANAT* T3M variant and the *ASMT* microduplication (see below).

In a previously published study, Cai et al. (2008) reported a microduplication spanning exon 1 to 7 of *ASMT* gene, identified by MLPA in 16 out of 222 patients with ASD (5.4%) and in 4 out of 248 controls (1.6%)($p=0.003$). Using a genome walker approach, we determined the breakpoint sequence of this microduplication and found that it forms a tandem structure, with its breakpoint located 0.7 kb downstream of exon 7 and 4.4 kb upstream of exon 1 of *ASMT* (supplementary figure 2.5.a).

We developed a PCR-based genotyping test for fast and specific detection of this microduplication. It was identified in 12 out of 290 patients with ASD (4.1%) and in 10 out of 324 controls (3.1%)(OR=1.4[0.6-3.2], Pearson's chi-square: $p=0.48$). The microduplication was inherited in all cases for which transmission could be assessed (3 cases from the father, 6 from the mother, 1 case with both parents carrier, the remaining cases missing at least one parent).

Thus, we do not replicate the finding of an enrichment of this microduplication of *ASMT* in patients with ASD, although larger sample sizes would be needed for a more

accurate assessment of its frequency. The genotyping assay used for this study is specific to this microduplication. Although it reduces the risk of false-positive results, it may fail to detect putative similar CNVs with a different breakpoint. However, the breakpoint sequence was confirmed to be identical in 17 independent samples carrying the duplication, suggesting that this microduplication displays little variability. Furthermore, the frequencies observed in this study are in the same range as those reported by Cai and coll., and even higher in controls. Thus, it is unlikely that different microduplication events, not detected with our assay, would significantly contribute to the findings of Cai and coll.

The functional impact of this microduplication on gene expression is unknown. Out of 9 patients carrying the microduplication and investigated for blood biochemistry, 7 displayed reduced platelet ASMT activity (supplementary table 2.5). However, our mapping study shows that the structure of the transcript located on the 3' side of the tandem duplication is preserved, as well as more than 4 kb of the upstream regulatory region (supplementary figure 2.5). Thus, the CNV may not have a major impact on *ASMT* gene expression.

Therefore, some rare genetic events such as damaging mutations in *AANAT* or *ASMT* could contribute, in a subset of patients, to the melatonin deficit associated with ASD (supplementary figure 2.5.b). However, the frequency of such events is much lower than the frequency of melatonin deficit itself, suggesting that other mechanisms are involved in this deficient melatonin synthesis.

2.3.2. Study of *AANAT* and *ASMT* gene expression

In order to determine if decreased *AANAT* and *ASMT* enzyme activities were associated with decreased gene expression, *AANAT* and *ASMT* mRNAs were quantified by quantitative PCR in two tissues, B lymphoblastoid cell lines (BLCL) and pineal glands (figure 2.6).

Lymphoblastoid cell lines from 138 patients with ASD and 83 controls were assessed for *ASMT* mRNA. A significant decrease was observed in patients with ASD (mean log RQ \pm sd: 0 ± 0.57 for controls, -0.59 ± 0.61 for patients with ASD, Student's t-test: $p < 0.0001$), and mRNA level was correlated with ASMT enzyme activity measured in BLCL ($r^2 = 0.31$, $p < 0.0001$) (figure 2.6.b). Furthermore, three SNPs located in *ASMT*

promoter (rs4446909, rs5989681 and rs6644635) were significantly associated with *ASMT* mRNA levels in BLCL. Because these SNPs are in linkage disequilibrium, figure 2.6.b shows the effect of one of them, rs5989681, which displayed the strongest association with *ASMT* mRNA, both in controls and in patients with ASD (one-way ANOVA: $p=0.008$ and $p=0.004$, respectively). Nevertheless, the promoter genotype was not sufficient to explain the difference observed between patients and controls for *ASMT* mRNA, and this difference remained significant regardless of the genotype (figure 2.6.b). Interestingly, these SNPs in *ASMT* promoter were previously reported to be associated with risk of ASD (Melke et al., 2008). However, these SNPs were not associated with decreased platelet *ASMT* enzyme activity or low plasma melatonin in patients with ASD.

In contrast, *AANAT* mRNA was not found to display significant variations in BLCL of patients with ASD compared with controls (mean log RQ \pm sd: 0 ± 0.59 for controls, 0.14 ± 0.44 for patients with ASD, Student's t-test: $p=0.12$). As for *ASMT*, *AANAT* mRNA was correlated with *AANAT* enzyme activity measured in BLCL (figure 2.6.a).

AANAT and *ASMT* mRNA were also assessed in the 30 pineal gland samples previously investigated for biochemistry. One sample from a patient with ASD was excluded from analyses because of inadequate RNA quality. In contrast to enzyme activities, no difference in *AANAT* or *ASMT* mRNA levels was observed between patients with ASD and controls (figure 2.6.c-d). Furthermore, mRNA levels were not correlated with enzyme activities, and did not display variations associated with time of death. These results suggest that the physiological, circadian regulation of *AANAT* and *ASMT* enzyme activities in the pineal gland does not involve transcriptional mechanisms, and that the reduction of enzymes activities observed in the pineal glands of patients with ASD do not result from abnormal *AANAT* and *ASMT* mRNA levels.

Thus, a reduction of *ASMT* mRNA level was observed in BLCL of patients with ASD and associated with *ASMT* promoter genotype, but this mechanism is not sufficient to explain the reduction of enzyme activities observed in platelets and in pineal glands of patients with ASD.

Three splicing isoforms have been described for *ASMT* gene : one active form yielding a 345 aa protein (ENSP00000370627 in Ensembl database), and two inactive forms, one

involving a deletion of exon 7 and one involving an insertion of a LINE sequence as exon 6 (yielding 298 aa ENSP00000370631 protein and 373 aa ENSP00000370639, respectively). Alterations of mRNA splicing have been described in ASD in a brain transcriptome study (Voineagu et al., 2011). The presence of the three ASMT isoforms in pineal glands from patients and controls was assessed by RT-PCR : the active form and the deleted form appeared to be the prominent isoforms in most samples. The LINE isoform was abundant in one sample from a patient and one from a control. Overall, no striking difference was observed between patients and controls for ASMT mRNA splicing (figure 2.6.e).

2.4. Clinical correlates of melatonin deficit

2.4.1. Diagnosis and autistic symptoms

The associations of biochemical alterations of the serotonin-melatonin pathway with major diagnosis of ASD (i.e. autism, Asperger syndrome and PDD-NOS), intellectual disability and autistic symptoms (assessed using ADI-R, Social Responsiveness Scale SRS and Repetitive Behavior Scale RBS) were addressed (table 2.3). Overall, biochemical alterations did not seem to have a significant impact on diagnosis, except for low platelet ASMT activity, which was associated with a higher frequency of autism diagnosis, and a lower frequency of Asperger syndrome diagnosis. Autism and Asperger syndrome are distinguished by impaired or normal language, respectively, and by normal intellectual abilities in Asperger syndrome. Consistent with this finding, patients with low platelet ASMT activity would tend to display higher scores for the communication items of ADI-R (C verbal and non verbal), although these associations did not reach significance. Low ASMT activity was not associated with a higher frequency of intellectual disability. In contrast, the increase of platelet NAS was significantly associated with normal cognitive level.

Considering autistic symptoms, hyperserotonemia appeared to be significantly associated with lower scores for the social interactions item (B) of ADI-R. A similar trend, although not significant and with small effect size and sample size, was observed with SRS scores, indicating that patients with hyperserotonemia may tend to display less social impairments than normoserotonemic patients. Low plasma melatonin was significantly associated with higher scores for the repetitive behavior item (D) of ADI-R, although with small effect size. However, this finding was not replicated with RBS

scores. RBS scores were available for a smaller number of patients, but this scale is likely to be more suitable for quantitative studies because designed as a quantitative score, in contrast to ADI-R.

2.4.2. Comorbidities and associated features

Sleep disorders (defined as insomnia, hypersomnia and/or phase delay) were reported in more than one half of patients (54%). Because melatonin is considered as a circadian synchronizer, the association between alterations of the serotonin-melatonin pathway and sleep disorders in ASD were assessed. Low platelet AANAT activity, as well as increased platelet NAS, were significantly more frequent in patients with ASD displaying sleep disorders, suggesting that altered melatonin synthesis is associated with sleep disorders in ASD (table 3.4).

In addition, melatonin alterations have been reported in several psychiatric disorders (Kennedy et al., 1996, Lewy, 2009, Wulff et al., 2012) and may thus be a transnosographic endophenotype. In line with this idea, the associations of alterations of the serotonin-melatonin pathway with psychiatric comorbidities reported in patients with ASD were investigated. No significant associations were found. Serotonin and melatonin have also been proposed to display anticonvulsivant properties (Bagdy et al., 2007, Solmaz et al., 2009), but no significant associations were observed between hyperserotonemia or impaired melatonin synthesis and epilepsy or abnormal EEG – although the statistical power is limited by the small sample size (n=19). In addition, serotonin and melatonin are both involved in gastro-intestinal physiology (Konturek et al., 2007, Lesurtel et al., 2008), but no association was found between digestive problems in patients with ASD and alterations of the serotonin-melatonin pathway (as for epilepsy, the statistical power is limited by small sample size - n=18).

Because NAS was reported to be a TrkB (the canonical BDNF receptor) agonist, and macrocephaly is a frequent feature in patients with ASD, one hypothesis was that an increase of NAS in patients with ASD might be associated with larger brain size as a result of TrkB activation. However, no association was observed between increased platelet NAS and large head (defined as head circumference above the 90th percentile for age). Platelet NAS is a peripheral marker and may not be an accurate indicator of central NAS levels; the NAS-macrocephaly hypothesis will require further investigations. In contrast, patients with large head displayed a significantly higher

frequency of melatonin deficit. In addition, patients with dysmorphic features would also tend to display a higher frequency of melatonin deficit as well as reduced platelet AANAT, although these associations did not reach statistical significance – probably because of a too small sample size.

Overall, some clinical correlates of alterations of the serotonin-melatonin pathway were identified, although the effect size is weak in most cases. Hyperserotonemia may be associated with less social impairments, and increased NAS with less intellectual disability. Reduced ASMT activity seems to be associated with communication impairment. Interestingly, decreased AANAT activity and increased NAS seem to be associated with sleep disorders. Finally, melatonin deficit might be associated with large head and with dysmorphic features. Surprisingly, biochemical parameters displaying strong correlations, such as NAS, ASMT activity and melatonin, seem to have distinct clinical correlates.

2.5. Acknowledgements

We thank the patients and their families, and the controls who accepted to participate in this study. We thank the Centres d'Investigations Cliniques, Hôpital Robert Debré and Hôpital Henri Mondor for obtaining and processing the samples, the Hematology departments (Dr MF. Hurtaud and Pr M. Imbert) for performing platelet counts. We thank the DNA and cell banks at Hôpital Pitié-Salpêtrière (C.Dussert) and INSERM U955 for managing DNA samples and cell lines, and the Institut Pasteur Génopole (C.Gouyette) for the use of sequencing facilities. We thank the Autism Tissue Programme and the Maryland Brain and Tissue Bank for providing tissue samples.

2.6. Figures

Figure 2.1: Exploration of the serotonin-melatonin pathway in the blood

of at least 193 patients with ASD, their first-degree relatives (at least 226 parents and 60 unaffected sibs), and at least 222 controls, sampled in the morning. Boxes indicate medians and quartiles. Dashed lines indicate the threshold of the 90th (for serotonin and N-acetylserotonin) or 10th (for ASMT, AANAT and melatonin) percentile of controls. The control group was compared to other groups using Wilcoxon two-sample test. **(a)** Overview of the serotonin-melatonin pathway. **(b)** Whole blood serotonin **(c)** Platelet N-acetylserotonin **(d)** Plasma melatonin **(e)** Platelet AANAT activity **(f)** Platelet ASMT activity. **(g)** Correlation between platelet N-acetylserotonin and ASMT activity (regression after log transformation of ASMT, n=579) **(h)** Correlation between plasma melatonin and platelet ASMT activity (regression after log transformation of melatonin and ASMT, n=641).

Figure 2.2: multivariate approach of blood biochemical data.

(a) Biochemical profiles associated with each disturbed parameter in patients with ASD (high blood serotonin, low platelet AANAT activity, high platelet NAS, low platelet ASMT activity, low plasma melatonin). All parameters were converted into percentiles for normalization (y axis). The median test was used to determine if the values observed are significantly above or below the 50th percentile of all patients (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). Red lines, grey boxes and grey bars indicate medians, quartiles, ranges, respectively. **(b)** Contour plots of platelet NAS (coded with grey color gradient), AANAT and ASMT activities in controls, probands with ASD, parents and unaffected sibs. **(c)** Contour plots of plasma melatonin (coded with grey color gradient) and platelet AANAT and ASMT activities in controls, probands with ASD, parents and unaffected sibs. **(d and e)** frequency and biochemical correlates of elevated platelet NAS and decreased plasma melatonin.

Supplementary Figure 2.1: Detail of the two phases of inclusions.

(a, b, c) Data previously published in Melke et al study, from 43 patients with ASD, 34 parents and 48 controls. **(d, e, f)** Independent data collected for this study from at least 162 patients with ASD, 215 parents and 222 controls. The control group was compared to other groups using Wilcoxon two-sample test. Boxes indicate medians and quartiles.

Supplementary Figure 2.2: effect of age on biochemical parameters and age-paired comparisons.

The ASD group was compared to the control group for each parameter and each age category (defined by three categories: children below 12 years old, 12-17 years old, adults) using Wilcoxon two-sample test. Kruskal-Wallis tests were performed to determine if each biochemical parameter was dependent on age. Boxes indicate medians and quartiles. **(a)** Whole blood serotonin did not display significant age-dependent variations ($p=0.09$ in controls, $p=0.12$ in patients with ASD) **(b)** platelet N-acetylserotonin was different across age categories in controls and patients ($p=0.0009$ in controls, $p=0.04$ in patients) **(c)** plasma melatonin was associated with age-dependent variations in controls ($p=0.002$) but the trend did not reach significance in patients ($p=0.12$). **(d)** Platelet AANAT activity was different across age categories in patients ($p=0.02$) but not in controls ($p=0.72$). **(e)** Platelet ASMT activity displayed age-dependent variations in controls ($p=0.05$) but the trend did not reach significance in patients ($p=0.14$).

Supplementary Figure 2.3: frequency of the various biochemical profiles observed in patients with ASD.

Figure 2.3: Characterization of the serotonin-melatonin pathway in autaptic ileum samples from 13 patients with ASD and 11 controls.

The ASD group was compared to the control group using Wilcoxon two-sample test. Boxes indicate medians and quartiles. **(a)** Example of chromogranin A immunostaining in one sample from a patient with ASD, confirming the presence of enterochromaffin cells. **(b)** Tryptophan hydroxylase (TPH) activity **(c)** Aminoacid decarboxylase (AADC) activity **(d)** Serotonin **(e)** N-acetylserotonin **(f)** Melatonin **(g)** AANAT activity **(h)** correlation between N-acetylserotonin and AANAT activity (regression after log transformation of NAS) **(i)** correlation between melatonin and AANAT activity **(j)** ASMT activity **(k)** correlation between NAS and ASMT activity (regression after log transformation of NAS) **(l)** correlation between melatonin and ASMT activity **(m)** contour plot of NAS, AANAT activity and ASMT activity in patient (red dots) and control (green dots) samples. **(n)** contour plot of melatonin, AANAT activity and ASMT activity in patient (red dots) and control (green dots) samples.

Supplementary figure 2.4: representative examples of chromogranin A immunostaining of ileum samples.

Chromogranin A (brown staining) was used as a marker of enterochromaffin cells. Representative examples of the different conservation qualities of tissues are displayed, from patient (a,b,c) and control (d,e,f) samples: **(a,d)** preserved histological structure **(b,e)** altered histological structure and **(c,f)** disrupted histological structure of tissues. Scale bars indicate 100 μm . The proportion of samples of each histological quality category was not different across patient and control samples. Enterochromaffin cells were detectable in all tissues, regardless of the histological quality.

Figure 2.4: Characterization of the serotonin-melatonin pathway in autaptic pineal gland samples from 9 patients with ASD and 22 controls.

The impact of time of death was assessed using Kruskal-Wallis test (left panels). The ASD group was compared to the control group using Wilcoxon two-sample test (right panels). Boxes indicate medians and quartiles. **(a)** TPH activity **(b)** AADC activity **(c)** Serotonin **(d)** N-acetylserotonin **(e)** Melatonin **(f)** AANAT activity **(g)** Correlation between N-acetylserotonin and AANAT activity (regression after log transformation of AANAT) **(h)** correlation between melatonin and AANAT activity **(i)** ASMT activity **(j)** correlation between N-acetylserotonin and ASMT activity **(k)** correlation between melatonin and ASMT activity **(l)** contour plot of NAS, AANAT activity and ASMT activity in patient (red dots) and control (green dots) samples **(m)** correlation between N-acetylserotonin and the ratio of activities ASMT / AANAT (linear regression after log transformation of NAS) **(n)** contour plot of NAS, AANAT activity and ASMT activity in patient (red dots) and control (green dots) samples.

Figure 2.5: Exploration of the nyctohemeral cycle of melatonin and cortisol in saliva.

Saliva samples were collected for 80 controls (33 children and 47 adults [green dots]), 66 patients with ASD (15 children and 54 adults [red dots]) and their relatives (66 parents [blue dots] and 26 unaffected sibs [purple dots]), at seven time points during the day, between wake time and bedtime. The bedtime sample is the same as the 22:00 sample for subjects going to bed before 22:30. Because the concentrations and cycles of melatonin are known to be age-dependent, analyses were stratified by age category

(adults and children below 17). The controls groups were compared with other groups for each sample time using Wilcoxon two sample test. For parents and unaffected sibs, p-values were not indicated if not significant. Boxes indicate medians and quartiles. **(a)** Salivary melatonin concentrations in children **(b)** Salivary melatonin concentrations in adults. Dashed lines indicate the peak threshold of 5 ng/L. **(c)** Salivary cortisol concentration.

Supplementary Figure 2.5: Mapping and genotyping a microduplication in ASMT.

(a) genomic structure of the *ASMT* microduplication, compared with the reference *ASMT* locus. The location of *ASMT* transcripts (NM_001171038) is indicated in blue, with the 5'UTR-exon 1 in cyan. The 2 regions amplified for the CNV genotyping test are indicated in red (CNV-specific PCR) and green (control PCR). **(b)** Sequence of the microduplication breakpoint, determined by a genome walker approach, aligned with the reference sequence (mismatches are indicated in red). **(c)** Frequency of the *ASMT* microduplication (determined by genotyping in 290 patients with ASD and 227 controls) and of *AANAT* and *ASMT* rare variants (from sequencing data) in patients with ASD and controls.

Figure 2.6: Quantification of AANAT and ASMT mRNA in lymphoblastoid cell lines (BLCL) and pineal glands.

mRNAs are expressed as Relative Quantity (RQ) to the mean of the control group. The ASD group (red dots) was compared to the control group (green dots) using Student's t-test. Boxes indicate medians and quartiles. The correlations between *ASMT* and *AANAT* mRNA and enzyme activities were determined using linear regression. **(a)** quantification of *AANAT* mRNA in BLCL from 65 controls and 72 patients with ASD, and correlation with *AANAT* enzyme activity measured in BLCL (n=59). **(b)** quantification of *ASMT* mRNA in BLCL from 83 controls and 138 patients with ASD, and correlation with *ASMT* enzyme activity measured in BLCL (n=94). Effect of one of the *ASMT* promoter SNPs, rs5989681, on *ASMT* mRNA levels in BLCL from 55 controls and 108 patients with ASD. The effect of genotype was tested using one-way ANOVA and was significant in both ASD and control groups (p=0.008 and p=0.004, respectively). **(c)** quantification of *AANAT* mRNA in pineal glands, correlation with *AANAT* activity and effect of time of death, tested using Kruskal-Wallis test. **(d)** quantification of *ASMT* mRNA in pineal glands, correlation with *ASMT* activity and

effect of time of death, tested using Kruskal-Wallis test. (e) assessment of *ASMT* mRNA splicing isoforms by RT-PCR (spanning exon 4 to 9). The expected product sizes are 648 pb for the active isoform, 507 pb for the isoform deleted for exon 7, and 732 pb for the isoform with LINE insertion as exon 6.

Figure 2.1. Exploration of the serotonin-melatonin pathway in the blood

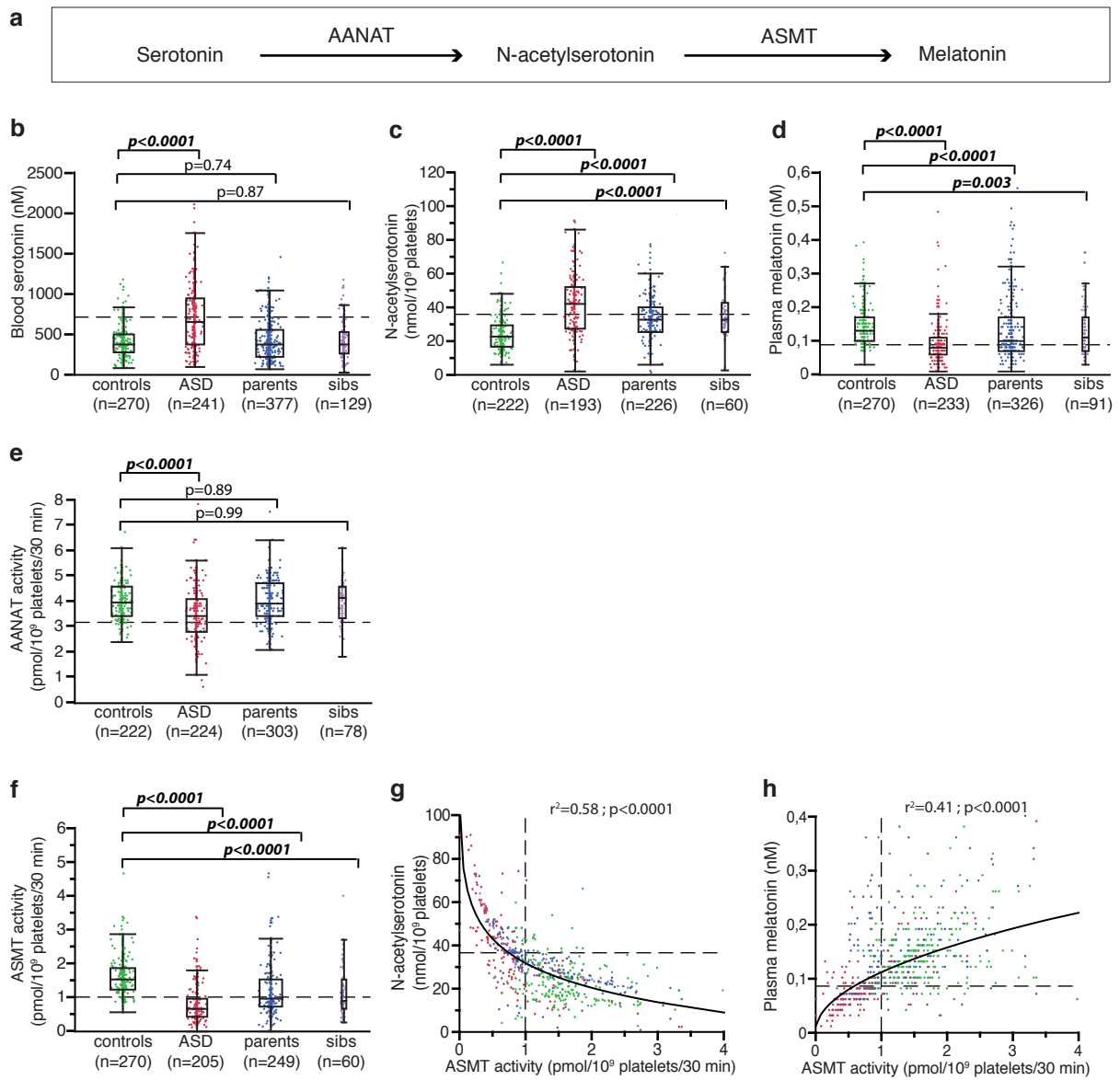
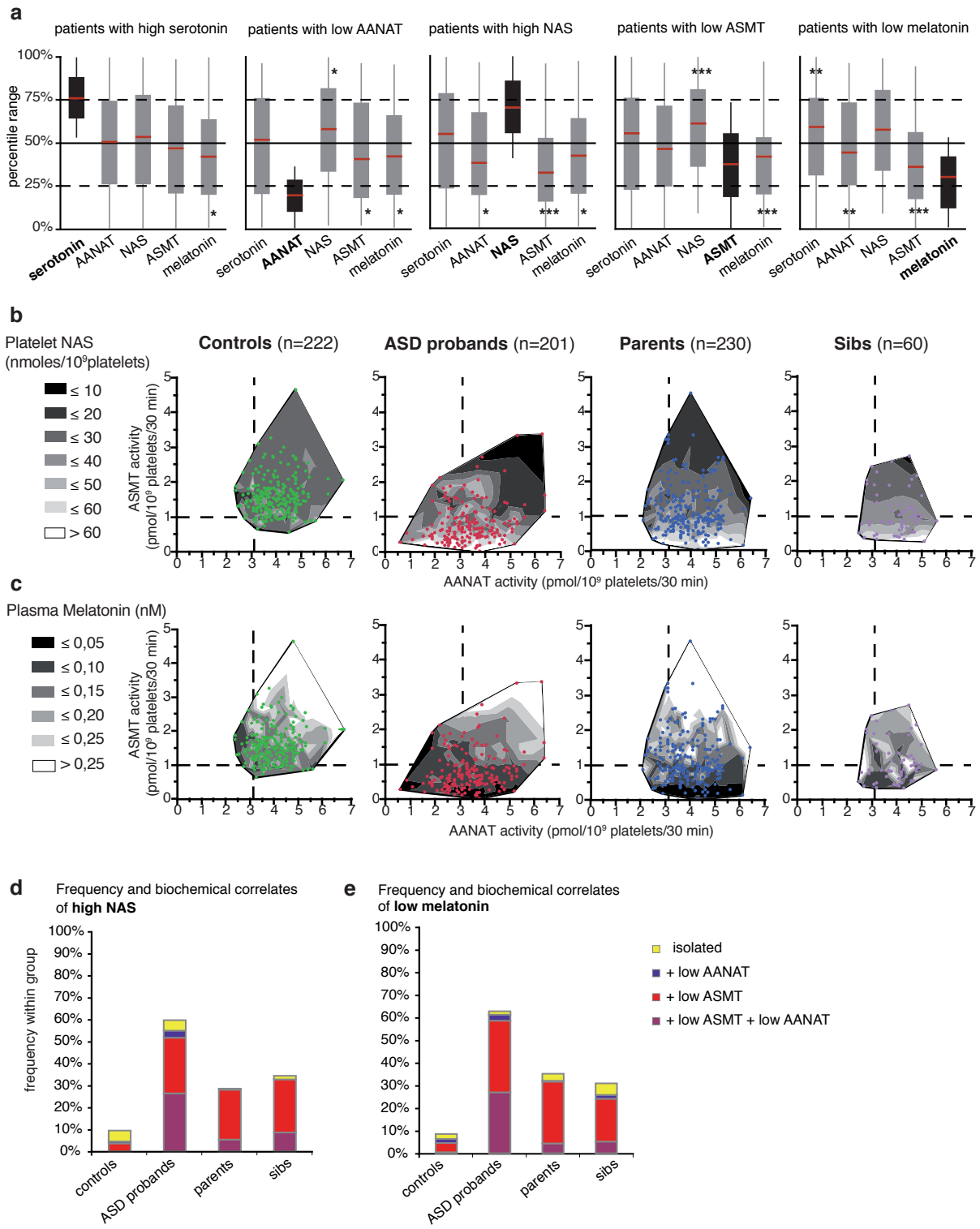
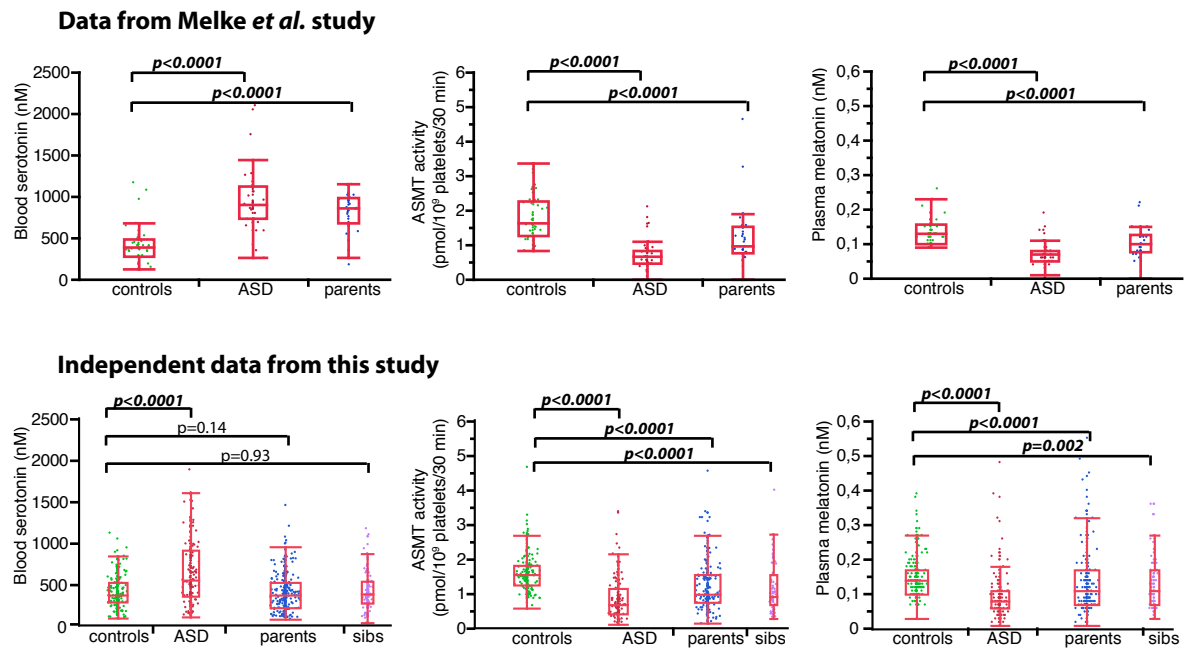


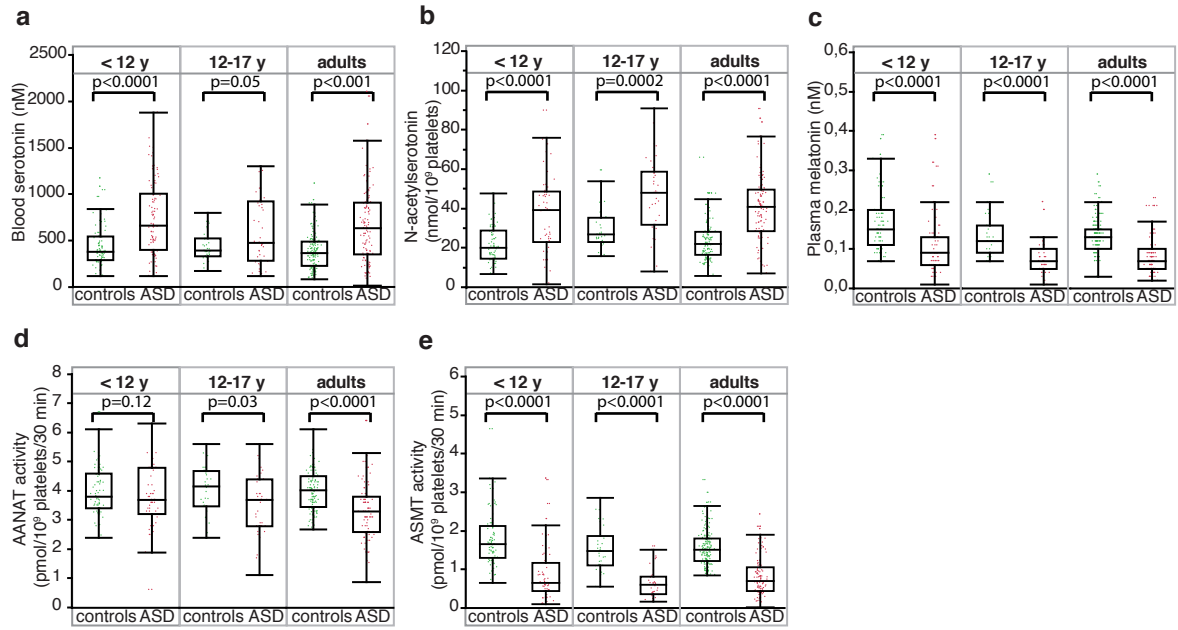
Figure 2.2 : Multivariate approach of blood biochemical data.



Supplementary figure 2.1. Detail of the two phases of inclusion



Supplementary figure 2.2. Effect of age on biochemical parameters and age-paired comparisons.



Supplementary figure 2.3. Frequency of the various biochemical profiles observed in patients with ASD

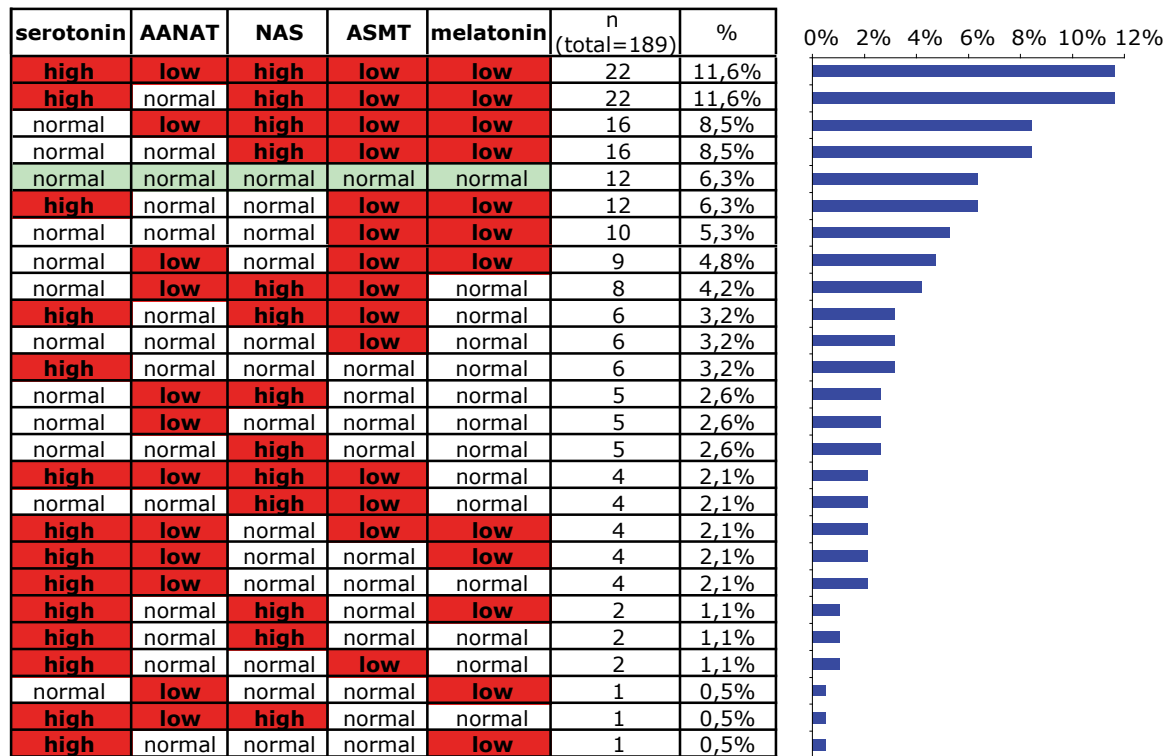
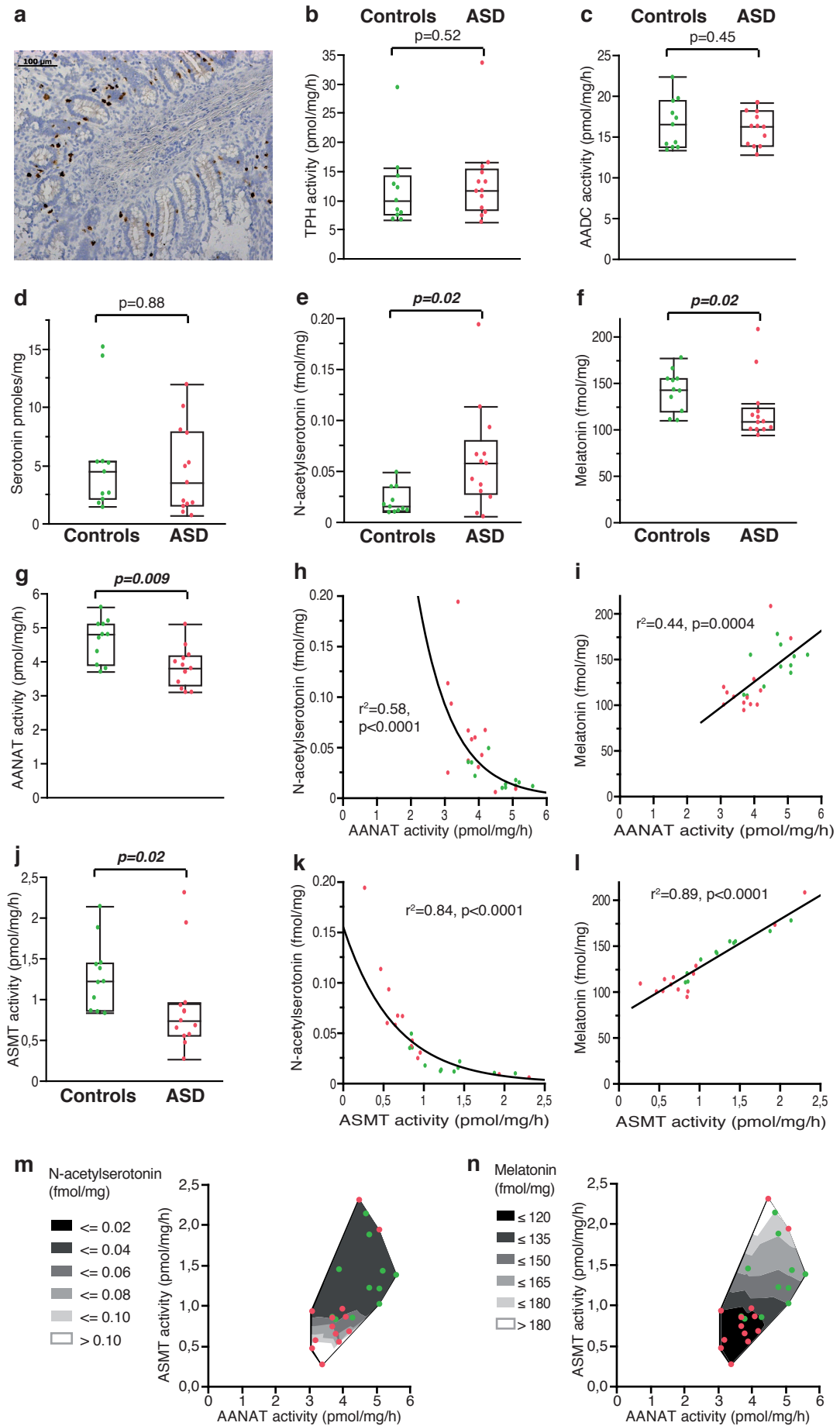


Figure 2.3. Characterization of the serotonin-melatonin pathway in autistic ileum samples from 13 patients with ASD and 11 controls.



Supplementary figure 2.4. Representative examples of chromogranin A immunostaining of ileum samples.

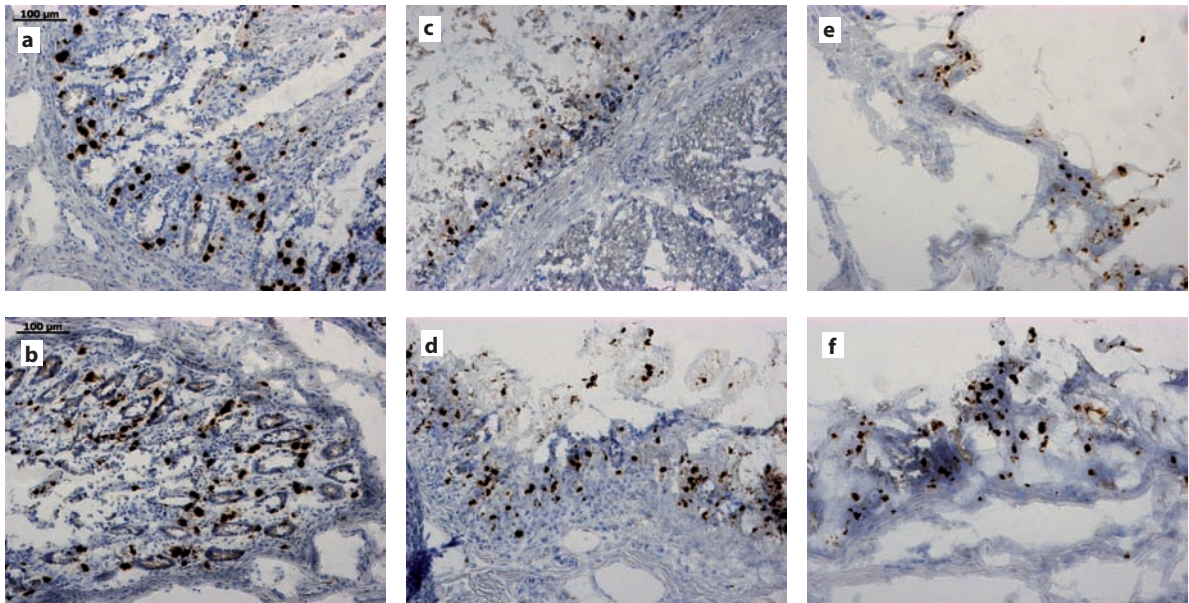


Figure 2.4. Characterization of the serotonin-melatonin pathway in autaptic pineal gland samples from 9 patients with ASD and 22 controls.

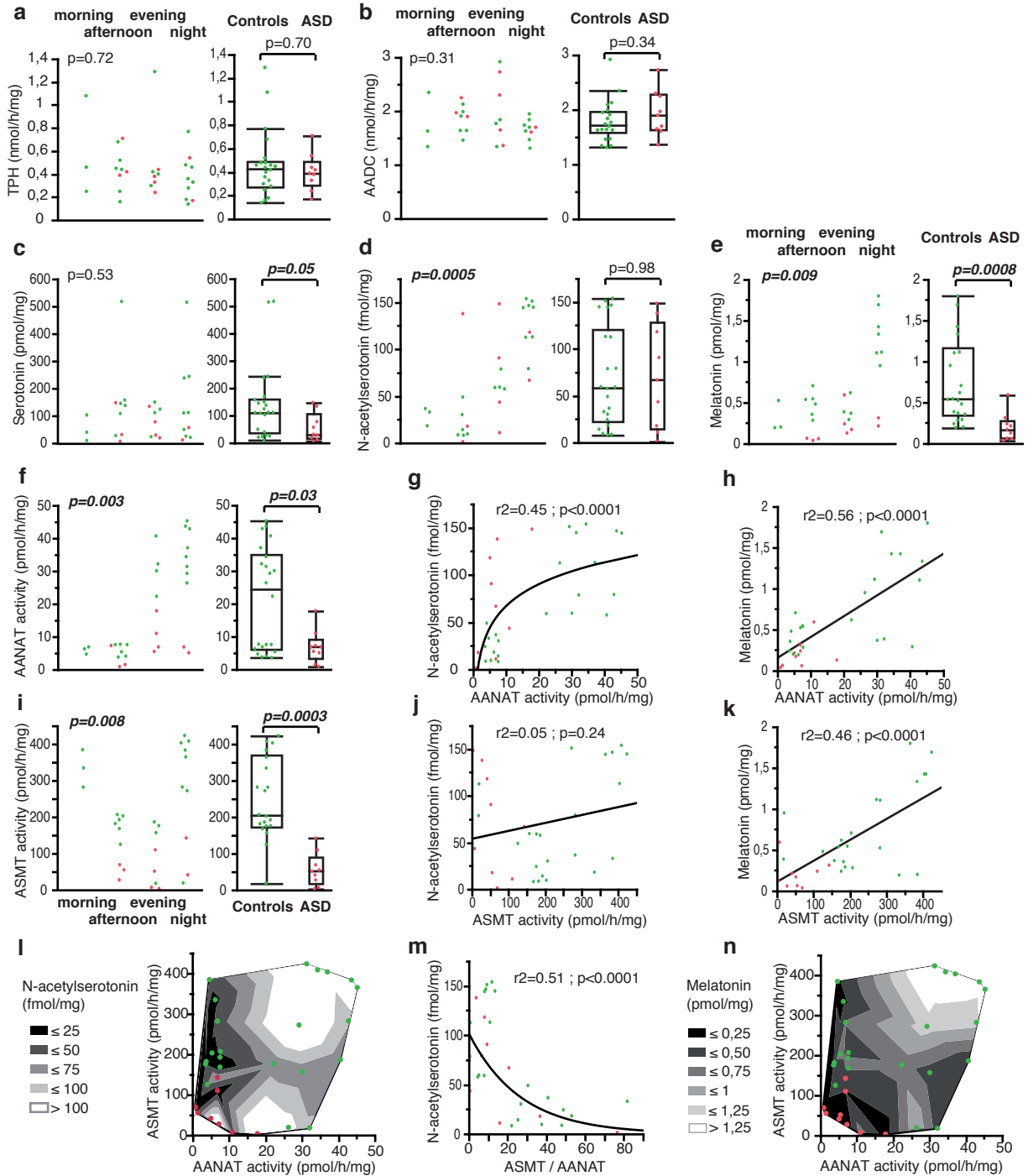
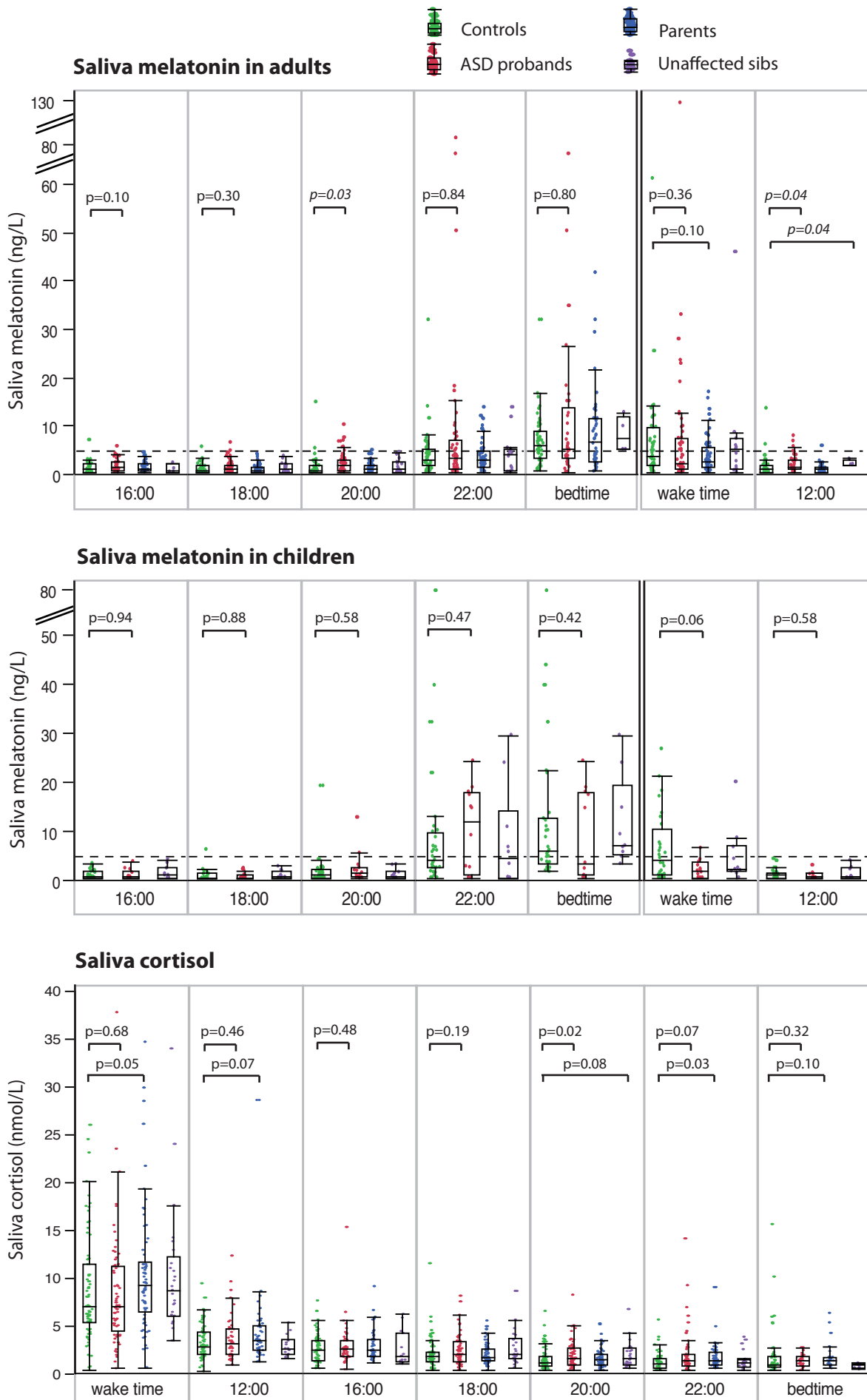


Figure 2.5. Exploration of the nyctohemeral cycle of melatonin and cortisol in saliva.



Supplementary figure 2.5. Mapping and genotyping a microduplication in *ASMT*

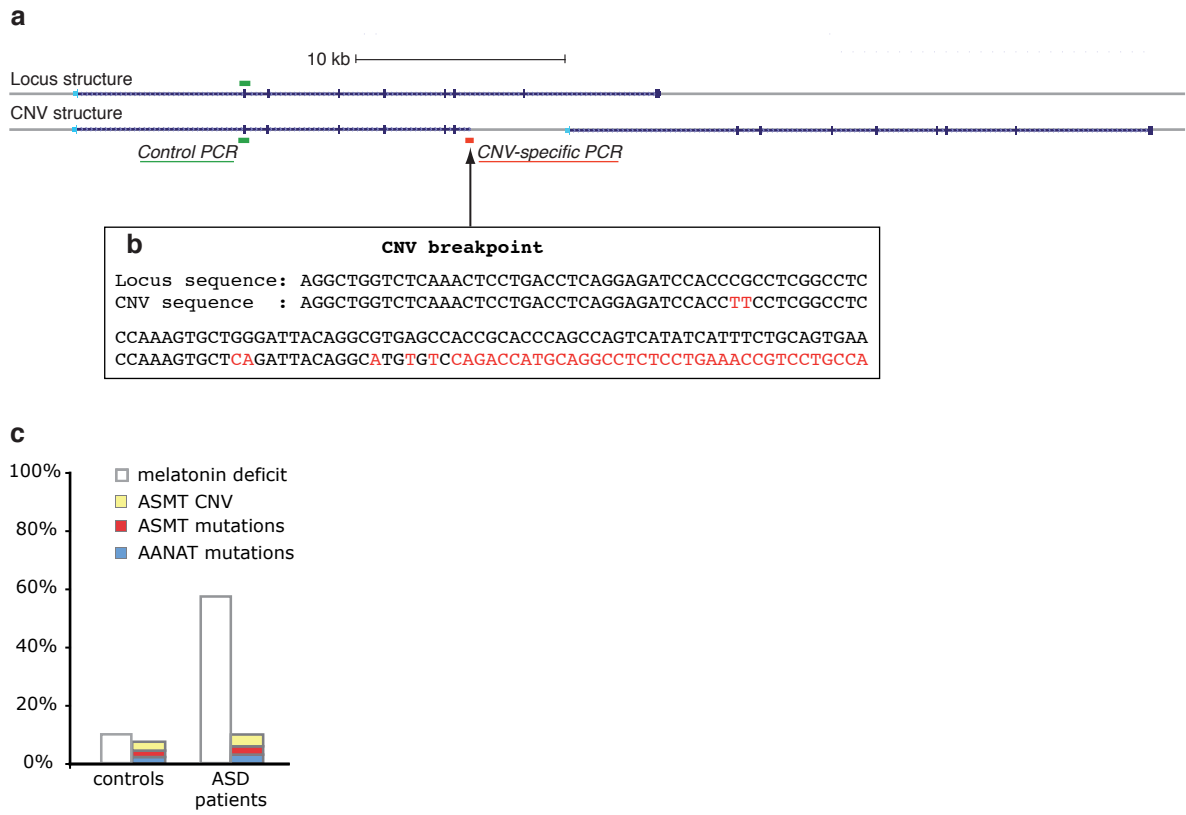
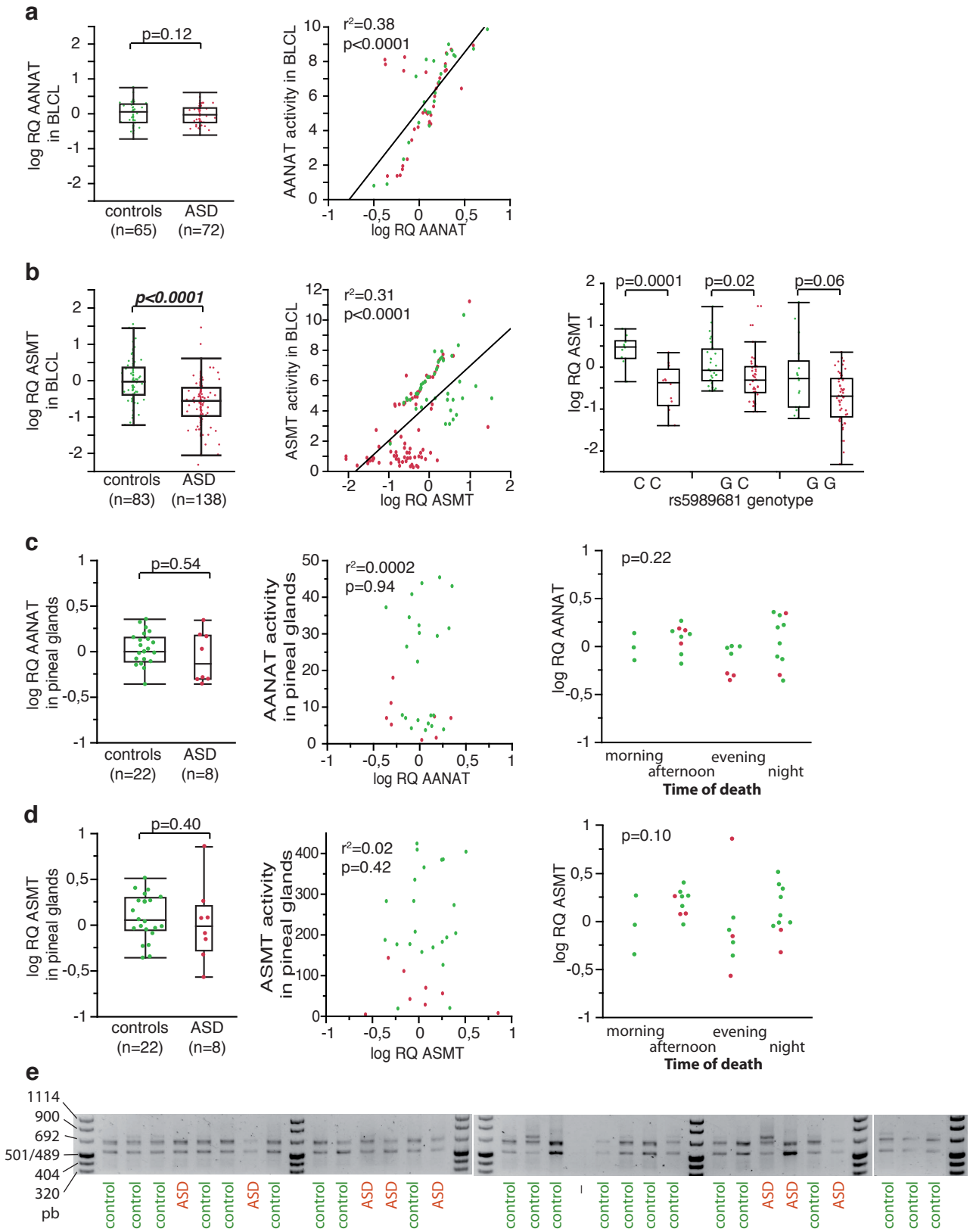


Figure 2.6 : Quantification of AANAT and ASMT mRNA in lymphoblastoid cell lines (BLCL) and pineal glands



2.7. Tables

Table 2.1: comparison of the nyctohemeral cycle of salivary melatonin between 69 patients with ASD, their relatives (66 parents and 26 unaffected sibs) and 80 controls.

The threshold for melatonin onset was set at 5 ng/L. The control groups were compared with other groups of the same age category using Pearson's chi-square test when applicable, and Fisher's exact test in other cases.

Table 2.2: mutation screening of AANAT and ASMT.

The missense, nonsense and splice-site variants identified for this study and in previously published sequencing studies are indicated. The frequencies of mutations observed in patients with ASD were compared with those observed in the control groups using Fisher's exact test, and with those obtained from the Exome Variant Server database (EVS) (supplementary table 5) using Pearson's chi-square test. ^a the total sample size published in the Pagan et al. study was n=440 controls, and included the 255 controls described in the Melke et al study.

Table 2.3 : clinical correlates of alterations of the serotonin-melatonin pathway : diagnosis and autistic symptoms.

For each biochemical parameter (measured in blood), patients with normal values were compared with patients with pathological values (high or low) using Pearson's Chi-square for categorical data (diagnosis) (n and % of patients with diagnosis are indicated) and Kruskal-Wallis test for quantitative data (scores) (median and quartiles are indicated). Because the number of patients investigated displays mild variations across biochemical parameters, the total sample size is not the same for all parameters. PDD-NOS : pervasive developmental disorder, not otherwise specified. Intellectual disability is defined as IQ<70. ADI : Autism Diagnostic Interview-Revised ; items : B (social interactions), C (verbal and non verbal communication), D (stereotyped behavior). RBS : Repetitive Behavior Scale. SRS : Social Responsive Scale.

Table 2.4: clinical correlates of alterations of the serotonin-melatonin pathway: comorbidities and associated features.

For each condition and each biochemical parameter (measured in blood), the percentage of patients displaying abnormal biochemical parameter is indicated and compared with the percentage of patients displaying normal biochemical parameter using Fisher's exact test. Sleep disorders are defined as insomnia, hypersomnia or phase delay. EEG: electroencephalogram. ADHD: attention deficit-hyperactivity disorder. Large head is defined as fronto-occipital head circumference above the 90th percentile for age.

Supplementary table 2.1: description of the populations investigated for blood biochemistry.

Supplementary table 2.2: primers and PCR conditions used for this study.

Supplementary table 2.3: characteristics of patient and control groups involved in the study of autaptic tissues.

Supplementary table 2.4: missense, nonsense and splice-site variants in AANAT and ASMT referenced in the Exome Variant Server (EVS) database.

Variants identified by exome sequencing of 3501 European-Americans (EA) and 1866 African-Americans (AA)(average sample size, $sd < 20$). MAF: minor allele frequencies. For assessing of the frequencies of damaging variants, the nonsense mutations and the essential splice-site mutation described in ASMT were considered damaging, as well as the T3M variant in AANAT, that was shown to reduce the enzyme activity *in vitro* (Chaste et al).

Supplementary table 2.5: biochemical and clinical data for families carrying rare AANAT and ASMT variants.

Families described in our previous study (Melke et al.), or families for which no clinical or biochemical data were available, were not included in this table. Subjects carrying rare variants are indicated in grey. ASD probands are indicated in red. Normal/pathological categories for biochemical parameters were determined using the 90th or 10th percentile of the control group as a threshold. Salivary melatonin peak was determined using a threshold of 5 ng/L. GA generalized anxiety, MDD major depressive disorder, MR mental retardation, OCD/OCS obsessive-compulsive disorder/symptoms, PDAG panic disorder with agoraphobia, PDD-NOS Pervasive developmental disorder, not otherwise specified, SAD social anxiety disorder, TS Tourette Syndrome. ^a ASMT M198R variant was predicted in silico as benign, but its functional impact was not determined in vitro.

Table 2.1. comparison of the nyctohemeral cycle of salivary melatonin between 69 patients with ASD, their relatives (66 parents and 26 unaffected sibs) and 80 controls

	children			adults			
	controls	ASD	unaffected sibs	controls	ASD	parents	unaffected sibs
n	33	15	11	47	54	66	15
time of melatonin onset							
18h-20h	1(3%)	2(18%)	1(10%)	0(0%)	5(10%)	1(2%)	0(0%)
20h-22h	13(42%)	4(36%)	4(40%)	13(28%)	12(23%)	14(21%)	5(33%)
>22h	17(55%)	5(45%)	5(50%)	34(72%)	35(67%)	51(77%)	10(67%)
ND	2	4	1	0	2	0	0
p (vs controls)		0.25	0.69		0.10	0.53	0.67
melatonin > 5 at wake up							
yes	13(46%)	1(7%)	3(30%)	20(43%)	20(39%)	17(27%)	8(53%)
no	15(54%)	13(93%)	7(70%)	27(57%)	31(61%)	47(73%)	7(47%)
ND	5	1	1	0	3	2	0
p (vs controls)		0.01 *	0.37		0.74	0.08	0.38
melatonin > 5 ever (at wake up and/or 22h)							
yes	23(72%)	8(67%)	5(50%)	28(61%)	32(60%)	25(40%)	11(73%)
no	9(28%)	4(33%)	5(50%)	18(39%)	21(40%)	37(60%)	4(27%)
ND	1	3	1	1	1	4	0
p (vs controls)		0.74	0.20		0.96	0.03 *	0.47

Table 2.2. Mutation screening of AANAT and ASMT.

gene	variant	genomic location (hg19)	rs ID	nucleotide change	prediction in silico (polyphen2)	activity in vitro	population reference		Controls			ASD			ASD Meta-analysis	total mutations	damaging mutations
							n=	reference	Chaste 2011	this study	Meta-analysis	Melke 2008	Pagan 2011	this study			
AANAT	T3M	17:74464836	rs61739395	T>C	benign	reduced		0	0	0	0	4	4	0			
AANAT	A13S	17:74464855	rs139841386	T>G	benign	normal		0	0	0	0	1	1	0			10(2.3%)
AANAT	R53C	17:74464985	-	T>C	probably damaging	ND		0	0	0	0	1	1	0			8(2.2%)
AANAT	V62I	17:74465275	-	A>G	benign	normal		1	0	1	0	1	1	0			7(1.9%)
AANAT	R71W	17:74465302	-	C>T	probably damaging	ND		0	1	1	0	0	0	0			1.2(0.5-3.2)
AANAT	T110M	17:74465757	rs138386508	C>T	probably damaging	ND		0	0	0	1	1	1	0			0.81
AANAT	A157V	17:74465899	rs143751627	C>T	benign	reduced		0	0	0	0	1	1	0			
AANAT	A163V	17:74465916	rs72466448	C>T	benign	reduced		3	2	5	2	4	4	0			
AANAT	G177D	17:74465958	-	G>A	probably damaging	reduced		1	0	1	0	0	0	0			
ASMT	L11F	X:1734123	-	C>T	possibly damaging	reduced		0	0	0	0	1	1	0			
ASMT	N17K	X:1734143	rs139358384	C>A	possibly damaging	disrupted		0	0	0	0	1	1	0			12(2.4%)
ASMT	V46M	X:1742098	rs145866337	G>A	possibly damaging	ND		0	0	1	0	0	0	0			
ASMT	E61Q	X:1742143	rs121918823	G>C	possibly damaging	reduced		0	1	1	0	0	0	0			11(2.2%)
ASMT	K81E	X:1742203	rs141964565	A>G	benign	normal		0	0	0	0	0	0	0			1.3(0.6-2.8)
ASMT	splice site	X:1748834	rs148855515	T>C	damaging	ND		0	0	1	1	0	0	0			0.69
ASMT	M198R	X:1752074	-	T>G	benign	ND		0	0	0	0	0	0	0			
ASMT	Y201X	X:1752083	rs143524297	C>A	probably damaging	ND		0	0	1	1	0	0	0			
ASMT	D210G	X:1752109	rs121918824	A>G	probably damaging	disrupted		1	0	0	0	0	0	0			
ASMT	K219R	X:1752136	rs121918825	A>G	benign	normal		1	0	0	0	0	0	0			
ASMT	P243L	X:1755355	rs138775083	C>T	possibly damaging	reduced		1	0	0	0	0	0	0			
ASMT	I269M	X:1755434	rs146121655	C>G	possibly damaging	reduced		0	0	0	0	0	0	0			
ASMT	C273S	X:1755445	rs144317424	G>C	probably damaging	reduced		1	0	0	0	0	0	0			
ASMT	G278A	X:1761702	-	G>C	possibly damaging	reduced		0	0	0	0	0	0	0			
ASMT	R291Q	X:1761741	rs121918828	A>G	probably damaging	disrupted		1	0	0	0	0	0	0			
ASMT	L298F	X:1761761	rs140206334	C>T	possibly damaging	disrupted		2	0	0	0	0	0	0			
ASMT	H318D	X:1761821	rs140152081	G>C	benign	reduced		0	0	0	0	0	0	0			
total (ASMT+AANAT)															5.9%	4.4%	3.9%
% ASD															% controls	% controls	% controls
OR (95% CI)															OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)
p															p	p	p

Table 2.3. Clinical correlates of alterations of the serotonin-melatonin pathway: diagnosis and autistic symptoms.

patients with...	n	high serotonin		normal serotonin		p	low AANAT		normal AANAT		p	high NAS		normal NAS		p	low ASMT		normal ASMT		p	low melatonin		normal melatonin		p
		n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Diagnosis																										
[n (%)]																										
Autism	67	75%	67	66%	0.40	45	62%	82	74%	0.17	61	63%	48	72%	0.50	89	72%	27	58%	0.05	77	72%	54	69%	0.83	
Asperger	17	19%	27	27%		20	28%	23	21%		28	29%	15	22%		25	20%	18	38%		23	21%	20	25%		
PDD-NOS	5	6%	7	7%		7	10%	5	5%		8	8%	4	6%		10	8%	2	4%		7	7%	5	6%		
	89		101			72		110			97		67			124		47			107		79			
Intellectual disability [n (%)]																										
n	80		89		0.29	64		97		0.75	79		64		0.04	109		42		0.64	96		70		0.36	
(%)	58%		49%			50%		53%			39%		56%			50%		45%			50%		57%			
ADI																										
n	83		79		0.03	55		99		0.87	74		56		0.15	109		31		0.64	93		69		0.53	
B (social)	23	17-26]	25	19-28]		24	16-27]	24	18-27]	0.87	23	16-26]	25	18-28]	0.15	23	17-26]	23	14-28]	0.64	24	18-26]	24	18-28]	0.53	
C (verbal comm.)	16	12-18]	15	13-18]	0.79	15	10-18]	16	13-18]	0.39	15	11-18]	16	13-18]	0.54	16	13-19]	15	9-17]	0.19	16	13-19]	15	12-17]	0.43	
C (non verbal comm.)	12	8-14]	12	8-14]	0.91	12	7-14]	12	9-14]	0.79	12	8-14]	13	8-14]	0.22	12	8-14]	10	5-14]	0.14	12	9-14]	12	8-14]	0.38	
D (repetitive behavior)	6	4-8]	6	4-7]	0.27	6	4-9]	6	4-8]	0.73	6	4-8]	6	4-8]	0.47	6	4-8]	6	4-7]	0.30	6	4-8]	6	4-7]	0.02	
	32		45		0.19	35		43		0.47	54		21		0.87	56		20		0.57	47		30			
RBS	16	8-31]	22	14-34]		24	10-33]	18	12-34]	0.47	19	10-33]	24	4-35]	0.87	20	9-33]	24	13-36]	0.57	19	9-28]	26	13-36]	0.15	
SRS	82	67-94]	89	77-101]	0.08	87	74-99]	86	67-97]	0.46	87	73-101]	85	63-97]	0.37	87	72-99]	86	68-96]	0.69	84	65-100]	87	74-96]	0.68	

Table 2.4. Clinical correlates of alterations of the serotonin-melatonin pathway: comorbidities and associated features.

	total patients with condition n	patients with condition and high 5HT			patients with condition and low AANAT			patients with condition and high NAS			patients with condition and low ASMT			patients with condition and low mel							
		n	%	OR (CI95)	n	%	OR (CI95)	n	%	OR (CI95)	n	%	OR (CI95)	n	%	OR (CI95)					
All patients	118	50	42%		54	46%		82	69%		84	71%		67	57%						
Neurodevelopmental comorbidities	19																				
seizures or abnormal EEG	7	37%	0.46	0.71[0.2-1.8]	9	47%	1	1.0[0.4-2.7]	14	74%	1	1.1[0.4-3.3]	13	68%	0.57	0.7[0.2-2.1]	10	53%	0.45	0.6[0.2-1.8]	
motor impairments	34	39%	0.41	0.7[0.3-1.5]	37	43%	0.42	0.7[0.3-1.6]	63	72%	0.50	1.4[0.6-3.3]	63	72%	0.82	1.2[0.5-2.9]	53	61%	0.54	1.3[0.6-2.9]	
Sleep disorders	64	25	39%	0.58	0.8[0.4-1.6]	36	56%	0.03	2.4[1.1-5.1]	51	80%	0.015	2.8[1.2-6.7]	48	75%	0.41	1.5[0.7-3.4]	39	61%	0.71	1.2[0.6-2.4]
Psychiatric comorbidities	26	14	54%	0.18	1.8[0.8-4.5]	10	38%	0.51	0.7[0.3-1.7]	17	65%	0.63	0.8[0.3-1.9]	18	69%	0.81	0.9[0.3-2.3]	16	62%	0.66	1.3[0.5-3.1]
Depression	24	45%	0.45	1.4[0.7-3.0]	25	47%	0.71	1.2[0.6-2.5]	37	70%	0.69	1.2[0.5-2.7]	36	68%	1	0.9[0.4-2.1]	30	57%	1	1.0[0.5-2.1]	
Anxiety disorders	26	46%	0.35	1.5[0.7-3.2]	29	51%	0.46	1.4[0.7-2.9]	40	70%	0.84	1.1[0.5-2.5]	41	72%	0.84	1.1[0.5-2.5]	33	58%	1	1.0[0.5-2.0]	
ADHD	20	45%	0.45	1.3[0.6-2.8]	23	52%	0.46	1.4[0.7-3.0]	31	70%	1	1.0[0.4-2.2]	31	70%	0.68	0.8[0.4-1.8]	26	59%	1	1.0[0.5-2.1]	
Morphologic features	15	5	33%	0.58	0.7[0.2-2.3]	10	67%	0.088	3.0[0.9-9.9]	9	60%	0.55	0.6[0.2-2.0]	11	73%	1	1.1[0.3-3.7]	12	80%	0.087	3.5[0.9-13.6]
dysmorphic features	16	43%	1	1.0[0.4-2.2]	19	51%	0.84	1.2[0.5-2.6]	24	65%	0.64	0.7[0.3-1.9]	26	70%	0.65	1.3[0.5[3.3]	28	76%	0.006	3.7[1.4[9.8]	
large head (>90th percentile)	6	33%	0.60	0.7[0.2-1.9]	6	33%	0.21	0.5[0.2-1.5]	15	83%	0.26	2.3[0.6-8.9]	15	83%	0.26	2.3[0.6-8.7]	11	61%	0.80	1.2[0.4-3.3]	
Digestive problems	18																				

Supplementary table 2.1. Description of the populations investigated for blood biochemistry.

		Controls	Probands with ASD	Parents	Unaffected sibs
n (total)		270	256	375	129
sex	M	164	208	177	62
	F	106	48	198	67
age	<12y	83	92	0	54
	12-17y	31	44	0	23
	adults	156	120	375	52
n per parameter	Melke et al study (serotonin, ASMT, melatonin) :	48	43	34	0
this study :	Blood serotonin	222	198	343	129
	Platelet AANAT activity	222	224	303	78
	Platelet N-acetylserotonin	222	193	226	60
	Platelet ASMT activity	222	162	215	60
	Plasma melatonin	222	190	287	91
	Salivary melatonin and cortisol	80	69	66	26

Supplementary table 2.2. Primers and PCR conditions used for this study.

Primers and conditions for exon amplification and sequencing (genomic DNA)

gene	exon	Forward PCR primer	Reverse PCR primer	annealing temperature	elongation duration	nb of cycles	amplicon size (bp)	Sequencing primer
ASMT	1B	GAGCAGGAGAAATCGTTGAA	CAACAAATGGAACGTGAGTGTG	56°C	1 min	35		FW
ASMT	2	TGGTGCAATCTCATTTGACTGTG	GGGTTTCATGCCATTTCTCCTG	64,5°C	40 sec	35	552	RV
ASMT	3	TCCAGCTGTACAAGGCAAGAG	CTCCATCCACTGCCACTTCCAC	62°C	1 min	40	946	FW
ASMT	4	GCCTGGCTACAGAGCTGAAA	CTCCTGGGTTGTGCCATTTG	55°C	30 sec	35	283	RV
ASMT	5	CCTGTGGGTATAGCTCCGTTTC	CGCAATGTCAAAGCATCAGA	63°C	30 sec	35	331	FW
ASMT	6	AGCTTGCACTGAGCGGAAATC	GCACCCATCGACTCGTCAATTT	64°C	30 sec	35	342	
ASMT	7	TGGGTGGACCCCTTCATGAGT	GTGTTTCCGGGAGTGAGAGGA	64°C	30 sec	35	352	FW
ASMT	8	AGCCTGGAAGACCTGGGAAAG	CCTGTGGGATGATTTCAAGTGC	64°C	30 sec	35	338	FW
ASMT	9	GGTGCCCTGACTGTCTCTGA	CCATCAGCGTGGTCTCAGTA	64°C	30 sec	35	506	RV
ANAT	promoter	GCACCTGTGAAAATCCAAACCT	CTGAAGGAAACGTCAGCTC	64°C	30 sec	35		
ANAT	1	GCTACAAAAGAGGCCAGATACA	CAGTTCTGGAGGAAAGAAATCC	58°C	1 min	35	850	FW
ANAT	2							CAAGAAAATGGGGGAAACAG
ANAT	3	GAGCAGTGTACAGAGAAGT	CCGGTCTCAGGTAACAGAGTTC	61°C	1 min	35		FW

Primers and conditions for ASMT CNV genotyping

PCR	Forward PCR primer	Reverse PCR primer	annealing temperature	elongation duration	nb of cycles	amplicon size (bp)
CNV-specific control	GTGGTGACAGATCTCGGCTCCCTTCAA	GTCTGGCAGGACGGTTCAG	66°C	90 sec	35	406
	TGGTGCAATCTCATTTGACTCTG	GGGTTTCATGCCATTTCTCCTG				552

Primers and conditions for ASMT cDNA amplification

exon	Forward PCR primer	Reverse PCR primer	annealing temperature	elongation duration	nb of cycles	amplicon size (bp)
1-5	TCAGAGGACCAGCCCTATCG	GGTCACACATAAGTGGGAACACTG	60°C	1 min	35	547 (for reference isoform)
4-9	CCAGTACCTGGAGACGTTTGG	TTCTTGGCTAAAATGGCATCA	58°C	1 min	35	648 (for reference isoform)

Supplementary table 2.3. Characteristics of patient and control groups involved in the study of autoptic tissues.

		ASD patients	controls	p
Ileum samples				
n		13	11	
age	(median, range)	15 [7-46]	15 [6-39]	0.81
sex	M	11	10	0.64
	F	2	1	
PMI	(median, range)	19 [3-35]	14 [4-36]	0.32
Pineal gland samples				
n		9	22	
Age	(median, range)	39 [10-84]	36.5 [8-89]	0.98
Sex	M	8	20	0.86
	F	1	2	
PMI	(median, range)	22 [16-35]	18.5 [5-31]	0.05 *
time of death	morning	0	3	0.42
	afternoon	3	6	
	evening	4	4	
	night	2	8	
	unknown	0	1	

Supplementary table 2.4. Missense, nonsense and splice-site variants in AANAT and ASMT referenced in the Exome Variant Server (EVS) database

gene	#base (NCBI.37)	rsID	Alleles	MAF% EA (n=3501)	MAF% AA (n=1866)	MAF% All (n=5367)	AminoAcid Change	Protein Pos	Polyphen prediction	total frequency of mutations (% in population)	frequency of damaging mutations (% in population)	
AANAT	17:74464836	rs61739395	T/C	0,0999	5,4692	1,9646	MET,THR	3	benign/damaging	EA AA All	0,4 3,3 1,4	0,4 3,2 1,4
AANAT	17:74464865	rs139841386	T/G	0,0427	0,0268	0,0372	SER,ALA	13	benign			
AANAT	17:74464910	unknown	T/C	0	0,0268	0,0093	TRP,ARG	28	probably-damaging			
AANAT	17:74464911	unknown	A/G	0	0,0268	0,0093	GLN,ARG	28	probably-damaging			
AANAT	17:74464914	rs141006262	A/G	0	0,2943	0,1022	HIS,ARG	29	probably-damaging			
AANAT	17:74464920	rs139765369	T/C	0,0285	0,0268	0,0279	ILE,THR	31	probably-damaging			
AANAT	17:74464961	rs148593961	A/G	0,0285	0	0,0186	THR,ALA	45	benign			
AANAT	17:74464985	unknown	T/C	0,0142	0	0,0093	CYS,ARG	53	probably-damaging			
AANAT	17:74465275	unknown	A/G	0,0142	0,0268	0,0186	ILE,VAL	62	benign			
AANAT	17:74465321	rs146430405	A/G	0,0142	0	0,0093	TYR,CYS	77	probably-damaging			
AANAT	17:74465347	unknown	A/G	0,0142	0	0,0093	LYS,GLU	86	possibly-damaging			
AANAT	17:74465352	rs140754096	T/G	0	0,0268	0,0093	ASP,GLU	87	possibly-damaging			
AANAT	17:74465376	unknown	G/C	0	0,0268	0,0093	MET,ILE	95	probably-damaging			
AANAT	17:74465757	rs138386508	T/C	0	0,163	0,057	MET,THR	110	probably-damaging			
AANAT	17:74465781	rs141360557	C/T	0	0,0271	0,0094	THR,ILE	118	benign			
AANAT	17:74465811	rs150357567	A/G	0,0145	0,0813	0,0378	HIS,ARG	128	benign			
AANAT	17:74465880	unknown	T/C	0,0144	0,027	0,0188	LEU,PRO	151	probably-damaging			
AANAT	17:74465904	rs138303952	C/T	0,0143	0	0,0093	THR,MET	159	possibly-damaging			
AANAT	17:74465909	rs143874240	A/G	0	0,0805	0,0279	LYS,GLU	161	probably-damaging			
AANAT	17:74465911	rs144231136	T/G	0,0143	0	0,0093	ASP,GLU	161	probably-damaging			
AANAT	17:74465915	unknown	A/G	0	0,0268	0,0093	THR,ALA	163	benign			
AANAT	17:74465916	rs72466448	T/C	0,5705	0,134	0,4188	VAL,ALA	163	benign/damaging			
AANAT	17:74465984	rs150881412	T/C	0	0,0536	0,0187	PHE,LEU	186	benign			
AANAT	17:74466014	rs144513919	T/C	0,0143	0	0,0094	TRP,ARG	196	benign			
ASMT	X:1734115	rs140050511	T/C	0,0143	0	0,0093	VAL,ALA	8	benign			
ASMT	X:1734120	rs143703303	T/C	0,0143	0,0268	0,0186	CYS,ARG	10	probably-damaging			
ASMT	X:1734123	unknown	T/C	0,0428	0	0,0279	PHE,LEU	11	possibly-damaging			
ASMT	X:1734129	unknown	C/A	0,0285	0	0,0186	HIS,ASN	13	benign			
ASMT	X:1734143	rs17149149	A/C	0,0285	0,1876	0,0838	LYS,ASN	17	possibly-damaging			
ASMT	X:1734151	rs150043934	C/T	0,0143	0,0268	0,0186	THR,MET	20	possibly-damaging			
ASMT	X:1742059	rs149222772	A/G	0	0,6153	0,214	MET,VAL	33	probably-damaging			
ASMT	X:1742074	rs146923704	A/G	0,0143	0,214	0,0837	THR,ALA	38	possibly-damaging			
ASMT	X:1742077	unknown	C/G	0	0,0268	0,0093	GLN,GLU	39	benign			
ASMT	X:1742098	rs145866337	A/G	0,0285	2,8105	0,9955	MET,VAL	46	possibly-damaging			
ASMT	X:1742117	rs141250190	A/G	0	0,0803	0,0279	ASP,GLY	52	benign			
ASMT	X:1742186	rs138070409	C/T	0	0,0268	0,0093	ALA,VAL	75	benign			
ASMT	X:1742192	rs142665738	T/C	0	0,0535	0,0186	MET,THR	77	benign			
ASMT	X:1742203	rs141964565	G/A	0,0143	1,2039	0,4279	GLU,LYS	81	benign			
ASMT	X:1743250	rs141994035	T/G	0	0,0268	0,0093	SER,ARG	111	possibly-damaging			
ASMT	X:1743251	rs144722872	G/A	0	0,0268	0,0093	ALA,THR	112	possibly-damaging			
ASMT	X:1743267	rs142905563	A/G	0	0,107	0,0372	stop,TRP	117	unknown/damaging			
ASMT	X:1743284	unknown	A/G	0,0143	0	0,0093	THR,ALA	123	probably-damaging			
ASMT	X:1746622	rs139938699	T/C	0	0,0268	0,0093	MET,THR	134	probably-damaging			
ASMT	X:1746649	unknown	C/T	0,0285	0	0,0186	SER,PHE	143	probably-damaging			
ASMT	X:1748718	rs147969184	A/G	0	0,1873	0,0651	LYS,GLU	150	benign			
ASMT	X:1748721	unknown	A/G	0,0143	0,0268	0,0186	SER,GLY	151	benign			
ASMT	X:1748766	unknown	A/G	0,0285	0	0,0186	ILE,VAL	166	benign			
ASMT	X:1748781	unknown	A/G	0,0143	0,0268	0,0186	MET,VAL	171	probably-damaging			
ASMT	X:1748815	rs145494220	A/T	0	0,0268	0,0093	HIS,LEU	182	benign			
ASMT	X:1748834	rs148855515	C/T	0,2139	0	0,1395	splice-5	NA	unknown/damaging			
ASMT	X:1752073	unknown	G/T	0,0143	0	0,0093	ARG,MET	198	benign			
ASMT	X:1752083	rs143524297	A/C	0	0,107	0,0372	stop,TYR	201	unknown/damaging			
ASMT	X:1752120	unknown	A/G	0,0143	0	0,0093	MET,VAL	214	probably-damaging			
ASMT	X:1752130	rs148036160	T/C	0,0428	0,0535	0,0465	MET,THR	217	benign			
ASMT	X:1752140	unknown	T/G	0,0143	0	0,0093	HIS,GLN	220	benign			
ASMT	X:1755349	rs144881143	G/C	0,0143	0	0,0093	ARG,PRO	241	benign			
ASMT	X:1755355	rs138775083	T/C	0,0285	0,0268	0,0279	LEU,PRO	243	probably-damaging			
ASMT	X:1755390	rs141945490	G/C	0	0,0268	0,0093	ASP,HIS	255	probably-damaging			
ASMT	X:1755409	unknown	G/A	0	0,0268	0,0093	ARG,LYS	261	benign			
ASMT	X:1755434	rs146121655	G/C	0	0,3478	0,1209	MET,ILE	269	possibly-damaging			
ASMT	X:1755445	rs144317424	C/G	0,0143	0,0535	0,0279	SER,CYS	273	probably-damaging			
ASMT	X:1761733	rs140913463	T/A	0,1711	0,0803	0,1395	ASP,GLU	393	benign			
ASMT	X:1761750	rs144850405	C/T	0	0,0268	0,0093	PRO,LEU	294	benign			
ASMT	X:1761761	rs140206334	T/C	0,1569	0	0,1023	PHE,LEU	298	possibly-damaging			
ASMT	X:1761789	rs142044899	T/C	0,0143	0,0268	0,0186	MET,THR	307	probably-damaging			
ASMT	X:1761800	rs151143176	A/G	0	0,0268	0,0093	LYS,GLU	311	probably-damaging			
ASMT	X:1761821	rs140152081	G/C	0,0143	0	0,0093	ASP,HIS	318	benign			
total (AANAT+ASMT)										EA AA All	1,0 6,5 2,9	0,7 5,5 2,4

Supplementary table 2.5. Biochemical and clinical data for families carrying rare AANAT and ASMT variants.

mutation	impact of mutation on protein function	family	status	genotype	Axis I diagnosis	cognitive level	sleep disorders	blood serotonin (nM)	platelet AANAT activity (pmol/10 ⁹ platelets/30 min)	platelet NAS (nmol/10 ⁹ platelets)	platelet ASMT activity (pmol/10 ⁹ platelets/30 min)	plasma melatonin (nM)	detectable salivary melatonin peak
AANAT T3M	damaging	RD-154	father	AANAT T3M/+	-	no MR	ND	545 (normal)	3,9 (normal)	22,0 (normal)	1,94 (normal)	0,27 (normal)	ND
			mother	AANAT +/-	-	no MR	ND	331 (normal)	3,2 (normal)	27,4 (normal)	0,83 (low)	0,07 (low)	ND
		RD-165	proband (M)	AANAT T3M/+	autism	severe MR	ND	840 (high)	3,7 (normal)	26,8 (normal)	0,83 (low)	0,07 (low)	ND
			father	AANAT T3M/+ ASMT +/-	MDD	no MR	no sleep disorders	270 (normal)	3,3 (normal)	12,3 (normal)	0,74 (low)	0,07 (low)	ND
AANAT A13S	benign	RD-185	mother	AANAT +/- ASMT CNV/+	MDD	no MR	no sleep disorders	358 (normal)	3,6 (normal)	9,9 (normal)	1,86 (normal)	0,22 (normal)	ND
			proband (M)	AANAT T3M/+ ASMT CNV/+	Asperger	no MR	no sleep disorders	223 (normal)	6,3 (normal)	2,5 (normal)	3,36 (normal)	0,39 (normal)	ND
		001-022	proband (F)	AANAT T3M/+ ASMT CNV/+	autism, MDD, ADHD	no MR	phase delay, insomnia	228 (normal)	3,4 (normal)	36,4 (normal)	0,8 (low)	0,06 (low)	yes (evening only)
			father	AANAT A13S/+	-	no MR	ND	233 (normal)	4,8 (normal)	24,0 (normal)	1,43 (normal)	0,17 (normal)	ND
AANAT R53C	damaging	RD-003	mother	AANAT +/-	-	no MR	ND	414 (normal)	5,1 (normal)	77,0 (high)	0,18 (low)	0,03 (low)	ND
			proband (M)	AANAT A13S/+	autism	moderate MR	1407 (high)	3,7 (normal)	26,6 (normal)	0,68 (low)	0,07 (low)	ND	
		011-046	mother	AANAT +/-	-	no MR	no MR	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			proband (M)	AANAT R53C/+ AANAT T110M/+	autism ?	no MR ?	590 (normal) 446 (normal) 161 (normal)	ND ND ND	ND ND ND	ND ND ND	4,6 (normal) 4,1 (normal) 2,8 (low)	32,9 (normal) 31,4 (normal) 29,7 (normal)	0,46 (low) 0,09 (normal) 1,2 (normal)
AANAT A157V	benign	RD-133	father	AANAT +/-	autism	no MR	ND	522 (normal)	3,6 (normal)	32,9 (normal)	0,65 (low)	0,07 (low)	ND
			mother	AANAT A157V/+	-	no MR	ND	152 (normal)	4,1 (normal)	39,7 (high)	0,55 (low)	0,06 (low)	ND
		RD-228	proband (M)	AANAT A157V/+	autism	no MR	no sleep disorders	1297 (high)	3,7 (normal)	34,1 (normal)	0,65 (low)	0,05 (low)	ND
			proband (M)	AANAT A163V/+	Asperger, MDD	no MR	phase delay, insomnia, nightmares	716 (high)	5 (normal)	33,4 (normal)	0,87 (low)	0,08 (low)	no
ASMT L11F	damaging	RD-251	proband (M)	AANAT A163V/+ ASMT +/-	Asperger	no MR	no sleep disorders	1063 (high)	3,8 (normal)	48,3 (high)	0,18 (low)	0,02 (low)	ND
			father	ASMT +/-	-	no MR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		RD-223	mother	ASMT L11F/+	-	no MR	no sleep disorders	265 (normal)	3,6 (normal)	30,0 (normal)	0,93 (low)	0,09 (normal)	no
			proband (M)	ASMT L11F/+ ASMT N17K/+	PDD-NOS MDD, SAD	no MR	no sleep disorders	96 (normal)	4,2 (normal)	40,2 (high)	0,73 (low)	0,25 (normal)	no
ASMT N17K	damaging	RD-223	father	ASMT +/-	OCS	no MR	no sleep disorders	147 (normal)	4,7 (normal)	35,6 (normal)	1,05 (normal)	0,17 (normal)	no
			sister	ASMT N17K/+	SAD	no MR	no sleep disorders	104 (normal)	4,7 (normal)	42,2 (high)	0,99 (low)	0,08 (low)	yes (morning and evening)
		FRA-036	proband (M)	ASMT N17K/+ ASMT I269M/+	autism, PDAG, OCD, ADHD, tics	mild MR	phase delay, insomnia	280 (normal)	2,3 (low)	46,4 (high)	0,81 (low)	0,1 (normal)	yes (morning only)
			affected brother	ASMT +/-	autism	no MR	no sleep disorders	558 (normal)	4,4 (normal)	41,7 (high)	0,47 (low)	0,06 (low)	ND
ASMT I269M	damaging	RD-251	mother	ASMT I269M/+	-	no MR	no sleep disorders	481 (normal)	4,3 (normal)	47,6 (high)	0,85 (low)	0,08 (low)	ND
			sister	ASMT +/-	MDD	no MR	no sleep disorders	653 (normal)	5,1 (normal)	72,0 (high)	0,27 (low)	0,04 (low)	ND
		RD-223	proband (M)	ASMT I269M/+	autism, ADHD	moderate MR	no sleep disorders	548 (normal)	3,6 (normal)	25,0 (normal)	1,38 (normal)	0,14 (normal)	ND
			affected brother	ASMT +/-	autism	no MR	no sleep disorders	507 (normal)	3,9 (normal)	34,0 (normal)	0,86 (low)	0,05 (low)	ND

ASMT C273S	damaging	RD-112	mother	ASMT C273S/+	-	no MR	no sleep disorders	289 (normal)	4,7 (normal)	37,0 (normal)	0,86 (low)	0,08 (low)	ND
			father	ASMT C273S/+	autism	no MR	no sleep disorders	190 (normal)	3,7 (normal)	24,9 (normal)	0,85 (low)	0,04 (low)	ND
ASMT M198R	benign ^a	RD-067	mother	ASMT +/-	-	no MR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			proband (F)	ASMT M198R/+	autism	severe MR	phase delay	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			father	ASMT +/-	Tics	no MR	phase delay, insomnia	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		FRA-033	mother	ASMT CNV/+	MDD	no MR	hypersomnia, nightmares	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			proband (M)	ASMT CNV/+	autism, Tics, TS	no MR	insomnia, nightmares	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			affected brother	ASMT CNV/+	Asperger, ADHD, Tics	no MR	phase delay	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		RD-202	father	ASMT +/-	-	no MR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			mother	ASMT CNV/+	-	no MR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			proband (M)	ASMT CNV/+	autism	moderate MR	ND	573 (normal)	0,88 (low)	33,2 (normal)	0,53 (low)	0,05 (normal)	ND
		RD-180	father	ASMT +/-	-	no MR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			mother	ASMT CNV/+	-	no MR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			proband (F)	ASMT CNV/+	autism	MR	ND	306 (normal)	2,6 (low)	11,4 (normal)	1,44 (normal)	0,1 (normal)	ND
			father	ASMT CNV/+	-	no MR	somnambulism, nightmares	654 (normal)	3,7 (normal)	24,7 (normal)	1,58 (normal)	0,16 (normal)	ND
ASMT CNV	ND	RD-284	mother	ASMT +/-	OCD, Tics, TS	no MR	no sleep disorders	340 (normal)	5,6 (normal)	56 (high)	0,29 (low)	0,04 (low)	ND
			proband (M)	ASMT CNV/+	autism	no MR	insomnia	370 (normal)	3,01 (low)	47,2 (high)	0,85 (low)	0,09 (normal)	ND
			mother	ASMT CNV/+	-	no MR	no sleep disorders	532 (normal)	3,8 (normal)	31,5 (normal)	0,65 (low)	0,05 (low)	ND
		RD-281	proband (M)	ASMT CNV/+	autism	no MR	insomnia	391 (normal)	1,89 (low)	39,6 (high)	0,49 (low)	0,06 (low)	ND
			father	ASMT CNV/+	-	no MR	phase delay	109 (normal)	2,1 (low)	37 (normal)	0,86 (low)	0,29 (normal)	yes (morning only)
			mother	ASMT CNV/+	GA	no MR	no sleep disorders	146 (normal)	2,4 (low)	32,9 (normal)	1,48 (normal)	0,25 (normal)	no
		RD-209	proband (M)	ASMT CNV/+	autism, OCD	moderate MR	nocturnal terror, nightmares	947 (high)	2,6 (low)	47,4 (high)	0,66 (low)	0,08 (low)	no
			sister	ASMT CNV/+	-	no MR	no sleep disorders	103 (normal)	2,5 (low)	43,2 (high)	0,51 (low)	0,20 (normal)	yes (morning only)
			father	ASMT +/-	-	no MR	insomnia	325 (normal)	4,7 (normal)	37 (normal)	0,69 (low)	0,06 (low)	no
		001-018	mother	ASMT CNV/+	MDD	no MR	phase delay	164 (normal)	4,7 (normal)	30 (normal)	0,90 (low)	0,1 (normal)	yes (evening only)
			proband (M)	ASMT CNV/+	autism	no MR	insomnia	285 (normal)	3,1 (low)	46,6 (high)	0,26 (low)	0,02 (low)	yes (morning and evening)
		001-024	proband (M)	ASMT CNV/+	Asperger, Tics, PDAG	no MR	no sleep disorders	222 (normal)	3,3 (normal)	27,8 (normal)	0,95 (low)	0,1 (normal)	no

2.8. Discussion : Caractérisation biochimique de la voie sérotonine-mélatonine chez les patients avec TSA

2.8.1. Anomalies de synthèse de la mélatonine

Notre étude a permis de caractériser la voie sérotonine-mélatonine dans différents milieux biologiques issus de patients avec TSA : sang, salive, tissu intestinal et glande pinéale. La mélatonine ainsi que l'activité de ses deux enzymes de synthèse, AANAT et ASMT, apparaissent diminuées chez les patients avec TSA, aussi bien dans le sang (plaquettes) que dans le tissu intestinal et dans la glande pinéale. Dans les plaquettes sanguines, la réduction de l'activité ASMT est presque constamment associée au déficit en mélatonine, et une réduction de l'activité AANAT est également retrouvée dans près de la moitié des cas de déficit. Ces données confirment les études précédentes qui rapportaient un déficit en mélatonine chez les patients avec TSA (Kulman et al., 2000, Nir et al., 1995, Tordjman et al., 2005, Melke et al., 2008). En outre, notre exploration exhaustive de la synthèse de la mélatonine permet de proposer un mécanisme biochimique à ce déficit, qui résulte d'une réduction de l'activité de l'une ou des deux enzymes de synthèse, AANAT et ASMT.

Les anomalies de synthèse de la mélatonine semblent un trait fréquent dans les TSA : sur la base des prélèvements sanguins issus de près de 200 patients, on peut estimer la prévalence de ces anomalies entre 60 et 70%. Ces chiffres concordent avec ceux rapportés dans l'étude de (Tordjman et al., 2005), où 65% des patients étudiés (n=49) présentaient une réduction de l'excrétion urinaire de la 6-sulfatoxymélatonine, métabolite majoritaire de la mélatonine. Cette fréquence élevée a permis de mettre en évidence ces anomalies dans les tissus post mortem malgré le petit nombre d'échantillons disponibles.

Les explorations de la voie sérotonine-mélatonine *in vivo* sont basées sur des prélèvements sanguins effectués le matin. La sécrétion de la mélatonine par la glande pinéale est caractérisée par un rythme circadien marqué, avec une sécrétion nocturne abondante et une sécrétion diurne faible. Ainsi, un dosage de la mélatonine plasmatique le matin correspond à la fin du pic nocturne de mélatonine, ou aux valeurs faibles de la journée, et est à première vue un marqueur peu informatif de la sécrétion de mélatonine. Toutefois, la forte cohérence observée entre la mélatonine plasmatique dosée le matin et les activités plaquettaires des enzymes de synthèse constitue une validation

rétrospective de ce dosage de mélatonine plasmatique comme marqueur de la capacité de synthèse de la mélatonine. Néanmoins, un prélèvement unique le matin ne permet pas de discriminer entre une anomalie circadienne de la phase de sécrétion et une anomalie quantitative de la synthèse. Pour avoir accès aux concentrations de mélatonine nocturnes et explorer la composante circadienne, un protocole d'étude du cycle nyctéméral de la mélatonine a été mis en place, basé sur des recueils de salive effectués à plusieurs moments de la journée, du réveil au coucher. Les recueils de salive sont non invasifs et peuvent être réalisés de manière autonome par les participants en ambulatoire, ce qui a permis une bonne adhésion à l'étude.

De manière surprenante, l'étude du cycle salivaire de la mélatonine n'a pas mis en évidence de différence majeure entre les patients et les témoins. Une tendance à la réduction de la concentration de mélatonine salivaire est observée au réveil chez les enfants, et une tendance à l'avance de la phase de sécrétion est observée le soir chez les adultes. Globalement, la proportion de sujets présentant un pic détectable de mélatonine n'est pas différente entre les patients et le groupe témoin. Cette étude comporte plusieurs limites :

- un plus faible nombre de patients investigués, qui, combiné à la nécessité d'une stratification par l'âge et à l'importante variabilité interindividuelle qui caractérise la sécrétion de mélatonine, réduit la puissance statistique.
- une investigation limitée à la sécrétion diurne et à la phase initiale du pic de sécrétion de mélatonine nocturne, qui ne permet pas d'évaluer l'amplitude du pic de sécrétion de mélatonine.
- un protocole réalisé en ambulatoire, dans des conditions non contrôlées, en particulier d'exposition à la lumière (qui inhibe la sécrétion de mélatonine), même si l'instruction est donnée aux sujets de limiter les sources lumineuses. Environ la moitié des enfants et plus des deux tiers des adultes investigués (patients comme témoins) ne présentent pas de pic de mélatonine détectable à 22h, ce qui limite la sensibilité de l'étude. Dans l'étude en conditions contrôlées de Burgess et Fogg (2008), portant sur 170 adultes, l'heure de DLMO (*Dim light melatonin onset*) présentait une distribution normale centrée sur 20h30, et survenait avant 22h pour plus de 75% des sujets.

- de faibles performances analytiques de la technique ELISA utilisée pour le dosage de la mélatonine salivaire, en particulier pour les valeurs faibles. En outre, des interférences analytiques ne peuvent être exclues.

Globalement et malgré ces limitations, ces résultats suggèrent que les patients avec TSA ne présentent pas d'anomalies majeures du rythme de sécrétion de la mélatonine. Le cycle nyctéméral du cortisol semble également préservé. L'hypothèse privilégiée est que la phase de sécrétion de la mélatonine (composante circadienne) est préservée, mais que l'amplitude du pic (composante quantitative de la synthèse) est réduite.

La validation formelle de cette hypothèse nécessiterait d'évaluer de manière plus exhaustive la sécrétion de mélatonine par des prélèvements sanguins ou salivaires répétés régulièrement sur 24h, y compris la nuit, pour déterminer la phase et l'amplitude du pic nocturne de sécrétion de mélatonine. Une approche moins contraignante consiste à doser la 6-sulfatoxymélatonine dans des urines recueillies sur 24h, fractionnées pour avoir une indication approximative de la phase de sécrétion. Toutefois, la sulfoconjugaison de la 6-hydroxymélatonine, comme la sérotonine, est catalysée par les phénol sulfotransférases, et ce catabolisme risque d'être perturbé chez les patients avec TSA.

Les mécanismes moléculaires des anomalies de synthèse de la mélatonine seront discutés ultérieurement (section 3.5)

2.8.2. Anomalies de la N-acétylsérotonine

Outre le déficit en mélatonine, les anomalies des enzymes AANAT et ASMT ont pour corollaire une accumulation de la N-acétylsérotonine, métabolite intermédiaire entre la sérotonine et la mélatonine. La NAS est dotée d'une activité biologique propre : elle est agoniste du récepteur TrkB, récepteur canonique du facteur neurotrophique BDNF (Jang et al., 2010), et régule la neurogenèse en stimulant la prolifération des progéniteurs neuronaux (Sompol et al., 2011).

Nos données montrent une augmentation des taux de NAS dans les plaquettes sanguines et les tissus digestifs des patients avec TSA, qui semble directement corrélée à la diminution de l'activité ASMT, ce qui suggère un phénomène d'accumulation de substrat en amont d'un blocage enzymatique. Toutefois, dans les glandes pinéales, qui constituent la source majoritaire de NAS, le taux de NAS mesuré chez les patients n'est pas augmenté par rapport aux témoins. Cette discordance avec les tissus périphériques

semble pouvoir être expliquée par une différence de stoechiométrie des enzymes AANAT et ASMT. Dans les plaquettes sanguines et les échantillons d'iléons, l'activité AANAT est supérieure d'un facteur 3 à 4 à l'activité ASMT, chez les témoins comme chez les patients ; ASMT est donc l'enzyme limitante. À l'inverse, dans les glandes pinéales, l'activité ASMT est supérieure à l'activité AANAT. Dans les échantillons issus des patients avec TSA, l'activité enzymatique des deux enzymes est réduite de manière proportionnée : le ratio ASMT/AANAT n'est pas modifié par rapport aux témoins. La synthèse de la NAS par AANAT est donc réduite dans les mêmes proportions que son catabolisme par ASMT, ce qui explique qu'elle ne s'accumule pas. Néanmoins, il est possible qu'une accumulation de NAS se produise dans le système nerveux central des patients, même en l'absence d'accumulation dans la glande pinéale : il existe en effet une expression cérébrale « extra-pinéale » de l'enzyme AANAT ainsi qu'une production de NAS dans l'hippocampe, le cervelet et le tronc cérébral (Brown et al., 1984, Simonneaux et Ribelayga, 2003), encore mal caractérisée sur le plan biochimique, mais qui pourrait être altérée dans les TSA.

2.8.3. Sérotonine/mélatonine : voie commune, anomalies indépendantes ?

Si l'hypersérotoninémie et le déficit en mélatonine sont deux endophénotypes fréquents dans les TSA et relèvent de la même voie métabolique, nos données suggèrent que ces deux anomalies sont des phénomènes indépendants. Les anomalies des activités AANAT et ASMT au niveau plaquettaire ne sont pas associées à l'hypersérotoninémie plus que ne le prédit l'hypothèse d'indépendance des variables. Seule la réduction de la mélatonine plasmatique est faiblement, mais significativement, associée au phénotype d'hypersérotoninémie. Au niveau tissulaire, les anomalies de la synthèse de mélatonine, observées tant pour la principale source de mélatonine (glande pinéale) que pour la principale source de sérotonine (tractus digestif), ne s'accompagnent pas d'une augmentation du contenu tissulaire en sérotonine, vraisemblablement car la voie de synthèse de la mélatonine est extrêmement minoritaire sur le plan quantitatif parmi les différentes voies cataboliques de la sérotonine. Ainsi, l'excrétion normale du 5-HIAA (métabolite majoritaire de la sérotonine, qui peut être considéré comme une approximation du métabolisme total de la sérotonine) est de 2 à 9 mg / 24h (Tyce, 1990), alors que l'excrétion normale de la 6-sulfatoxymélatonine (considérée comme une approximation du métabolisme total de la mélatonine) est de 10 à 80 µg / 24h. Ainsi, la synthèse de mélatonine ne représente que 1% environ du catabolisme de la

sérotonine. Du point de vue quantitatif, il est donc peu probable qu'un blocage de cette voie catabolique suffise à provoquer une accumulation de sérotonine.

2.8.4. Les anomalies de voie sérotonine-mélatonine, facteurs de vulnérabilité aux TSA

Les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine sont fréquentes chez les patients avec TSA, de 40% pour le déficit en AANAT à 75% pour le déficit en ASMT plaquettaire. Ces anomalies apparaissent donc comme des facteurs de risque de TSA, avec des odds-ratio de l'ordre de 6 à 25 selon les paramètres considérés.

Toutefois, la pénétrance de ces facteurs de risque semble largement incomplète, dans la mesure où les anomalies sont également retrouvées chez les apparentés non atteints. Ainsi, 50% environ des parents et des frères et sœurs non atteints de patients avec TSA présentent un déficit d'activité ASMT plaquettaire, ce qui suggère que les anomalies de synthèse de la mélatonine ne sont pas suffisantes pour causer un TSA, mais s'additionnent à d'autres facteurs.

La fréquence élevée de ces anomalies révèle un certain niveau d'homogénéité des endophénotypes biochimiques chez les patients avec TSA, observation presque surprenante compte tenu de l'importante hétérogénéité clinique et génétique des TSA. Ceci suggère que les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine interagissent avec une ou plusieurs voies physiopathologiques majeures des TSA. En particulier, les anomalies de la synthèse de la mélatonine sont susceptibles de potentialiser des altérations de l'homéostasie synaptique, soit par la modulation directe, récepteurs-dépendante, de l'activité synaptique par la mélatonine, soit par l'intermédiaire d'une augmentation du stress oxydant, soit indirectement en conséquence des troubles du sommeil, soit encore par l'augmentation de la NAS. De même, une altération centrale du système sérotoninergique, même si elle est encore spéculative, est susceptible de perturber la transmission synaptique. Enfin, un déficit en mélatonine peut également potentialiser les dysfonctions immunitaires ou le stress oxydant décrits chez les patients avec TSA (cf. introduction, section 3).

En marge des endophénotypes documentés chez les patients avec TSA, les altérations chez les parents, et en particulier chez la mère, sont susceptibles de constituer un facteur de risque indépendant. Ainsi, des études chez l'homme comme chez l'animal ont mis en évidence un effet d'altérations du système sérotoninergique maternel sur le phénotype de la descendance, indépendamment du statut des descendants eux-mêmes vis-à-vis des

anomalies sérotoninergiques : il a été montré que la sérotonine maternelle influence le développement embryonnaire chez la souris (Cote et al., 2007), et les altérations de la synthèse de sérotonine chez la mère constitueraient un facteur de risque de TDAH pour la descendance chez l'homme (Halmoy et al., 2010). Dans cette perspective, une altération de la voie sérotonine-mélatonine chez la mère pourrait influencer le phénotype de la descendance. En particulier, l'observation d'un déficit en mélatonine chez les parents, non nécessairement transmis à l'enfant atteint, suggère que ce déficit parental pourrait constituer un facteur de risque. Le déficit en mélatonine est significativement plus fréquent chez les mères (45%) que chez les pères (29%), de même que le déficit en ASMT et l'augmentation de NAS. La mélatonine est un composé lipophile qui diffuse à travers la barrière placentaire, et pourrait moduler le développement fœtal par des mécanismes dépendants des récepteurs MT1 et MT2, exprimés dans le cerveau fœtal (Kong et al., 2008), ou encore par ses propriétés antioxydantes (Lezoualc'h et al., 1996). Un déficit maternel en mélatonine pourrait donc constituer un facteur de risque indépendant.

2.8.5. Corrélats cliniques

L'étude des corrélats cliniques des altérations de la voie sérotonine-mélatonine au niveau sanguin a permis de mettre en évidence des associations entre ces altérations biochimiques et certains traits cliniques. De manière surprenante, les paramètres biochimiques fortement corrélés entre eux, tels que l'augmentation de la NAS plaquettaire, la diminution de l'activité ASMT plaquettaire et la mélatonine plasmatique, présentent des corrélats cliniques distincts, ce qui peut suggérer que l'impact physiopathologique de ces différentes altérations est variable et spécifique de chaque paramètre.

L'hypersérotoninémie n'a pas été associée à des traits cliniques particuliers par les études précédentes. Les associations significatives rapportées par certaines études (Herault et al., 1996 avec les atteints neurologiques, Kolevzon et al., 2010 avec les comportements auto-agressifs) n'ont pas été répliquées. Notre étude, malgré les grands effectifs étudiés, ne permet pas non plus de répliquer ces résultats. L'association mise en évidence d'après nos données entre l'hypersérotoninémie et une moindre atteinte des capacités sociales, basée sur les scores de l'ADI et dans une moindre mesure sur la SRS (échelle de réciprocité sociale), n'a pas été décrite par les études précédentes. La SRS est un instrument quantitatif, plus approprié pour ce type d'études que l'ADI, mais

n'était disponible pour notre étude que pour un plus petit effectif (n=77) ; une étude à plus grande échelle serait requise pour confirmer la tendance observée. L'association peut être également être fortuite ; quoi qu'il en soit, l'effet observé est de faible amplitude.

Le déficit en mélatonine a été rapporté comme étant associé avec le retard de langage (Tordjman et al., 2005). Nos données tendent à répliquer ce résultat : la réduction de l'activité ASMT plaquettaire est associée plus fréquemment au diagnostic d'autisme, et moins fréquemment au diagnostic de syndrome d'Asperger, qui se distingue de l'autisme par un langage normal et des capacités intellectuelles systématiquement préservées. Une échelle quantitative d'évaluation de la communication, comme la CCC (*Children's Communication Checklist*) serait utile pour confirmer ce résultat. Nir et al. (1995), dans la première description des anomalies de la mélatonine chez les patients avec TSA, rapportaient une association avec les anomalies de l'EEG, cohérente avec les propriétés antiépileptiques attribuées à la mélatonine (Solmaz et al., 2009) ; toutefois cette association n'est pas retrouvée dans notre étude, sans doute limitée par le faible nombre de patients présentant des anomalies à l'EEG (n=19). Par ailleurs, le déficit en mélatonine tend à être associé à la présence de dysmorphies, tendance non significative qui serait à confirmer sur un plus grand effectif, et est significativement associée à l'augmentation du périmètre crânien.

Les propriétés d'agoniste TrkB de la NAS en faisaient un candidat possiblement impliqué dans la macrocéphalie associée aux TSA. Toutefois, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence d'association entre l'augmentation de la NAS plaquettaire et l'augmentation du périmètre crânien. La NAS plaquettaire est un marqueur périphérique ; les corrélations avec les taux de NAS dans le système nerveux central et la glande pinéale ne sont pas connues. Il n'a d'ailleurs pas été détecté d'augmentation de la NAS dans les glandes pinéales de patients avec TSA. L'étude d'association peut par ailleurs être biaisé par l'hétérogénéité d'âge de la cohorte étudiée. En effet, si le périmètre crânien est bien corrélé au volume cérébral chez les jeunes enfants, la corrélation est plus faible après 6 ans (Bartholomeusz et al., 2002) ; par ailleurs la NAS plaquettaire varie de manière non linéaire avec l'âge. Une étude ciblée portant une cohorte plus homogène de jeunes enfants permettrait de mieux documenter l'hypothèse d'une implication de l'accumulation de NAS dans la macrocéphalie associée aux TSA.

Quoi qu'il en soit, l'augmentation de la NAS plaquettaire semble plus fréquente chez les patients présentant des capacités intellectuelles préservées.

Par ailleurs, l'augmentation de la NAS ainsi que la réduction de l'activité AANAT plaquettaire, apparaissent significativement associés aux troubles du sommeil. Cette association peut refléter indirectement l'effet du déficit en mélatonine, même si aucune association significative n'est mise en évidence avec la mélatonine elle-même – la mélatonine dosée sur un prélèvement effectué le matin peut ne pas être un marqueur optimal. Un rôle direct de la NAS dans la régulation des rythmes veille-sommeil n'est pas à exclure, mais n'est pas documenté. L'investigation des troubles du sommeil réalisée pour cette étude est limitée, une évaluation plus complète du sommeil (latence d'endormissement et temps de sommeil total pour l'insomnie, amplitude du décalage pour le retard de phase...) et du rythme circadien de la mélatonine permettrait de mieux documenter cette association.

Il n'a pas été mis en évidence d'associations avec les comorbidités psychiatriques, dont certaines (dépression) ont été rapportées comme étant associées à des anomalies circadiennes de la mélatonine (Lewy, 2009). Toutefois, les effectifs investigués sont faibles (n=26 patients présentant une dépression comorbide, par exemple) et limitent la puissance statistique de l'étude. Les altérations de la mélatonine pourraient être des endophénotypes transnosographiques, peu spécifiques d'une entité clinique donnée. Outre les TSA, les anomalies des gènes impliqués dans la synthèse de la mélatonine ont donc été investiguées dans des pathologies neurodéveloppementales connexes.

3. ETUDES MOLECULAIRES DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DE LA MELATONINE DANS D'AUTRES PATHOLOGIES NEURO-DEVELOPPEMENTALES, IMPACT FONCTIONNEL DES MUTATIONS RARES.

Les anomalies génétiques impliquées dans les TSA sont souvent communes à d'autres troubles neurodéveloppementaux et/ou psychiatriques. Dans cette perspective, une étude moléculaire du gène *ASMT* a donc été effectuée dans une cohorte de patients atteints de retard mental, afin de déterminer si une mutation dans ce gène constitue un facteur de risque pour cette pathologie. La mélatonine est considérée comme un synchroniseur des rythmes circadiens, incluant les rythmes veille-sommeil, et les troubles du sommeil semblent associés à plusieurs pathologies neuropsychiatriques. En outre, les anomalies de la synthèse de la mélatonine semblent associées aux troubles du sommeil dans les TSA. Il est donc possible que la mélatonine soit un facteur de susceptibilité aux troubles du sommeil, et, secondairement, à des pathologies neuropsychiatriques. Une étude moléculaire des gènes *AANAT* et *ASMT* a été réalisée dans une cohorte de patients présentant des troubles du sommeil associés à une pathologie neurodéveloppementale. Nous discuterons également des recherches de mutations rares des gènes intervenant dans la synthèse de la mélatonine chez des patients avec TDAH (annexe 3 : Chaste et al, 2011) et chez des patients avec trouble bipolaire (annexe 4 : Etain et al, 2012), auxquelles nous avons collaboré.

L'impact fonctionnel de tous les variants rares sur la fonction des enzymes a été déterminé par des approches *in silico* (algorithmes prédictifs basés sur la conservation phylogénique et sur les propriétés physico-chimiques des acides aminés) et *in vitro* (mutagenèse dirigée). Pour les mutations dans le gène *ASMT*, ces résultats ont été confrontés aux relations structure-activité révélées par la détermination de la structure tridimensionnelle de l'enzyme ASMT. Enfin, nos analyses d'expression génique suggèrent que des facteurs épigénétiques sont susceptibles de moduler l'expression des mutations du gène *ASMT*.

3.1. Mutations rares dans le gène *ASMT* associées au retard mental

Article :

Mutation screening of *ASMT*, the last enzyme of the melatonin pathway, in a large sample of patients with Intellectual Disability.

C. Pagan, H. Goubran-Botros, K. Poirier, A. Dumaine, S. Jamain, S. Moreno, A. de Brouwer, H. Van Esch, R. Delorme, JM. Launay, A. Tzschach, V. Kalscheuer, D. Lacombe, S. Briault, F. Laumonnier, M. Raynaud, B.W van Bon, M.H Willemsen, M. Leboyer, J. Chelly, T. Bourgeron.

BMC Medical Genetics. 2011. 12:17.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Mutation screening of *ASMT*, the last enzyme of the melatonin pathway, in a large sample of patients with Intellectual Disability

Cecile Pagan^{1,2,3}, Hany Goubran Botros^{1,2}, Karine Poirier^{3,4}, Anne Dumaine⁵, Stéphane Jamain^{5,6}, Sarah Moreno^{1,2}, Arjan de Brouwer⁷, Hilde Van Esch⁸, Richard Delorme^{1,2}, Jean-Marie Launay^{3,9}, Andreas Tzschach¹⁰, Vera Kalscheuer¹⁰, Didier Lacombe¹¹, Sylvain Briault^{12,13}, Frédéric Laumonnier^{14,15,16}, Martine Raynaud^{14,15,16,17}, Bregje W van Bon⁷, Marjolein H Willemsen⁷, Marion Leboyer^{5,6,18,19}, Jamel Chelly^{3,4}, Thomas Bourgeron^{1,2,20*}

Abstract

Background: Intellectual disability (ID) is frequently associated with sleep disorders. Treatment with melatonin demonstrated efficacy, suggesting that, at least in a subgroup of patients, the endogenous melatonin level may not be sufficient to adequately set the sleep-wake cycles. Mutations in *ASMT* gene, coding the last enzyme of the melatonin pathway have been reported as a risk factor for autism spectrum disorders (ASD), which are often comorbid with ID. Thus the aim of the study was to ascertain the genetic variability of *ASMT* in a large cohort of patients with ID and controls.

Methods: Here, we sequenced all exons of *ASMT* in a sample of 361 patients with ID and 440 controls. We then measured the *ASMT* activity in B lymphoblastoid cell lines (BLCL) of patients with ID carrying an *ASMT* variant and compared it to controls.

Results: We could identify eleven variations modifying the protein sequence of *ASMT* (ID only: N13H, N17K, V171M, E288D; controls only: E61Q, D210G, K219R, P243L, C273S, R291Q; ID and controls: L298F) and two deleterious splice site mutations (IVS5+2T>C and IVS7+1G>T) only observed in patients with ID. We then ascertained *ASMT* activity in B lymphoblastoid cell lines from patients carrying the mutations and showed significantly lower enzyme activity in patients carrying mutations compared to controls ($p = 0.004$).

Conclusions: We could identify patients with deleterious *ASMT* mutations as well as decreased *ASMT* activity. However, this study does not support *ASMT* as a causative gene for ID since we observed no significant enrichment in the frequency of *ASMT* variants in ID compared to controls. Nevertheless, given the impact of sleep difficulties in patients with ID, melatonin supplementation might be of great benefit for a subgroup of patients with low melatonin synthesis.

Background

Intellectual disability (ID), is defined as $IQ < 70$ and is associated with functional deficits in adaptive behavior, such as daily-living skills, social skills and communication. It affects 1-3% of the general population and results from heterogeneous environmental, chromosomal and monogenic causes [1]. Besides the cognitive deficit, patients with ID often present with sleep

disorders, which are persistent and a burden for the patients and their families. The most commonly reported disorders are delayed settling to sleep and frequent waking at night, with frequencies ranging from 58 up to 86% [2-4]. Several therapeutic strategies have been considered for treating sleep disturbances in ID. Among them, pharmacological use of melatonin was demonstrated to be efficient in several studies, recently reviewed in a meta-analysis [5]: exogenous melatonin appeared to decrease sleep latency and number of wakes per night, and increase total sleep time in individuals

* Correspondence: thomasb@pasteur.fr

¹Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

with ID. This positive effect of melatonin treatment could suggest that, in some patients with ID, endogenous melatonin level may not be sufficient to adequately set the sleep-wake cycles.

Melatonin is considered as a major biological signal of day-night rhythms, and thus a major endogenous "Zeitgeber" (time-giver). It is synthesized in the dark in the pineal gland from serotonin, first acetylated by arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) and then converted into melatonin by acetyl serotonin methyltransferase (ASMT also known as hydroxyindole O-methyltransferase or HIOMT). Besides sleep induction and circadian rhythms regulation, melatonin is also involved in various other physiologic functions, including immune response, antioxydative defense, metabolic regulations and memory [6-8]. Abnormal melatonin synthesis or signaling was reported as a risk factor for diverse medical conditions such as diabetes, circadian and psychiatric disorders [9-14]. Among these, autism spectrum disorders (ASD) - which are also often associated with ID and with sleep disorders - have been associated with low melatonin levels in at least four independent studies [15-18]. Melke *et al* [17] showed that melatonin deficit in patients with autism is correlated with low activity of the ASMT enzyme, and, in some patients, associated with mutations in the *ASMT* gene. This study provided the first insight into a molecular mechanism for melatonin deficit associated with neurodevelopmental disorders.

We hypothesized that patients with ID could carry deleterious *ASMT* mutations. If this was the case, these mutations might act as risk factors for sleep/circadian disorders and subsequently exacerbate the effect of independent genetic/environmental causes of ID. To address this question, we first screened the *ASMT* gene for rare variants in 361 patients with ID and 440 controls. For patients carrying *ASMT* mutations, we then measured the ASMT activity in B lymphoblastoid cell lines (BLCL) and if available provided information on sleep.

Methods

Subjects

In this study, we tested 361 clinically characterized male patients with established or putative X-linked ID, collected by the European XLMR Consortium (France, Belgium, Germany and the Netherlands). This panel included 182 established X-linked ID families characterized by at least two boys affected in two different generations and 113 brother-pair families with two or more affected brothers. Of 66 families, the exact number of affected males is not known, but linkage to the X chromosome was highly suspected. To study the frequency of *ASMT* mutations, we did not exclude from this cohort 68 previously described families with established

X-linked mutations. The majority of the patients were from European ancestry. All samples were obtained after receiving informed consent. CGG expansions for fragile X syndrome, assessed by Southern blot analysis using DNA digested with EcoRI/EagI endonucleases and an StB12-3 probe corresponding to FRAXA, were excluded. Unrelated healthy controls of French origin (n = 220, 155 males, 65 females) were recruited among blood donors in two French university hospitals (Pitié-Salpêtrière and Henri-Mondor hospitals, Paris, France). Unrelated Swedish participants from the general population (n = 220, 142 males, 78 females) were recruited through advertisements. The local research ethics boards reviewed and approved the study. Informed consent was obtained from all participants.

Screening of the *ASMT* gene for rare variations

DNA was extracted from blood cells by the phenol/chloroform method. All PCRs were performed with Qiagen HotStar Taq kit. Primers and PCR conditions have been described previously [17]. PCR products were sequenced with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (V3.1, Applied Biosystems) and then subjected to electrophoresis, using an ABI PRISM genetic analyzer (Applied Biosystems). For all non-synonymous mutations, genotyping was confirmed by sequencing of an independent PCR product. The nomenclature of genetic variations was determined according to reference protein sequence ENSP00000370627 in Ensembl database (345 aa). *In silico* functional predictions were assessed using PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) algorithms.

Measurement of ASMT enzyme activity in BLCL

BLCL were established from EBV-transformed lymphocytes according to standard protocol, and grown at 37°C in RPMI-1640 medium (Life Technologies Inc.) supplemented with undialysed fetal calf serum, 2 mM glutamine, 2,5 mM sodium, 100 mg/mL streptomycin and 100 IU/mL penicillin, under standard conditions. ASMT enzyme activities were determined on BLCL pellets, at least in duplicate, by radioenzymology, as described previously [17], after lysis with 100 hemolytic units of a purified SH-activated toxin (streptolysin O, generously provided by Prof. J. Alouf, Institut Pasteur, Paris).

Results

Non-synonymous variants in the *ASMT* gene

We investigated whether rare non-synonymous variations in the *ASMT* gene could be identified in patients with ID by directly sequencing all *ASMT* exons in 361 patients with ID and 440 controls. Thirteen variants affecting exonic or splice-site sequences were identified, involving eight patients and eight controls (Table 1). Six

Table 1 ASMT mutations identified in 361 patients with ID and 440 controls

Variant	ID Patients (n = 377)	Controls (n = 440)	Functional prediction (Polyphen/SIFT)
ID only			
N13H	1	0	Benign/tolerated
N17K*	1	0	Possibly damaging/tolerated
V171M	1	0	Possibly damaging/affects protein function
IVS5+2T > C	1	0	Damaging
IVS7+1G > T	1	0	Damaging
E288D	2	0	Benign/tolerated
ID and Controls			
L298F	1	2	Possibly damaging/affects protein function
Controls only			
E61Q	0	1	Benign/tolerated
D210G	0	1	Probably damaging/affects protein function
K219R	0	1	Benign/tolerated
P243L	0	1	Probably damaging/affects protein function
C273S	0	1	Probably damaging/affects protein function
R291Q	0	1	Probably damaging/tolerated

* N17K variant is rs17149149 and is mentioned in the SNP database at an allelic frequency of 6.7% in the Han Chinese population.

of them were only found in patients and not in controls. Those include two splice site variants, which affect the splicing donor sites of intron 5 (IVS5+2T>C) and intron 7 (IVS7+1G>T). Both are predicted to introduce a stop codon shortly after the nucleotide change, and thus lead to a truncated protein. Interestingly, in five patients carrying an *ASMT* variant, a genetic cause for ID had been identified previously (Table 2). The patient with the N17K variant is a boy carrying a mutation in *ZNF41*. One of the two patients

with an E288D variant is a boy diagnosed with FG syndrome. The index patient with the L298F variant is carrier of a mutation in the *MCT8* gene. The patient with the IVS7+1G>T variant is a boy displaying the 24 bp duplication of *ARX* exon 2, and has one brother also carrying both *ASMT* variant and the same *ARX* duplication. The patient with the V171M variant is a boy carrying a duplication of *MECP2*. The other patients with *ASMT* variants have no known genetic anomaly involved in ID.

Table 2 Clinical observations and ASMT activity in B lymphoblastoid cell line of patients with ID and ASMT mutations

Individuals	Variants	ASMT activity (pmol/mg prot/ 30 min)	Clinical observations	Other known genetic anomalies
Patient D27	N13H	1.5	Mild ID. No other abnormalities or autistic features.	None
Patient P42	N17K	1.2	IQ:76, hyperkinesia, language delay, attention deficit and impulsivity, no epilepsy, no dysmorphic features.	ZNF41 mutation
Patient D33	V171M	1.6	Moderate ID, spasticity and severe language delay. No sleep-wake anomaly.	MECP2 duplication
Patient N6	IVS5+2T>C	0.9	Some autistic features; some compulsive behavior. Normal sleep pattern, although sleeps lightly and is easily wakened.	None
Patient P104	IVS7+1G>T	ND	Moderate ID, hyperactivity, attention deficit. No dysmorphic features. No evidence for sleeping problems or autistic features.	ARX duplication
Patient N79	E288D	0.9	Mild ID, epilepsy, dysmorphic features, scoliosis, strabismus, epilepsy, corpus callosum agenesis, subdural hygroma, hypermetria. Normal sleep pattern, although sleeps lightly. Some autistic features, with relatively low expressive communication and interpersonal relations, and compulsive behavior.	None
Patient T76	E288D	2.2	Severe ID, a few words. Dysmorphic features, hypotonia. Abnormal EEG, moderately enlarged lateral ventricles. No evidence for autistic features ('friendly behavior').	FG syndrome
Patient L45	L298F	1.7	Severe ID and no speech, however good social and eye contact. Never walked. No evidence for sleeping problems, or autistic features.	MCT8 mutation
Controls (n = 31) median (range)	WT	3.8 (0.2 - 9.5)		

Six variants were found only in controls and not in patients, and one variant (L298F) was found both in the ID group and in the control group. One variant, N17K (rs17149149), is mentioned in the SNP database at an allelic frequency of 6.7% in the Han Chinese population. When considering all the identified rare variations, we could not detect an enrichment of mutations in patients with ID compared to the control group (8/361 vs 8/440 or 2.2% vs 1.8%; $p = 0.88$; OR = 1.25 (0.46-3.46)).

Impact of non-synonymous genetic variations on ASMT enzyme activity

In order to investigate the functional effect of the genetic variations identified, ASMT enzyme activity was measured in BLCL of seven patients carrying *ASMT* variants (cells from the patient carrying variant IVS7+1G>T were not available) and 31 controls without coding mutations of *ASMT* (Figure 1). For six of the patients carrying variants, ASMT activity ranged in the first quartile of the control group (≤ 1.9 pmol/mg proteins/30 min). For the patient carrying variant E288D, ASMT activity ranged in the second quartile of the control group (2 - 3.3 pmol/mg proteins/30 min). Interestingly, for E288D, both PolyPhen and SIFT algorithms predicted little impact of the substitution on protein function. Surprisingly, the two unrelated patients carrying

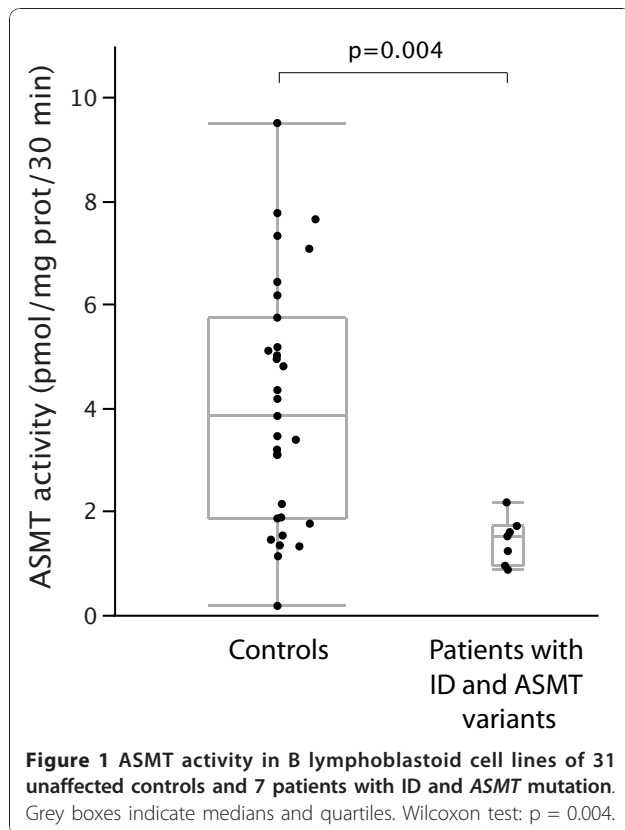
E288D variants displayed quite different BLCL ASMT activity (0.9 and 2.2 pmol/mg proteins/30 min), indicating that additional factors influence the enzyme activity.

On average, ASMT activity in BLCL of ID patients carrying variants was much lower as compared to control subjects without coding mutations of *ASMT* (1.4 ± 0.2 pmol/mg protein/30 min and 4.1 ± 0.4 pmol/mg protein/30 min, respectively, Wilcoxon test: $p = 0.004$). These data suggest that most variants identified in patients, although heterozygous, are associated with a low ASMT activity *ex vivo*.

Discussion

Alterations of the melatonin pathway have been suggested as susceptibility factors to developmental disorders, and especially to ASD [15-17,19-23]. The mechanisms leading to ASMT/melatonin deficit in humans are most likely diverse, including genetic/epigenetic alterations. The impact of melatonin deficit on sleep and on the susceptibility to developmental disorders (such as ASD or ID) also remains unclear. It may involve its role as a circadian synchronizer and sleep inducer, its effects on synaptic plasticity, and/or its antioxidant properties [8,14,19,24,25]. Melatonin deficit may also alter and/or desynchronize many physiological processes, and indirectly exacerbate other pathological processes.

We could identify predicted deleterious variants in a subgroup of patients with ID, including two deleterious splice site variants of *ASMT* found only in patients with ID. The splice site mutation in intron 7 (IVS7+1G>T) was never observed before. The splice site mutation in intron 5 (IVS5+2T>C) was previously identified in patients with ASD and reported to be more frequent in patients compared to controls (6/749 vs 1/861; $p = 0.04$) [17,20,22]. In addition, biochemical studies indicated that several of the variants, although present at the heterozygous state, were associated with low ASMT activity and might thus impair melatonin synthesis *in vivo*. These results were consistent with the biochemical studies performed by Melke et al. on families carrier of the L298F and IVS5+2T>C mutations and presenting with a dramatic decrease in ASMT activity and blood melatonin concentration [17]. Nevertheless, despite these interesting findings, we could not detect *ASMT* mutation enrichment in patients with ID compared to the controls. Our results were similar to those previously reported in patients with ASD, for whom no significant enrichment in *ASMT* rare variants was found [17,20,22], although melatonin deficit is very frequently associated with this condition [15,16], and is correlated with low ASMT activity *in vivo* [17]. Low ASMT activities were also observed in BLCL of some controls subjects who did not carry a coding mutation of *ASMT*. Low ASMT



activity can thus be observed even in the absence of coding mutations. For example, SNPs within the promoter were associated with low ASMT mRNA levels [17,21].

Several limitations exist in this study. First, the sample of patients with ID was initially collected for the identification of X-linked genes (e.g. families with multiple affected males). Therefore, this population is not representative of the broad diversity of patients with ID and is negatively biased for the identification of mutations in the *ASMT* gene, located on the pseudo-autosomal region 1 (PAR1) shared by the X and Y chromosomes. Another limitation is the sparse information that we could collect about sleep disorders. Further studies will be required to establish the precise link between *ASMT* variants, melatonin levels and sleep disorders.

Conclusions

This study does not support *ASMT* as a causative gene for ID since we observed no significant enrichment in the frequency of *ASMT* variants in ID compared to controls. Nevertheless, we could identify patients with deleterious *ASMT* mutations as well as decreased ASMT activity. Given the importance of sleep difficulties in patients with ID, for this subgroup of patients, melatonin supplementation might be beneficial.

Abbreviations

ASD: Autism Spectrum Disorders; ASMT: Acetyl-serotonin Methyl Transferase; BCLC: B Lymphoblastoid cell lines; ID: Intellectual Disability; SNP: Single Nucleotide Polymorphism

Acknowledgements

We thank the cell bank of Cochin hospital (J Chelly), the Plateforme de Ressource Biologique (B. Ghaleh), the Clinical Investigation Centre 006 (P. Le Corvoisier) of Mondor-Chenevier hospitals, the blood donor centre (JL. Beaumont and B. Mignen, EFS, Creteil), and the Genetic Unit of the University Hospital of Tours (B Jauffrion) for technical assistance. We thank C. Bouchier and S. Duthoy for the use of sequencing facilities at the Génopole Pasteur, B. Costes and N. Martin at the Genomic platform of the IMRB (M. Gossens). We thank E. Abadie, J. Deshommes and K. Le Dudal for their assistance. This work was supported by the Pasteur Institute, INSERM, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Agence Nationale pour la Recherche (ANR NEURO2006 - Project Manage_BPAD), EU grant QL6G-CT-2002-01810 (EURO-MRX), and the RTRS Santé Mentale (Foundation FondaMental).

Author details

¹Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, Paris, France. ²CNRS URA 2182 "Genes, synapses et cognition", Institut Pasteur, Paris, France. ³University Paris Descartes, Paris, France. ⁴Institut Cochin, CNRS ULD 8104, Paris, France. ⁵INSERM U 955, IMRB, Psychiatry Genetics, Creteil, F-94000, France. ⁶Foundation Fondamental, Creteil, France. ⁷Department of Human Genetics, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands. ⁸Center for Human Genetics, University Hospitals Leuven, B-3000 Leuven, Belgium. ⁹Service de Biochimie, INSERM U942, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹⁰Max Planck Institute for Molecular Genetics, Department Ropers, Berlin, Germany. ¹¹Service de Génétique Médicale, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France. ¹²UMR 6218, CNRS, IEM, équipe « génétique expérimentale et moléculaire », université d'Orléans, Orléans, France. ¹³Centre hospitalier régional d'Orléans, Orléans, France.

¹⁴INSERM U930 "Imaging and Brain", Tours, France. ¹⁵University François-Rabelais, Tours, France. ¹⁶CNRS ERL3106, Tours, France. ¹⁷Centre Hospitalier Régional Universitaire, Service de Génétique, Tours, France. ¹⁸University Paris-East, Faculty of Medicine, UMR-S 955, Creteil, F-94000, France. ¹⁹AP-HP, Henri Mondor-Albert Chenevier Group, Department of Psychiatry, Creteil, F-94000, France. ²⁰University Denis Diderot Paris 7, Paris, France.

Authors' contributions

SM, CP, SJ participated in the sequencing the *ASMT* gene in patients and controls; CP, HGB, JML measured the ASMT activity; HVE, KP, SB, FL, MR, DL, AT, VK, AdB and JC were involved in the patient's recruitments and database managements. AD, SJ and ML were involved in the control's recruitments and database managements. TB, RD and JC conceived of the study, and participated in its design and coordination. CP, RD and TB drafted the manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 19 October 2010 Accepted: 20 January 2011

Published: 20 January 2011

References

- Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Cherif B, Bienvenu T: **Genetics and pathophysiology of mental retardation.** *Eur J Hum Genet* 2006, **14**:701-713.
- Didde R, Sigafoos J: **A review of the nature and treatment of sleep disorders in individuals with developmental disabilities.** *Res Dev Disabil* 2001, **22**:255-272.
- Quine L: **Sleep problems in children with mental handicap.** *J Ment Defic Res* 1991, **35**(Pt 4):269-290.
- Richdale A, Francis A, Gavidia-Payne S, Cotton S: **Stress, behaviour, and sleep problems in children with an intellectual disability.** *J Int Dev Dis* 2000, **25**:147-161.
- Braam W, Smits MG, Didden R, Korzilius H, Van Geijlswijk IM, Curfs LM: **Exogenous melatonin for sleep problems in individuals with intellectual disability: a meta-analysis.** *Dev Med Child Neurol* 2009, **51**:340-349.
- Simonneaux V, Ribelayga C: **Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters.** *Pharmacol Rev* 2003, **55**:325-395.
- Rawashdeh O, de Borsetti NH, Roman G, Cahill GM: **Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish.** *Science* 2007, **318**:1144-1146.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G: **The basic physiology and pathophysiology of melatonin.** *Sleep Med Rev* 2005, **9**:11-24.
- Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spiegel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, et al: **Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion.** *Nat Genet* 2009, **41**:82-88.
- Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, et al: **A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk.** *Nat Genet* 2009, **41**:89-94.
- Henningsson S, Jonsson L, Ljunggren E, Westberg L, Gillberg C, Rastam M, Anckarsater H, Nygren G, Landen M, Thuresson K, et al: **Possible association between the androgen receptor gene and autism spectrum disorder.** *Psychoneuroendocrinology* 2009, **34**:752-761.
- Arendt J: **Importance and relevance of melatonin to human biological rhythms.** *J Neuroendocrinol* 2003, **15**:427-431.
- Brzezinski A: **Melatonin in humans.** *N Engl J Med* 1997, **336**:186-195.
- Barnard AR, Nolan PM: **When clocks go bad: neurobehavioural consequences of disrupted circadian timing.** *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000040.
- Nir I, Meir D, Zilber N, Knobler H, Hadjiz J, Lerner Y: **Brief report: circadian melatonin, thyroid-stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism.** *J Autism Dev Disord* 1995, **25**:641-654.
- Tordjman S, Anderson GM, Pichard N, Charbuy H, Touitou Y: **Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder.** *Biol Psychiatry* 2005, **57**:134-138.
- Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, Betancur C, Nygren G, Anckarsater H, Rastam M, Stahlberg O, Gillberg IC, Delorme R, et al: **Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders.** *Mol Psychiatry* 2008, **13**:90-98.

18. Kulman G, Lissoni P, Rovelli F, Roselli MG, Brivio F, Sequeri P: **Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children.** *Neuroendocrinol Lett* 2000, **21**:31-34.
19. Bourgeron T: **The possible interplay of synaptic and clock genes in autism spectrum disorders.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007, **72**:645-654.
20. Toma C, Rossi M, Sousa I, Blasi F, Bacchelli E, Alen R, Vanhala R, Monaco AP, Jarvela I, Maestrini E: **Is ASMT a susceptibility gene for autism spectrum disorders? A replication study in European populations.** *Mol Psychiatry* 2007, **12**:977-979.
21. Galecki P, Szemraj J, Bartosz G, Bienkiewicz M, Galecka E, Florkowski A, Lewinski A, Karbownik-Lewinska M: **Single-nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin synthesis rate-limiting enzyme in recurrent depressive disorder.** *J Pineal Res* 2010, **48**:311-317.
22. Jonsson L, Ljunggren E, Bremer A, Pedersen C, Landen M, Thureson K, Giacobini M, Melke J: **Mutation screening of melatonin-related genes in patients with autism spectrum disorders.** *BMC Med Genomics* 2010, **3**:10.
23. Chaste P, Clement N, Mercati O, Guillaume JL, Delorme R, Botros HG, Pagan C, Perivier S, Scheid I, Nygren G, *et al*: **Identification of pathway-biased and deleterious melatonin receptor mutants in autism spectrum disorders and in the general population.** *PLoS One* 2010, **5**:e11495.
24. El-Sherif Y, Tesoriero J, Hogan MV, Wieraszko A: **Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus.** *J Neurosci Res* 2003, **72**:454-460.
25. Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF, Brown GM, Wang YT: **Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors.** *Nat Neurosci* 1999, **2**:401-403.
26. Burgess HJ, Fogg LF: **Individual differences in the amount and timing of salivary melatonin secretion.** *PLoS One* 2008, **3**:e3055.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/17/prepub>

doi:10.1186/1471-2350-12-17

Cite this article as: Pagan *et al.*: Mutation screening of *ASMT*, the last enzyme of the melatonin pathway, in a large sample of patients with Intellectual Disability. *BMC Medical Genetics* 2011 **12**:17.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3.2. Mutations rares dans les gènes *AANAT* et *ASMT* associées aux troubles du sommeil chez des enfants présentant un trouble neurodéveloppemental.

Si les mutations du gène *ASMT* ne semblent pas être un facteur important de vulnérabilité au retard mental, cette condition, comme les TSA, est caractérisée par une grande hétérogénéité clinique et génétique. Ainsi, le retard mental lié à l’X, pourtant relativement ciblé en termes d’étiologie génétique, a été associé à près d’une centaine de gènes à forte pénétrance, tous situés sur le chromosome X (Ropers, 2010).

Une stratégie possible pour décomposer la complexité des TSA et des autres troubles neurodéveloppementaux est d’investiguer des cohortes phénotypiquement homogènes. La mélatonine est considérée comme un important synchroniseur des rythmes circadiens, et les anomalies de la synthèse de la mélatonine semblent associées aux troubles du sommeil chez les patients avec TSA. Les troubles du sommeil associés aux troubles neurodéveloppementaux constituent donc un bon phénotype-candidat en relation avec les anomalies de synthèse de la mélatonine. Les variants génétiques affectant les gènes *AANAT* et *ASMT* pourraient donc être enrichis chez les patients présentant ce phénotype par rapport à la population générale.

Nous avons recherché de tels variants dans le groupe de patients inclus dans le projet anglais MENDS (*the use of MElatonin in children with Neurodevelopmental Disorders and Sleep problems*), coordonné par les Dr Paul Gringras et Richard Appleton (Université de Liverpool). Cet essai thérapeutique multicentrique visait à déterminer l’efficacité d’un traitement par la mélatonine pour les troubles du sommeil associés à des pathologies neurodéveloppementales chez l’enfant. Les 134 patients inclus dans l’essai et pour lesquels un échantillon d’ADN était disponible ont été investigués pour les variants rares dans les gènes *ASMT* et *AANAT*. Ces patients étaient atteints de diverses pathologies neurodéveloppementales : syndromes génétiques, TSA, retard développemental.

3.2.1. Méthodes

3.2.1.1. Patients

134 patients inclus dans l’essai MENDS ont été investigués, âgés de 3 à 15 ans et atteints de retard développemental et de troubles sévères de l’initiation ou du maintien du sommeil.

3.2.1.2. Recherche de variants génétiques dans les gènes AANAT et ASMT

Les exons codants des gènes *AANAT* et *ASMT* ont été séquencés selon les protocoles décrits dans la section 2.1.5. La microduplication du gène *ASMT* a été génotypée selon la méthode décrite dans la section 2.1.6.

3.2.1.2. Données cliniques et thérapeutiques relatives sommeil

Les données concernant les troubles du sommeil avant et sous traitement par la mélatonine, fournies par les coordonnateurs du projet MENDS, étaient issues d'agendas de sommeil. L'insomnie d'endormissement a été définie par une latence d'endormissement supérieure à 60 minutes. Une durée de sommeil courte a été définie par une durée totale de sommeil nocturne inférieure à 500 minutes (seuil correspondant au 25^{ème} percentile des sujets inclus).

L'essai thérapeutique suivait un plan en parallèle contre placebo et durait 12 semaines, avec des doses de mélatonine croissantes de 0,5 à 12 mg. La réponse au traitement par la mélatonine en termes de latence d'endormissement (définie uniquement pour les patients présentant une insomnie d'endormissement) a été définie par une réduction de la latence d'endormissement de 60 minutes ou plus sous traitement (correspondant au 25^{ème} percentile des patients du groupe placebo présentant une insomnie d'endormissement). La réponse au traitement en termes de durée de sommeil (définie uniquement pour les patients présentant une durée de sommeil courte) a été définie par une augmentation de la durée de sommeil supérieure à 68 minutes (correspondant au 75^{ème} percentile des patients du groupe placebo présentant une durée de sommeil courte).

3.2.2. Identification de variants rares dans les gènes AANAT et ASMT

Quatre patients étaient porteurs de mutations déjà décrites dans le gène *AANAT*, T3M et A163V, qui altèrent l'activité enzymatique. L'un d'eux était porteur des deux mutations. Quatre patients étaient également porteurs de mutations dans le gène *ASMT*, le variant perte-de-fonction récurrent N17K étant retrouvé chez deux patients, et deux variants non décrits précédemment, G32C et H264D, étant retrouvés chacun chez un patient. Le variant G32C est prédit *in silico* comme délétère, le variant H264D est prédit comme bénin. La prévalence totale des variants rares dans cette cohorte est donc de 5,9%, et 5,1% pour les variants prédits comme délétères. Ces fréquences ne sont pas significativement différentes de celles observées chez les témoins séquencés (cf table

1.2 : 5,9% au total, $p=1$; 4,7% pour les mutations délétères, $p=0,82$, tests exacts de Fisher).

La microduplication du gène *ASMT* a été génotypée pour 126 patients et retrouvée chez 3 d'entre eux. La fréquence du CNV dans cette population est donc estimée à 2,4%, ce qui n'est pas significativement différent de la fréquence observée dans un groupe contrôle (3,6%, $p=0,80$) (cf. section 2, figure supplémentaire 2.5)

Cette cohorte de patients souffrant de troubles du sommeil associés à des troubles neurodéveloppementaux ne présente donc pas d'enrichissement majeur de variants rares dans les gènes *AANAT* et *ASMT*.

3.2.3. Corrélats thérapeutiques des variants rares

Quatre patients porteurs d'un variant rare ont été inclus dans le bras mélatonine de l'essai. Les quatre patients étaient répondeurs au traitement (tableau 3.1). Même si ce très petit nombre de cas ne permet pas d'extrapoler ces résultats, une bonne réponse au traitement par la mélatonine semble cohérente dans le cas d'anomalies génétiques de la synthèse de la mélatonine.

Tableau 3.1. Réponse au traitement par la mélatonine chez les patients porteurs d'un variant rare.

Patient	Variant	Troubles du sommeil		Réponse au traitement	
		Insomnie d'endormissement	Durée de sommeil courte	Latence d'endormissement	Durée de sommeil
056014	<i>ASMT</i> N17K	Oui	Oui	Oui	Oui
230003	<i>ASMT</i> H264D	Non	Oui	/	Oui
082007	<i>ASMT</i> CNV	Oui	Non	Oui	/
056040	<i>AANAT</i> T3M	Oui	Oui	Oui	Oui

3.3. Structure de l'enzyme ASMT et impact fonctionnel des mutations rares identifiées.

Les variants non synonymes sont relativement fréquents et souvent difficiles à interpréter : une substitution d'acide aminé peut abolir la fonction de la protéine, ou au contraire générer un gain de fonction, mais peut aussi n'avoir qu'un impact modéré ou nul. Différents algorithmes ont été développés pour prédire *in silico* l'impact d'une substitution, basés sur la conservation phylogénique des acides aminés et sur leurs propriétés physico-chimiques. Toutefois, ces algorithmes ne sont que prédictifs, et donnent parfois des résultats discordants entre eux. La meilleure stratégie pour déterminer l'impact fonctionnel d'un variant est donc d'étudier la fonction de la protéine mutée *in vitro*. Une autre stratégie possible est d'interpréter la substitution d'acides aminés en fonction de la structure tridimensionnelle de la protéine, lorsqu'elle est connue, et des relations structure-activité.

Dans cette perspective, l'enzyme ASMT a été cristallisée et sa structure tridimensionnelle a été déterminée, en collaboration avec les plateformes « Production de protéines recombinantes et anticorps » (Jacques Bellalou) et « Cristallogénèse et diffraction des rayons X » (William Shepard) de l'Institut Pasteur. L'impact fonctionnel des différents variants identifiés a été étudié *in vitro* par mesure de l'activité enzymatique des protéines mutantes. Les résultats expérimentaux ont été interprétés à la lumière de la structure de la protéine.

Article :

Crystal structure and functional mapping of human ASMT, the last enzyme of the melatonin synthesis pathway.

H. Goubran Botros, P. Legrand, C. Pagan, V. Bondet, P. Weber, M. Ben Abdallah, N. Lemièrre, G. Huguet, J. Bellalou, E. Maronde, P. Beguin, A. Haouz, W. Shepard, T. Bourgeron.

Journal of Pineal Research. 2012 (in press)

3.4. Une possible modulation épigénétique de l'expression des mutations *ASMT* ?

Toutes les mutations identifiées dans les gènes *ASMT* et *AANAT* sont retrouvées à l'état hétérozygote. Si des mutations perte-de-fonction hétérozygotes peuvent être associées à un phénotype pathologique par un phénomène d'haploinsuffisance, la majorité des pertes de fonctions sont récessives, et la présence d'un allèle fonctionnel suffit souvent à maintenir une expression suffisante de la protéine active. Dans le cas des mutations des gènes *AANAT* et *ASMT* qui ont un impact fonctionnel délétère, certains sujets porteurs de mutation présentent un phénotype biochimique (réduction de l'activité enzymatique) et/ou clinique (troubles du sommeil) associé, mais l'expression phénotypique est inconstante (cf section 2.3.1). Ces observations suggèrent que l'expression phénotypique des mutations est modulée par des facteurs additionnels.

Le gène *ASMT* est localisé sur la région pseudo-autosomique des hétérochromosomes, commune aux chromosomes X et Y. Bien que cette région ne soit pas concernée par le phénomène d'inactivation épigénétique mosaïque d'un chromosome X chez les femmes, il est possible que des régulations épigénétiques interviennent et soient susceptibles de moduler l'expression des mutations du gène *ASMT*. En effet, un phénomène d'exclusion allélique a été mis en évidence dans les lignées lymphoblastoïdes, qui suggère que, chez certains sujets, un seul des deux allèles est exprimé.

3.4.1. Méthodes

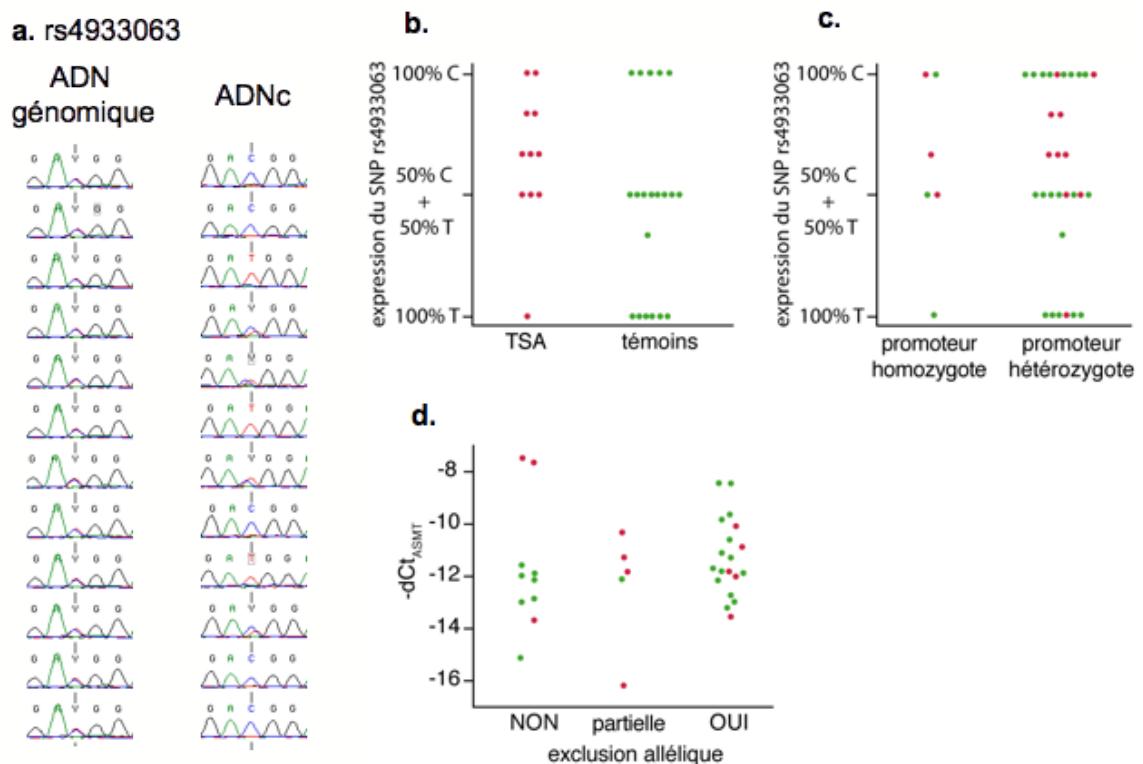
Des lignées lymphoblastoïdes de patients et de témoins ont été établies par transformation de lymphocytes périphériques par le virus d'Epstein-Barr, comme décrit dans la section 2.1.7.

Parmi les sujets séquencés au niveau génomique, ceux présentant un variant codant hétérozygote dans le gène *ASMT* ont été étudiés pour le phénomène d'exclusion allélique. Les variants considérés sont les mutations codantes, investiguées dans 7 familles, ainsi que le polymorphisme synonyme rs4933063 (polymorphisme C/T), présent dans la population générale avec une fréquence de l'allèle minoritaire (T) de 13%, et investigué chez 27 témoins et 13 patients (dont 5 ont fait l'objet d'une étude à l'échelle familiale). Les variants codants ont été séquencés au niveau de l'ADN

complémentaire, obtenu par reverse-transcription de l'ARN issu des lignées lymphoblastoïdes, selon les conditions décrites dans la section 2.1.7.

3.4.2. Mise en évidence du phénomène d'exclusion allélique par le SNP synonyme rs4933063.

Le SNP synonyme rs4933063 est relativement fréquent dans la population générale et permet d'estimer la fréquence du phénomène d'exclusion allélique. La figure 3.1.a illustre la mise en évidence du phénomène d'exclusion allélique par séquençage de l'ADN complémentaire : toutes les séquences présentées sont issues de sujets hétérozygotes au niveau de l'ADN génomique, mais certains sujets n'expriment que l'un des deux allèles (C ou T) au niveau de l'ADN complémentaire, dérivé de l'ARN



messenger du gène *ASMT*, ce qui correspond au phénomène d'exclusion allélique. Ce phénomène est retrouvé chez environ 70% des sujets, et cette proportion n'est pas différente entre les témoins et les patients (figure 3.1.b).

Une première hypothèse pour expliquer ce phénomène est un mécanisme génétique. L'étude de l'expression du gène *ASMT* dans les lignées lymphoblastoïdes a mis en évidence l'influence du génotype du promoteur (SNP rs4446909, rs5989681 et rs6644635) sur l'expression du gène (cf section 2.3.2), ce qui suggère que ces polymorphismes définissent des « promoteurs forts » et des « promoteurs faibles ». Ainsi, un déséquilibre d'expression pourrait s'observer chez les sujets hétérozygotes pour le promoteur du gène *ASMT*, et l'allèle lié au « promoteur fort » serait plus fortement exprimé que l'allèle lié au « promoteur faible ». Toutefois, certains sujets homozygotes pour le promoteur *ASMT* présentent également une exclusion allélique, ce qui suggère que le génotype du promoteur n'est pas le seul facteur déterminant de ce phénomène. L'étude de l'exclusion allélique au sein de 5 familles (tableau 3.2) révèle qu'il semble s'agir d'un phénomène transmis : à l'exception d'une famille, l'allèle exclu est toujours le même au sein d'une famille donnée, ce qui évoque la transmission d'un allèle « éteint ». Cet allèle éteint est porté par le chromosome X dans 3 familles et par le chromosome Y dans 1 famille, par le chromosome paternel dans 2 familles et par le chromosome maternel dans 2 familles. La nature du chromosome (X ou Y) et l'origine parentale (paternelle ou maternelle) ne semblent donc pas intervenir. Ces observations sont compatibles avec la transmission d'un facteur génétique (autre que les polymorphismes du promoteur étudiés) qui déterminerait l'exclusion allélique, et/ou avec l'inactivation épigénétique d'un allèle. Les deux mécanismes peuvent être combinés, comme dans le cas du syndrome de l'X-fragile, où une expansion de triplets en amont du gène *FMR1* est à l'origine d'une inactivation épigénétique de l'expression du gène par méthylation de l'ADN.

Une réduction des taux d'ARNm du gène *ASMT* a été observée dans les lignées lymphoblastoïdes des patients avec TSA par rapport aux témoins. Le mécanisme en est inconnu. On peut supposer que le phénomène d'exclusion allélique, dans la mesure où un seul des deux allèles est exprimé, pourrait être associé à une réduction de l'expression du gène. Toutefois, l'étude des taux de transcrits chez les sujets présentant une exclusion allélique indique que le phénomène n'est pas associé à une réduction significative des taux d'ARNm d'*ASMT* (figure 3.1.d).

sujets	sexe	statut	haplotype estimé (chr-promoteurs-rs4933063)	exclusion allélique	allele exprimé	allele exclu
AU-RD-177-001	M	père	ND	ND		
AU-RD-177-002	F	mère	X-GGGT-C X-GGGT-C	NA		
AU-RD-177-003	M	index	X-GGGT-C Y-ACGC-T	oui	Y-ACGC-T	X-GGGT-C
AU-RD-177-004	M	frère atteint	X-GGGT-C Y-ACGC-T	non		
AU-RD-177-005	M	frère	X-GGGT-C Y-ACGC-T	partielle	X-GGGT-C	Y-ACGC-T
AU-FRA-010-001	M	père	Y-ACGC-C X-GGGC-T	oui	Y-ACGC-C	X-GGGC-T
AU-FRA-010-002	F	mère	X-ACGC-C X-GGGC-C	NA		
AU-FRA-010-003	M	index	Y-ACGC-C X-ACGC-C	NA		
AU-FRA-010-004	F	sœur	X-ACGC-C X-GGGC-T	oui	X-ACGC-C	X-GGGC-T
AU-FRA-010-005	F	sœur atteinte	X-GGGC-C X-GGGC-T	partielle	X-GGGC-C	X-GGGC-T
AU-RD-234-001	M	père	X-ACGC-C Y-GGAT-C	NA		
AU-RD-234-002	F	mère	X-ACGC-C C-GGGC-T	oui	X-ACGC-C	X-GGGC-T
AU-RD-234-003	M	index	X-GGGC-T Y-GGAT-C	oui	Y-GGAT-C	X-GGGC-T
AU-RD-234-004	F	sœur	X-ACGC-C X-ACGC-C	NA		
AU-FRA-005-001	M	père	Y-GGGT-T X-ACGC-C	partielle	X-ACGC-C	Y-GGGT-T
AU-FRA-005-002	F	mère	ND	ND		
AU-FRA-005-003	M	index	Y-GGGT-T X-GGAT-C	partielle	X-GGAT-C	Y-GGGT-T
AU-FRA-005-004	F	sœur	X-ACGC-C X-GGAT-C	NA		
AU-FRA-005-005	M	frère atteint	Y-GGGT-T X-GGAT-C	non		
AU-RD-036-001	M	père	Y-GGAT-C X-GGAT-C	NA		
AU-RD-036-002	F	mère	X-ACGC-C X-GGGC-T	partielle	X-ACGC-C	X-GGGC-T
AU-RD-036-003	M	index	Y-GGAT-C X-GGGC-T	partielle	Y-GGAT-C	X-GGGC-T

Tableau 3.2. Etude de la transmission de l'exclusion allélique dans 5 famille. NA : non applicable. ND : non déterminé.

3.4.3. Conséquence du phénomène d'exclusion allélique sur l'expression des mutations perte-de-fonction du gène *ASMT*

Le phénomène d'exclusion allélique est susceptible d'interférer avec l'expression des mutations perte-de-fonction hétérozygotes dans le gène *ASMT*. Ainsi, l'exclusion de l'allèle sauvage peut révéler ou amplifier l'impact phénotypique de l'allèle muté en

empêchant une compensation. À l'inverse, l'allèle muté peut être masqué par l'exclusion. L'exclusion allélique a été investiguée dans 7 familles porteuses d'une mutation délétère du gène *ASMT* (tableau 3.3). Six des sept proposants investigués présentent un phénomène d'exclusion allélique pour le gène *ASMT* : quatre semblent exprimer exclusivement l'allèle muté, deux n'expriment que l'allèle sauvage. Comme décrit précédemment, l'exclusion allélique semble se transmettre dans les familles sous forme de transmission d'un allèle « éteint ». Les corrélations génotype-phénotype sont difficiles à établir sur de faibles effectifs comme c'est le cas ici, mais on peut constater que cinq des six sujets (patients ou apparentés) exprimant uniquement un allèle muté et investigués sur le plan biochimique présentent une réduction de l'activité *ASMT* plaquettaire. En outre, parmi les cinq sujets exprimant uniquement un allèle muté et pour lesquels les troubles du sommeil sont documentés, quatre présentent des troubles du sommeil (insomnie et/ou retard de phase). Parmi les sujets exprimant uniquement l'allèle sauvage, plusieurs présentent une réduction de l'activité *ASMT* plaquettaire, ce qui n'est pas surprenant dans la mesure où ce déficit est très fréquent dans les familles avec TSA et fait certainement intervenir d'autres mécanismes que les mutations rares. Les trois sujets exprimant uniquement l'allèle sauvage et documentés sur le plan clinique ne présentent pas de troubles du sommeil.

Globalement, ces résultats indiquent que le phénomène d'exclusion allélique est susceptible de moduler l'expression phénotypique des mutations délétères du gène *ASMT*. Toutefois, ce phénomène n'a été documenté que dans les lignées lymphoblastoïdes, qui n'expriment que très faiblement ce gène. La pertinence physiologique de l'exclusion allélique n'est que spéculative, dans la mesure où les régulations de l'expression génique sont par nature tissu-spécifiques. Il est possible que la glande pinéale, qui exprime en abondance le gène *ASMT*, en exprime les deux allèles, et que l'effet des mutations et les éventuels phénomènes d'haploinsuffisance n'aient pas les mêmes manifestations au niveau central et en périphérie.

sujet	sexe	statut	mutation	haplotype présumé (chr-promoteur-mutation)	exclusion allélique	allèle exprimé	allèle exclu	activité ASMT plaquettaire (pmol/109 plaquettes/30 min)	troubles du sommeil
AU-RD-251	M	père	non	Y-ACGC-C X-ACGC-C	NA			ND	ND
	F	mère	L11F	X-GGGC-T X-GGGT-C	non			ND	ND
	M	index	L11F	Y-ACGC-C X-GGGC-T	oui	Y-ACGC-C	X-GGGC-T	0,93 (réduit)	aucun
AU-RD-223	F	mère	N17K	X-GCGC-A X-GGGT-C	oui	X-GCGC-A	X-GGGT-C	0,73 (réduit)	insomnie
	M	père	non	Y-ACGC-C X-ACGC-C	NA			1,05 (normal)	aucun
	F	sœur	N17K	X-GCGC-A X-ACGC-C	oui	X-GCGC-A	X-ACGC-C	0,99 (réduit)	aucun
	M	index	N17K	X-GCGC-A Y-ACGC-C	oui	X-GCGC-A	Y-ACGC-C	0,81 (réduit)	retard de phase, insomnie
AU-FRA-036	M	père	non	Y-GCGC-C X-GCGC-C	NA			0,47 (réduit)	aucun
	F	mère	I269M	X-GCGC-C X-GCGC-G	partielle	X-GCGC-G	X-GCGC-C	0,85 (réduit)	insomnie
	F	sœur	non	X-GCGC-C X-GCGC-C	NA			0,27 (réduit)	aucun
	M	index	I269M	Y-GCGC-C X-GCGC-G	oui	X-GCGC-G	Y-GCGC-C	1,38 (normal)	insomnie
	M	frère atteint	non	X-GCGC-C Y-GCGC-C	NA			ND	aucun
AU-RD-112	M	père	ND	Y-GGGT-G X-GGGT-G	NA			ND	ND
	F	mère	C273S	X-GGGT-C X-ACGC-G	oui	X-ACGC-G	X-GGGT-C	0,86 (réduit)	aucun
	M	index	C273S	X-GGGT-G Y-GGGT-G	oui	Y-GGGT-G	X-GGGT-C	0,86 (réduit)	aucun
AU-NOR-002	M	père	G278A	Y-ACGC-C X-GGGT-G	ND			ND	ND
	F	mère	non	X-GGGT-G X-GGAT-G	NA			ND	ND
	M	index	G278A	Y-ACGC-C X-GGAT-G	oui	Y-ACGC-C	X-GGAT-G	ND	ND
	M	frère atteint	G278A	Y-ACGC-C X-GGAT-G	oui	Y-ACGC-C	X-GGAT-G	ND	ND
AU-RD-040	M	père	non	X-ACGC-C Y-GGGT-C	NA			0,88 (réduit)	ND
	F	mère	L298F	X-ACGC-T X-ACGC-C	ND			0,01 (réduit)	ND
	M	index	L298F	X-ACGC-T Y-GGGT-C	oui	X-ACGC-T	Y-GGGT-C	0,01 (réduit)	ND
AU-NOR-014	M	père	H318D	Y-GGAC-C X-GGGC-G	ND			ND	ND
	F	mère	non	X-GGGC-C X-GGGC-C	NA			ND	ND
	F	index	H318D	X-GGGC-C X-GGGC-G	non			ND	ND

Tableau 3.3. Etude de l'exclusion allélique du gène ASMT dans 7 familles porteuses de mutations codantes délétères
L'allèle muté est indiqué en rouge. NA: non applicable. ND: non déterminé.

3.5. Discussion : Mécanismes moléculaires des anomalies de synthèse de la mélatonine dans les TSA

3.5.1. Génétique du déficit de synthèse de la mélatonine

Les altérations de la synthèse de la mélatonine observées chez les patients avec TSA sont également retrouvées chez leurs apparentés (parents, frères et sœurs), ce qui suggère que ces anomalies sont héritées. En outre, les déficits sont détectables dans la glande pinéale comme dans les tissus périphériques (plaquettes sanguines, tractus gastro-intestinal), ce qui suggère qu'il s'agit d'anomalies primaires, et non secondaires à des altérations des régulations extrinsèques (notamment neurochimiques) de la glande pinéale. Notre exploration des mécanismes du déficit en mélatonine s'est donc focalisée en premier lieu sur les deux gènes candidats évidents intervenant directement dans la synthèse de la mélatonine, *AANAT* et *ASMT*, qui ont été séquencés chez les patients avec TSA. Des mutations ponctuelles ont été identifiées, et leur étude *in silico*, *in vitro*, et en relation avec la structure tridimensionnelle de la protéine, montre que certaines d'entre elles sont délétères et réduisent ou abolissent la fonction des protéines codées par les gènes. De plus, un phénomène d'exclusion allélique a été mis en évidence, qui pourrait moduler l'expression phénotypique des mutations hétérozygotes du gène *ASMT*. Enfin, une microduplication partielle du gène *ASMT*, susceptible d'altérer la structure du gène, a été caractérisée et génotypée.

Toutefois, la contribution de ces mutations au déficit de synthèse de la mélatonine observé dans les TSA reste mineure. 40% des patients présentent un déficit de l'activité *AANAT* plaquettaire et 75% un déficit de l'activité *ASMT*, alors que la fréquence des mutations ponctuelles délétères dans les gènes correspondants n'est que de 2,3% et 2,4%, respectivement, et de 4,1% pour la microduplication d'*ASMT*. Dans la majorité des cas, le déficit en mélatonine résulte donc d'un autre mécanisme.

En outre, il n'a pas été mis en évidence d'enrichissement significatif de la fréquence de ces mutations dans la population de patients avec TSA par rapport à la population témoin. Les autres cohortes de patients avec troubles neurodéveloppementaux étudiées (patients avec retard mental, patients avec troubles du sommeil associés à une pathologie neurodéveloppementale – pourtant sélectionnés sur la base du phénotype-candidat des troubles du sommeil) ne présentent pas non plus d'enrichissement

			population	ASD	RM	MENDS	total troubles neurodéveloppementaux	Témoins
gène	Variant	prediction (polyphen2)	activité in vitro					
			n=	431		136	567	365
AANAT	T3M	bénin	réduite	4		3	7	0
	A13S	bénin	normale	1		0	1	0
	R53C	probablement délétère	ND	1		0	1	0
	V62I	bénin	normale	1		0	1	1
	R71W	probablement délétère	ND	0		0	0	1
	T110M	probablement délétère	ND	1		0	1	0
	A157V	bénin	normale	1		0	1	0
	A163V	bénin	réduite	4		2	6	5
G177D	probablement délétère	réduite	0		0	0	1	
total				13		5	18	8
freq total				0,030		0,037	0,032	0,022
<i>p (vs 365 ctrls)</i>				<i>0.51</i>		<i>0.35</i>	<i>0.23</i>	
total délétère				10		5	15	7
freq délétère				0,023		0,037	0,026	0,019
<i>p (vs 365 ctrls)</i>				<i>0.81</i>		<i>0.32</i>	<i>0.52</i>	
			n=	491	361	136	988	490
ASMT	L11F	possiblement délétère	réduite	1	0	0	1	0
	N13H	bénin	normale	0	1	0	1	0
	N17K	possiblement délétère	abolie	2	1	2	5	0
	G32C	probablement délétère		0	0	1	1	0
	V46M	possiblement délétère		0	0	0	0	1
	E61Q	possiblement délétère	réduite	0	0	0	0	1
	K81E	bénin	normale	1	0	0	1	0
	V171M	probablement délétère	abolie	0	1	0	1	0
	IVS5+2T>C	délétère		3	1	0	4	1
	M198R	bénin		1	0	0	1	0
	Y201X	probablement délétère		0	0	0	0	1
	D210G	probablement délétère	abolie	0	0	0	0	1
	K219R	bénin	normale	0	0	0	0	1
	IVS7+1G>T	délétère		0	1	0	1	0
	P243L	probablement délétère	réduite	0	0	0	0	1
	H264D	bénin		0	0	1	1	0
	I269M	possiblement délétère	réduite	1	0	0	1	0
	C273S	probablement délétère	réduite	1	0	0	1	1
G278A	possiblement délétère	réduite	1	0	0	1	0	
E288D	bénin	normale	0	2	0	2	0	
R291Q	probablement délétère	abolie	0	0	0	0	1	
L298F	possiblement délétère	abolie	2	1	0	3	2	
H318D	bénin	réduite	1	0	0	1	0	
total				14	8	4	26	11
freq total				0,029	0,022	0,029	0,026	0,022
<i>p (vs 490 ctrls)</i>				<i>0.69</i>	<i>1.00</i>	<i>0.75</i>	<i>0.73</i>	
total délétère				12	5	3	20	10
freq délétère				0,024	0,014	0,022	0,020	0,020
<i>p (vs 490 ctrls)</i>				<i>0.83</i>	<i>0.60</i>	<i>1.00</i>	<i>1.00</i>	

Tableau 3.4. Récapitulatif des fréquences des mutations dans les gènes AANAT et ASMT dans les différentes populations de patients avec troubles neurodéveloppementaux étudiées. (RM : retard mental)

significatif de mutations (cf tableau 3.4 récapitulatif). La fréquence des mutations dans les cohortes de patients avec TSA et avec retard mental est en réalité légèrement plus élevée que chez les témoins, mais la différence n'est pas significative. Les fréquences étant faibles, les effectifs étudiés ici ne permettent pas de mettre en évidence un

enrichissement faible par défaut de puissance statistique. Le regroupement des différentes cohortes de troubles neurodéveloppementaux est insuffisant pour mettre en évidence une différence significative. La microduplication du gène *ASMT* n'a pas été retrouvée plus fréquemment chez les patients avec TSA que chez les témoins, ce qui contraste avec une étude précédente (Cai et al., 2008). Globalement, ces données indiquent que les mutations dans les gènes *AANAT* et *ASMT* ne sont pas des facteurs de risque majeurs de TSA ou d'autres troubles neurodéveloppementaux.

Une limite à notre étude de criblage mutationnel est l'absence de stratification ethnique des populations étudiées. En effet, les données issues du séquençage à haut débit à l'échelle des populations (projet *1000 genomes*, base de données *Exome Variant Server*) indiquent que la fréquence des mutations dans les gènes *AANAT* et *ASMT* varie de manière importante d'une population à l'autre : elle apparaît notablement plus élevée dans les populations d'origine africaine que dans les populations caucasiennes. La majorité des patients et des témoins inclus dans notre étude et dans les autres études considérées pour la méta-analyse est d'origine caucasienne, et le biais introduit par l'hétérogénéité ethnique de la population étudiée est probablement mineur. Toutefois, la fréquence des mutations retrouvée par ces études à haut débit dans les populations caucasiennes (0,79% pour *1000 genomes*, 1% pour *EVS*) est nettement inférieure à la fréquence estimée par séquençage dans notre cohorte de témoins. Cette différence peut s'expliquer par des performances encore insuffisantes des technologies de séquençage à haut débit en termes de couverture, ou par un biais dans notre population de témoins.

Des polymorphismes dans le promoteur du gène *ASMT* (rs4446909 et rs5989681) ont été rapportés comme étant associés aux TSA – avec un odds-ratio faible, voisin de 1,5 (Melke et al., 2008). Cette association a été investiguée dans une étude indépendante mais n'a pas été totalement répliquée, même si une tendance similaire était détectée (Toma et al., 2007). Une stratégie possible pour augmenter la puissance des analyses d'association serait d'utiliser comme variable dépendante non le statut clinique (atteint vs non atteint) mais le statut biochimique (par exemple, déficit en mélatonine vs mélatonine normale). Cette approche permettrait d'améliorer l'homogénéité des populations étudiées pour les endophénotypes considérés, et donc de mieux détecter des associations avec des facteurs de risque faibles. Dans cette perspective, l'étude de l'expression génique d'*ASMT* dans les lignées lymphoblastoïdes met en évidence une association entre les polymorphismes du promoteur d'*ASMT* et les taux de transcrits,

chez les patients comme chez les témoins, les allèles « à risque » étant associés à des taux de transcrits plus faibles. Ces polymorphismes contribuent donc probablement aux variations de la sécrétion de la mélatonine observées.

En lien avec les anomalies de la voie de la mélatonine dans les TSA, des mutations des récepteurs de la mélatonine, codés par les gènes *MTNR1A* et *MTNR1B*, ont également été recherchées et caractérisées sur le plan fonctionnel (cf. annexe 6 : Chaste et al, 2010). Tout comme dans le cas des enzymes de synthèse, des mutations délétères ont été identifiées dans les gènes codants pour les récepteurs de la mélatonine, mais les patients avec TSA ne présentent pas un enrichissement significatif de ces mutations.

On ne peut exclure que des anomalies génétiques affectant les gènes-candidats *AANAT* ou *ASMT* et non investiguées dans cette étude, par exemple des variations non codantes, introniques ou situées dans des séquences régulatrices distales, interviennent dans les anomalies de synthèse de la mélatonine. Toutefois, l'atteinte simultanée, chez une large proportion de patients, des deux enzymes *AANAT* et *ASMT*, suggère qu'il est peu probable que les anomalies de synthèse résultent d'une anomalie monogénique affectant l'un de ces gènes. La présence simultanée d'anomalies génétiques rares dans chacun des deux gènes est également peu probable. Dans la mesure où ces deux enzymes semblent former des complexes dans la glande pinéale humaine (cf. annexe 5 : Maronde et al, 2011), il est possible que la perte de d'expression ou de fonction de l'une des protéines se répercute par une déstabilisation de la seconde. Néanmoins, l'hypothèse la plus probable est que les anomalies de synthèse de la mélatonine résultent de la perturbation d'un mécanisme de régulation plus global, dont la nature reste à déterminer.

Parmi les différents niveaux d'altérations envisageables, l'expression des ARNm des gènes *AANAT* et *ASMT* a été explorée.

3.5.2. Régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de la synthèse de la mélatonine

La quantification des ARNm par PCR quantitative dans les lignées lymphoblastoïdes met en évidence une diminution des taux de transcrits d'*ASMT* chez les patients avec TSA par rapport aux témoins. Les lignées lymphoblastoïdes sont des modèles imparfaits pour l'étude de la synthèse de la mélatonine, d'une part car cette synthèse est quantitativement faible dans les lymphocytes, et d'autre part car la transformation oncogénique et le maintien en culture engendrent des artefacts. Toutefois, l'association

observée entre la quantité d'ARNm et le génotype du promoteur d'*ASMT* suggère que la transcription du gène dans ces lignées est contrôlée par des mécanismes potentiellement pertinents *in vivo*. Les taux de transcrits apparaissent globalement corrélés à l'activité enzymatique mesurée dans les lignées, mais cette corrélation est inconstante d'une série à l'autre. En revanche, aucune corrélation significative n'a pu être détectée entre ces taux de transcrits et l'activité ASMT plaquettaire ou la mélatonine plasmatique (données non présentées), plus proches de la physiologie *in vivo*. Ces observations soulignent les limites du modèle des lignées lymphoblastoïdes, relativement éloigné de la physiologie et susceptible d'être affecté par des artefacts de transformation et de culture.

Les études de transcriptome réalisées à partir de lignées lymphoblastoïdes (Hu et al., 2009) ou de leucocytes (Kuwano et al., 2011) de patients avec TSA ont mis en évidence des variations d'expression de gènes impliqués dans des processus potentiellement pertinents pour la physiopathologie des TSA, dont le développement et le fonctionnement du système nerveux central, ce qui suggère que ces modèles sont, dans une certaine mesure, informatifs pour explorer la physiopathologie des TSA. (Hu et al., 2009) rapportent notamment des variations d'expression de gènes impliqués dans les rythmes circadiens, parmi lesquels le gène *AANAT*, chez les patients présentant le phénotype autistique le plus sévère. Toutefois, nos données ne confirment pas ces résultats, puisque les taux de transcrits d'*AANAT* quantifiés dans les lignées lymphoblastoïdes de notre cohorte ne montrent pas de différence par rapport aux témoins. En outre, l'étude de Rollins et al. (2010), qui compare les transcriptomes de lymphocytes, de lignées lymphoblastoïdes et de cerveau issus des mêmes sujets, souligne les limites de l'approche gènes-candidats sur les cellules périphériques et sur les lignées transformées. En effet, la transformation des lymphocytes par le virus d'Epstein-Barr modifie significativement l'expression de près de 30% des transcrits, ce qui confirme que les résultats obtenus sur ce modèle risquent d'être biaisés par des artefacts. Par ailleurs, la comparaison des transcriptomes de cellules sanguines et de cerveau montre que près de 80% des transcrits présentent une expression différentielle entre ces deux tissus, et 90% un épissage différentiel, ce qui rappelle le caractère tissu-spécifique de l'expression génique.

Contrairement aux résultats obtenus dans les lignées lymphoblastoïdes, l'étude des ARNm des gènes *AANAT* et *ASMT* dans les glandes pinéales issues de patients n'a pas

permis de mettre en évidence d'altération quantitative (taux de transcrits) ou qualitative (épissages alternatifs du gène *ASMT*) chez les patients par rapport aux témoins. Le faible nombre d'échantillons investigués constitue la première limite de cette étude – mais ce nombre était suffisant pour mettre en évidence des altérations biochimiques. La seconde limite réside dans la médiocre qualité des ARN extraits des glandes pinéales post mortem : les ARN sont instables et subissent inévitablement une dégradation pendant le délai qui sépare le décès de la congélation des tissus. La médiane des RIN (*RNA Integrity Number*), index de qualité mesurée par le système de Bioanalyzer (Agilent), est de 6 pour un score maximum à 10. Toutefois, l'amplification des ARN par RT-PCR est possible et les produits d'amplification semblent être de bonne qualité (cf. figure 2.6) ; seul un échantillon n'était pas amplifiable (la production d'un *smear* au lieu d'une bande nette est caractéristique des matrices dégradées) et a été exclu de l'étude. La quantification des ARN cibles est normalisée par trois gènes de référence, dont on peut supposer qu'ils suivent une cinétique de dégradation globalement parallèle. Les taux de transcrits quantifiés dans les glandes pinéales, une fois normalisés, présentent une variabilité interindividuelle relativement faible par rapport aux lignées lymphoblastoïdes, et ne sont corrélés ni au RIN, ni à l'intervalle post mortem (PMI). Ces éléments suggèrent que la dégradation des ARN n'a eu qu'un impact mineur sur la quantification des transcrits *AANAT* et *ASMT*.

La régulation de la phase circadienne de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale est bien documentée chez les rongeurs et en particulier chez le rat, où elle repose principalement sur une régulation transcriptionnelle de la synthèse d'AANAT. Les ARNm, la protéine et l'activité AANAT présentent en effet d'importantes variations circadiennes : très faibles le jour, ils présentent une augmentation nocturne d'un facteur 100 environ. La transcription du gène est activée par la stimulation β_1 -adrénergique nocturne de la glande pinéale et fait intervenir le facteur de transcription CREB (voir pour revue Simonneaux et Ribelayga, 2003). Des régulations post-traductionnelles interviennent également : la protéine AANAT est activée et stabilisée par phosphorylation en position Thr³¹ par la protéine kinase A, et par la formation de complexes avec la protéine chaperonne 14-3-3, qui empêchent la dégradation par le protéasome. Enfin, un niveau de régulation post-transcriptionnel a récemment été proposé : le micro-ARN miR-483 pourrait réguler l'expression développementale d'AANAT (Clokic et al., 2012). Toutefois, il existe d'importantes variations inter-

espèces des mécanismes de régulation d'AANAT. Ainsi, chez les ovins, les bovins et les primates, si l'activité AANAT semble déterminer la phase de sécrétion de la mélatonine comme chez les rongeurs, les taux d'ARNm d'*AANAT* sont relativement stables au cours du nyctémère, et la régulation circadienne de l'activité AANAT semble faire intervenir principalement des mécanismes post-traductionnels. Chez l'homme, les ARNm d'*AANAT* quantifiés dans des glandes pinéales post mortem ne présentent pas de variations significatives en fonction de l'heure de décès, contrairement à l'activité enzymatique (Ackermann et al., 2006) – nos résultats confirment ces observations. Une phosphorylation d'AANAT en position Thr³¹ a été montrée comme chez le rat, mais chez l'homme cette phosphorylation est constitutive, et les taux d'AANAT phosphorylée ne présentent pas de variations circadiennes (cf annexe 5 : Maronde et al, 2011). La formation de complexes impliquant AANAT et la protéine 14-3-3, ainsi qu'ASMT et l'antigène S (ou arrestine), a été mise en évidence, et ces complexes sont localisés dans des structures cellulaires allongées spécifiques des pinéaloctes. La formation et la localisation subcellulaire de ces complexes protéiques pourrait constituer un mécanisme de régulation de la synthèse circadienne de la mélatonine dans la glande pinéale humaine.

La régulation circadienne de l'enzyme ASMT est mineure comparée à celle d'AANAT : l'activité ASMT dans la glande pinéale ne varie que d'un facteur 2 environ entre le jour et la nuit. Chez le rat, ces variations semblent liées à des régulations transcriptionnelles, mais les mécanismes n'en sont que partiellement élucidés (Simonneaux et Ribelayga, 2003). Chez l'homme, l'activité ASMT mesurée dans les glandes pinéales post mortem semble présenter des variations mineures en fonction de l'heure de décès (d'un facteur 2 selon nos données, ce qui confirme les résultats d'Ackermann et al. (2006), et est étroitement corrélée à la quantité de protéine ASMT (cf annexe 5 : Maronde et al., 2011). En revanche, comme pour AANAT, les ARNm d'*ASMT* ne semblent pas présenter de variations circadiennes significatives. Le phénomène d'exclusion allélique observé dans les lignées lymphoblastoïdes suggère que des facteurs épigénétiques pourraient intervenir dans le contrôle de l'expression d'*ASMT* ; cette hypothèse serait à confirmer dans les glandes pinéales.

Les régulations de la synthèse de mélatonine dans les tissus périphériques sont très peu documentées, il est probable que des différences notables existent entre les mécanismes périphériques et les régulations dans la glande pinéale. Ainsi, ni l'activité AANAT ni

l'activité ASMT ne présentent de variations circadiennes dans les échantillons d'iléons post mortem investigués pour notre étude. La qualité des échantillons n'a pas permis d'étudier les ARNm d'*AANAT* et *ASMT* dans le tractus gastro-intestinal. S'il est possible que les altérations de la synthèse de la mélatonine chez les patients avec TSA impliquent pour partie des mécanismes transcriptionnels en périphérie, comme le suggèrent les données issues des lignées lymphoblastoïdes, en revanche il est probable que les déficits en *AANAT* et *ASMT* résultent d'autres mécanismes au niveau central. Ces mécanismes sont à élucider, ils pourraient être de nature traductionnelle ou post-traductionnelle. Parmi les mécanismes post-traductionnels, une hypothèse concerne la formation des complexes protéiques impliquant *AANAT*, *ASMT*, la protéine 14-3-3 et l'antigène S, ou encore leur localisation subcellulaire, qui pourraient être perturbées chez les patients avec TSA. L'évaluation des quantités de protéines *AANAT* et *ASMT* dans les glandes pinéales de patients avec TSA par Western blot, ainsi que l'étude de leurs localisations subcellulaires par immunohistochimie, pourraient permettre de documenter cette hypothèse.

3.6. Discussion : Spécificité nosographique des altérations de la mélatonine

La sécrétion de la mélatonine est encore mal caractérisée sur le plan biochimique dans les troubles neurodéveloppementaux autres que les TSA – à l'exception notable du syndrome de Smith-Magenis, syndrome génétique caractérisé par une inversion de la phase de sécrétion de la mélatonine (pic diurne), et associé sur le plan clinique à des dysmorphies, un retard mental, des troubles du comportement sévères, et des troubles du sommeil (De Leersnyder, 2006). En revanche, des anomalies de la mélatonine ont été décrites dans des pathologies psychiatriques de l'adulte. Ainsi, une hypersensibilité à la suppression de la sécrétion de mélatonine par la lumière et un retard du pic de sécrétion de mélatonine nocturne ont été rapportés chez les patients atteints de trouble bipolaire (Kennedy et al., 1996, Nurnberger et al., 2000). Ces endophénotypes ont été proposés comme marqueurs de trait, dans la mesure où ils sont retrouvés chez les patients présymptomatiques, et également chez les patients en rémission. Des anomalies de la mélatonine ont également été décrites chez les patients atteints de dépression majeure ou de dépression saisonnière. La nature de ces altérations semble varier d'une étude à l'autre (et, sans doute, d'un patient à une autre), mais consisterait dans la majorité des cas en un retard de phase et en une désynchronisation de la phase circadienne de la mélatonine et de celle des rythmes veille-sommeil (Lewy et al., 2006,

et Lewy, 2009 pour revue). La faible sécrétion endogène de mélatonine, observée dans une fraction de la population générale, a été associée à des troubles dépressifs subcliniques (Rahman et al., 2010). Enfin, des altérations du rythme de la mélatonine ont également été décrites chez des patients atteints de schizophrénie, à titre de retard de phase principalement (Wulff et al., 2012). Ainsi, les altérations de la mélatonine semblent constituer un endophénotype transnosographique des pathologies neuropsychiatriques, même si la nature précise de ces altérations est variable.

Parallèlement aux altérations de la mélatonine, les troubles du sommeil et les altérations des rythmes circadiens sont récurrents dans ces pathologies (voir pour revue Etain et al., 2011), ainsi que dans plusieurs catégories de troubles neurodéveloppementaux pédiatriques, dont les retards mentaux (Didde et Sigafos, 2001) et le TDAH (van der Heijden et al., 2005).

À ce titre, la mélatonine constitue une piste thérapeutique dans ces pathologies. Ainsi, l'agomélatine, agoniste des récepteurs MT1 et MT2 (également agoniste du récepteur sérotoninergique 5HT_{2B} et antagoniste du récepteur 5HT_{2C}) est un médicament commercialisé comme antidépresseur. La prise en charge du syndrome de Smith-Magenis comporte une supplémentation nocturne en mélatonine et une inhibition de la sécrétion diurne par des β -bloquants. Plusieurs études ont rapporté une efficacité du traitement par la mélatonine pour les troubles du sommeil associés aux TSA (cf introduction, section 3), aux retards mentaux (Braam et al., 2009), et au TDAH (Weiss et al., 2006).

Les mécanismes des altérations de la mélatonine associées aux pathologies neuropsychiatriques restent à élucider – et leur caractère causal ou secondaire est encore spéculatif dans beaucoup de cas. Les gènes *AANAT* et *ASMT* ont été investigués dans différentes pathologies. Tout comme dans les TSA, les recherches de variants codants rares n'ont pas montré d'enrichissement dans les cohortes psychiatriques investiguées : criblage du gène *ASMT* chez des patients avec retard mental (cf section 3.1) ou avec trouble bipolaire (cf. annexe 4 : Etain et al, 2012), criblage du gène *AANAT* chez des patients avec dépression majeure (Soria et al., 2010), criblage des deux gènes chez des patients avec TDAH (cf. annexe 3 : Chaste et al, 2011). La stratégie de criblage basé sur le symptôme-candidat des troubles du sommeil chez des patients avec troubles neurodéveloppementaux n'a pas montré de résultats plus convaincants (cf. section 3.2). De même, les recherches de mutations rares dans les gènes codant pour les récepteurs à

la mélatonine chez des patients avec TSA (cf. annexe 6 : Chaste et al, 2010) ou avec TDAH (cf. annexe 3 : Chaste et al, 2011) n'ont pas permis de mettre en évidence un enrichissement de variants rares dans ces populations. Ces données suggèrent que la contribution des variants codants rares des gènes de la voie de la mélatonine dans les altérations de la mélatonine et les troubles des rythmes circadiens associés aux pathologies neuropsychiatriques est mineure.

En revanche, plusieurs études d'association basées sur une approche gène-candidat ont mis en évidence une association entre des polymorphismes fréquents aux loci de ces gènes et des pathologies neuropsychiatriques. Ainsi, les études portant sur les polymorphismes non codants situés dans le promoteur du gène *ASMT* (SNPs rs4446909, rs5989681, rs56690322 et rs6644635) indiquent que l'haplotype formé respectivement par les allèles ACGC de ces SNPs serait un facteur protecteur contre le risque de TSA (Melke et al., 2008), de trouble bipolaire (cf. annexe 4 : Etain et al, 2012), de dépression (Galecki et al., 2010) et de symptômes dépressifs chez des sujets présentant un retard de phase de sommeil (Kripke et al., 2011). A l'inverse, l'haplotype GGGC a été rapporté comme un facteur de risque. De manière intéressante, l'haplotype « protecteur » est associé à des taux d'ARNm d'*ASMT* plus élevés que l'haplotype « à risque » (Melke et al., 2008, Etain et al., 2012) dans les lignées lymphoblastoïdes des patients comme des témoins, ce que confirment nos données. Des SNPs situés à proximité du gène *AANAT* ont également été associés au risque de dépression (Soria et al., 2010). Toutefois, les odds-ratios associés à ces polymorphismes sont faibles (de l'ordre de 0,6-0,9 pour les allèles protecteurs et 1 à 2 pour les allèles à risque), et les tentatives de répliquions indépendantes ont produit des résultats équivoques (Toma et al., 2007 pour les TSA, Kripke et al., 2011 pour la dépression). Globalement, ces résultats suggèrent que des polymorphismes fréquents susceptibles d'influencer l'expression des gènes *ASMT* et *AANAT* pourraient être associés au risque de développer un trouble neuropsychiatrique. Ces études requièrent encore des répliquions sur des cohortes indépendantes. Une approche basée sur des phénotypes-candidats (biochimiques ou circadiens) plutôt que sur les catégories nosographiques pourrait permettre d'améliorer la puissance statistique de telles études.

Au-delà des gènes impliqués directement dans la synthèse de la mélatonine, plusieurs études indépendantes ont rapporté des associations entre des polymorphismes des gènes circadiens (tels que *CLOCK* ou les gènes *PER*) et les troubles de l'humeur (voir pour

revue Etain et al., 2011). Les « gènes clock » constituent un réseau formant une boucle de régulation transcriptionnelle oscillant avec une période proche de 24h ; leur inactivation chez l'animal provoque une perturbation des rythmes circadiens. S'il n'existe pas d'arguments génétiques en faveur d'une implication de ces gènes dans les TSA, l'étude des oscillations de l'expression de ces gènes chez les patients (par exemple par une stratégie basée sur les ARN extraits de la salive, comme proposé en annexe 7 : Pagan et al, 2012) permettrait peut-être de mettre en évidence des anomalies moléculaires des rythmes circadiens.

Ainsi, les altérations de la mélatonine, des rythmes circadiens et des rythmes veille-sommeil apparaissent comme des endophénotypes transnosographiques, documentés dans différentes pathologies neuropsychiatriques. Des études comparant différentes populations de patients avec les mêmes méthodes sont requises pour déterminer si les natures précises des altérations sont spécifiques de pathologies. Les mécanismes de ces altérations, et en particulier leur caractère primaire ou secondaire, sont encore à élucider. Quoiqu'il en soit, la mélatonine constitue une cible thérapeutique pour ces pathologies.

4. ELEMENTS DE DISCUSSION COMPLEMENTAIRES : MECANISMES ET CAUSALITE DES ANOMALIES DE LA VOIE SEROTONINE-MELATONINE

4.1. Étude familiale et longitudinale des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine au niveau sanguin.

Le caractère primaire ou secondaire des altérations observées est un point crucial mais néanmoins difficile à établir. Les endophénotypes au sens strict, tels que définis en introduction (section 2.5), devraient répondre à plusieurs critères, parmi lesquels le caractère héritable et le caractère causal. S'il est difficile de valider formellement ces critères, l'étude des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine à partir de prélèvements sanguins à l'échelle des familles permet d'estimer l'héritabilité des traits biochimiques ainsi que la ségrégation de ces traits avec la pathologie dans les familles. En outre, les éléments d'étude longitudinale dont nous disposons peuvent apporter des éléments d'information.

4.1.1. Héritabilité

L'héritabilité est l'un des critères majeurs définissant les endophénotypes au sens strict. Elle peut être estimée quantitativement par l'étude des corrélations intrafamiliales des traits biochimiques. Une héritabilité élevée est classiquement considérée comme le reflet d'un déterminisme génétique prépondérant.

4.1.1.1. Méthode : estimation de l'héritabilité.

L'héritabilité des différents paramètres biochimiques explorés dans le sang lors de cette étude a été estimée dans les trios père-mère-enfant par la méthode de la corrélation parent moyen – descendant (Ollivier, 1971), après correction des valeurs des patients avec TSA et des frères et sœurs non atteints pour l'effet de l'âge. L'héritabilité (notée h^2) est liée au coefficient de corrélation entre les valeurs mesurées chez les sujets et les moyennes des valeurs mesurées chez les parents par la formule : $h^2 = \sqrt{2} \cdot r$. L'héritabilité a été estimée séparément pour les patients avec TSA et pour les frères et sœurs non atteints – considérés comme une approximation de l'héritabilité attendue dans la population générale.

4.1.1.2. Héritabilité de la sérotoninémie et des paramètres de son catabolisme

	patients TSA		fratrie	
	n	h ²	n	h ²
sérotonine	163	0,33	85	0,68
5-HIAA	165	0,67	85	0,80
PST	54	0,16	31	0,14
AANAT	133	0,45	50	0,43
NAS	107	0,64	34	0,84
ASMT	96	0,27	34	0,44
mélatonine	144	0,36	57	0,31

Tableau 4.1. Héritabilités (h²) estimées par la méthode de corrélation parent moyen – descendant. Les différents paramètres sont mesurés dans le sang ou les plaquettes sanguines. Le nombre de trios utilisés pour chaque estimation est indiqué.

L'héritabilité de la sérotoninémie est relativement faible chez les patients avec TSA (tableau 4.1). Cette estimation est cohérente avec l'absence d'hypersérotoninémie significative chez les parents de notre cohorte. L'héritabilité de la sérotoninémie est plus élevée chez les frères et sœurs non atteints, ce qui suggère que le déterminisme génétique est prépondérant pour cette population, et que des mécanismes différents, non génétiques, régulent les taux de sérotonine chez les patients avec TSA.

La sérotoninémie a été rapportée comme étant fortement héritable dans la population générale (Weiss et al., 2005). Dans le contexte des TSA, plusieurs études antérieures ont mis en évidence une élévation de la sérotoninémie chez les apparentés au premier degré des patients (Kuperman et al., 1985, Abramson et al., 1989, Cook et al., 1990, Leventhal et al., 1990, Leboyer et al., 1999, Melke et al., 2008), qui n'est pas retrouvée dans notre étude – qui porte pourtant sur de plus grands effectifs. Les raisons de cette discordance sont inconnues. On peut évoquer un biais lié aux traitements psychotropes, et en particulier aux antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, qui pourraient réduire les taux de sérotonine plaquettaire (Bismuth-Evenzal et al., 2012). Un biais lié au régime pauvre en tryptophane, préconisé dans les 48h avant le prélèvement sanguin mais qui a pu être aléatoirement observé, est également possible.

Les concentrations de 5-HIAA plasmatiques sont associés à une héritabilité élevée, la composante génétique semble donc prépondérante dans le déterminisme du catabolisme par la MAO-A. En revanche, l'activité PST plaquettaire a une héritabilité très faible (même si elle a été estimée à partir d'un petit nombre de trios), ce qui suggère une régulation par des facteurs non génétiques – ce qui est cohérent avec la composante « non héritée » observée pour l'hypersérotoninémie chez les patients avec TSA.

4.1.1.3. Héritabilité de la mélatonine et de ses paramètres de la voie de synthèse

Les activités AANAT et ASMT plaquettaire, ainsi que la mélatonine plasmatique, sont associées à des héritabilités faibles, comparables entre les patients et les frères et sœurs non atteints. Seule la NAS plaquettaire présente une forte héritabilité. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où les anomalies de synthèse de la mélatonine sont retrouvées chez les apparentés des patients avec TSA pour tous les paramètres étudiés. La distribution non gaussienne des variables biochimiques constitue une limite à ces estimations d'héritabilité, basées sur des corrélations linéaires, et qui peuvent donc être sous-estimées (ou surestimées) du fait de biais de distribution. La transformation catégorielle de ces variables (valeur déficitaire vs valeur normale) indique qu'un déficit d'activité ASMT chez la mère est faiblement mais significativement prédictif d'un déficit en ASMT chez l'enfant avec TSA (OR[IC95]=2,2[1-5], p=0,05). A l'inverse, le déficit d'activité AANAT chez le père est significativement prédictif du même déficit chez les enfants atteints (OR[IC95]=2,7[1,1-6,7], p=0,02) et plus encore chez les enfants non atteints (OR[IC95]=10,8[2,2-52,1], p=0,002), mais pas le déficit d'activité AANAT chez la mère, ce qui suggère que des phénomènes d'empreinte parentale pourraient intervenir. Toutefois, le déficit en mélatonine chez les parents (retrouvé pour 29% des pères et 45% des mères) n'est pas associé à un déficit chez les enfants plus que ne le prédit l'hypothèse d'indépendance des variables (test de Chi-2 de Pearson : p=0,62 pour les pères, p=0,79 pour les mères). Globalement, ces corrélations intrafamiliales équivoques suggèrent qu'il existe une part importante de déterminisme non génétique dans le déficit en mélatonine observé chez les patients avec TSA.

4.1.2. Ségrégation

La notion de ségrégation est complémentaire de l'héritabilité ; elle indique que la transmission d'un trait dans les familles est associée à la transmission de la pathologie.

4.1.2.1. Méthode : estimation des taux de concordance pour les altérations de la voie sérotonine-mélatonine dans les fratries.

Les taux de concordance pour les altérations de la voie sérotonine-mélatonine observées au niveau sanguin ont été déterminés, d'une part, dans les familles multiplexes, entre deux enfants atteints de la fratrie, et, d'autre part, entre les proposants et un frère ou une sœur non atteint. La concordance est définie sur la base des variables catégorielles : par exemple, une paire dans laquelle les deux sujets présentent une sérotonine élevée est

	Paires atteint/atteint			Paires atteint/non atteint		
	n	Concordance (%)	p (Pearson)	n	Concordance (%)	p (Pearson)
sérotonine	21	67%	0,43	92	60%	0,65
AANAT	19	58%	0,86	53	64%	0,09
NAS	12	57%	0,31	35	63%	0,02
ASMT	12	50%	0,38	35	57%	0,83
mélatonine	20	60%	0,36	61	51%	0,74

Tableau 4.2. Taux de concordance pour les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine observés pour les paires de germains atteints, ainsi que pour les paires constituées d'un sujet atteint et d'un frère ou d'une sœur non atteint. Les différents paramètres sont ceux mesurés dans le sang et les cellules sanguines. Le nombre de paires étudiées pour chaque paramètre est indiqué, ainsi que le pourcentage de concordance. L'hypothèse d'indépendance de distribution des anomalies biochimiques au sein des paires de germains a été testée pour chaque paramètre par un test de Chi-2 de Pearson.

dite concordante pour la sérotonine, une paire dans laquelle les deux sujets ont une sérotonine normale est également considérée comme concordante, mais une paire dans laquelle un sujet a une sérotonine élevée et l'autre une sérotonine normale est classée discordante. Le test de Chi-2 de Pearson permet de déterminer si la concordance observée est supérieure à celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance des variables.

Sous l'hypothèse de ségrégation des traits biochimiques avec la pathologie, on s'attend à ce que les taux de concordance soient plus élevés entre les paires de germains atteints qu'entre les paires composées d'un sujet atteint et d'un frère ou d'une sœur non atteint. En outre, on s'attend à ce qu'un paramètre anormal chez un proposant soit associé à une anomalie de ce même paramètre chez le frère ou la sœur atteint (test de Chi-2).

4.1.2.2. Résultats : ségrégation des altérations de la voie sérotonine-mélatonine dans les fratries multiplexes

Les taux de concordance n'apparaissent pas significativement supérieurs pour les paires composées de deux frères ou sœurs atteints comparées aux paires composées d'un sujet atteint et d'un frère ou d'une sœur non atteint, quel que soit le paramètre envisagé (tableau 4.2). En outre, au sein de paires de germains atteints, la distribution des traits biochimiques n'est pas différente de celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance des variables – c'est-à-dire qu'une anomalie d'un paramètre chez le proposant n'est pas significativement associée à une anomalie de ce même paramètre chez le frère ou la sœur atteint.

Il existe un biais de répartition de certaines anomalies biochimiques entre les probands et les frères et sœurs non atteints (tendance pour les déficits d'activité AANAT, biais

significatif pour l'augmentation de la NAS plaquettaire), ce qui indique une agrégation familiale de ces traits.

Même si le petit nombre de paires de germains atteints étudiées est une limite majeure de cette étude, ces résultats suggèrent que les altérations biochimiques ne ségrègent pas significativement avec la pathologie au sein des familles.

4.1.3. Stabilité longitudinale

Un endophénotype au sens strict, causal et hérité, devrait théoriquement être constant dans le temps chez un sujet donné. Certains sujets ont été inclus à deux reprises dans notre étude et fournissent donc l'opportunité d'une étude longitudinale.

4.1.3.1. Méthode : étude longitudinale des paramètres biochimiques sanguins

40 à 102 sujets (selon les paramètres considérés) ont été prélevés à deux reprises. Pour la sérotonine, par exemple, ces 102 sujets incluaient 32 patients avec TSA, 52 parents et 18 frères et sœurs non atteints. Les délais entre les deux prélèvements varient de 2,5 à 10 ans, avec une médiane à 7 ans.

Comme dans le cas de la ségrégation, la concordance longitudinale est définie sur la base des variables catégorielles : par exemple, un sujet qui présente une sérotonine élevée dans les deux prélèvements est dit concordant pour la sérotonine, un sujet qui présente une sérotonine normale dans les deux prélèvements est également considéré comme concordant, mais un sujet qui présente une sérotonine élevée dans un prélèvement et normale dans l'autre est classé discordant. Le test de Chi-2 de Pearson permet de déterminer si la concordance longitudinale observée est supérieure à celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance des variables.

4.1.3.2. Résultats : stabilité et concordance longitudinale des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine

L'étude des variables quantitatives ne permet pas de mettre en évidence de corrélation significative entre les valeurs obtenues dans deux prélèvements différents pour les différents paramètres biochimiques investigués (figure 4.1). En outre, la considération des variables catégorielles met en évidence une tendance à la concordance longitudinale pour la sérotonine sanguine, et peut-être pour la mélatonine plasmatique, mais pas pour les autres paramètres (tableau 4.3). Ces résultats indiquent que les différents paramètres investigués pour la voie sérotonine-mélatonine présentent une faible stabilité

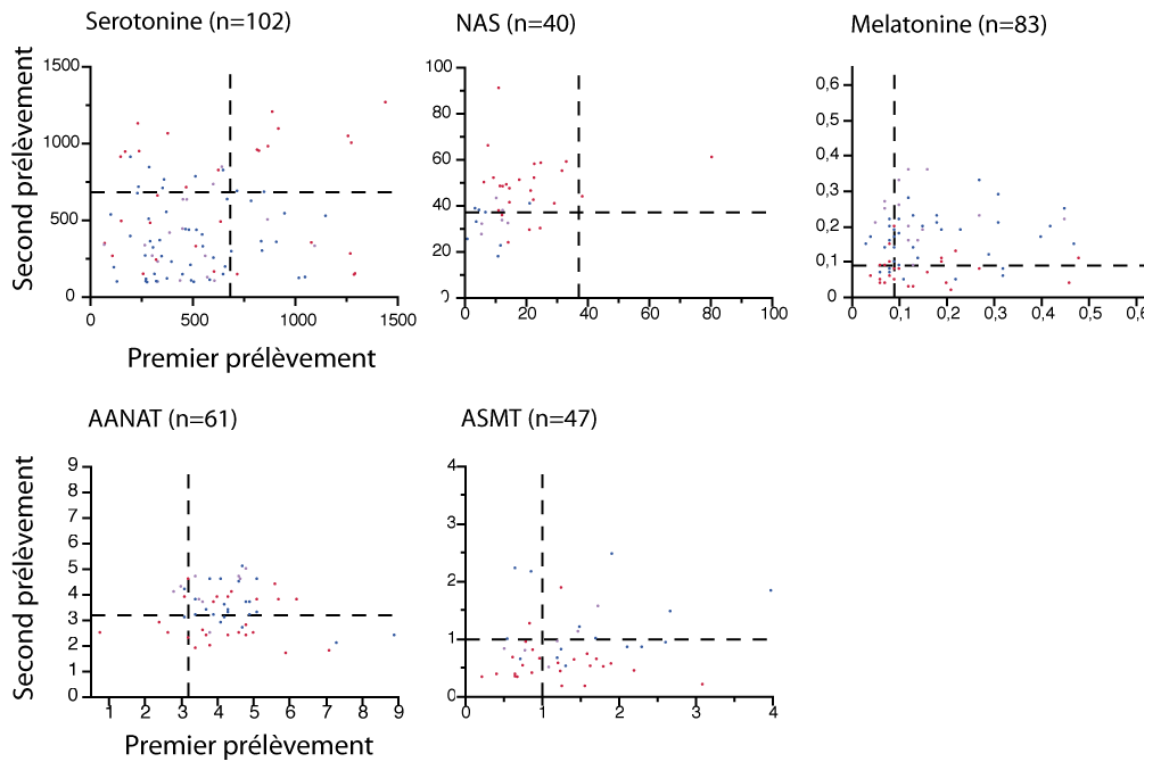


Figure 4.1. Stabilité longitudinale des paramètres biochimiques explorés, dosés sur deux échantillons de sang différents prélevés à deux reprises à plusieurs années d'intervalle (2,5 à 10 ans). En rouge : patients avec TSA, en bleu : parents, en violet : frères et sœurs non atteints. Les lignes pointillées indiquent les seuils qui définissent les variables catégorielles (90^{ème} ou 10^{ème} percentile des témoins).

longitudinale : chez un tiers à deux tiers des sujets, un paramètre biochimique anormal se normalise au cours du temps, ou inversement. Dans le cas de la NAS et des activités AANAT et ASMT plaquettaires, la situation de discordance la plus fréquente est celle d'une valeur initialement normale qui devient pathologique dans le second prélèvement.

Plusieurs facteurs sont susceptibles de modifier les paramètres biochimiques investigués pour cette étude, parmi lesquels l'âge au moment du prélèvement, la prise de médicaments (et notamment de médicaments psychotropes), l'heure et la saison de prélèvement, le régime alimentaire... En particulier, les différents paramètres étudiés varient en fonction de l'âge, et présentent des valeurs plus élevées chez les enfants que chez les adultes : la variation d'âge du sujet entre deux prélèvements distants de plusieurs années est donc une source de variations biochimiques. Toutefois, on peut s'attendre à ce que cet effet soit atténué chez les sujets prélevés à deux reprises à l'âge adulte, or les corrélations et taux de concordance observés ne sont pas supérieurs si l'on restreint l'analyse aux sujets adultes. L'effet de l'âge ne suffit donc pas à expliquer les variations longitudinales observées. La saison du prélèvement et la prise de

	n	%	p
sérotonine	102	68%	0,08
AANAT	61	62%	0,46
NAS	40	38%	1,00
ASMT	47	51%	0,49
mélatonine	83	65%	0,19

Tableau 4.3. Concordance longitudinale des paramètres étudiés, testée par le Chi-2 de Pearson.

médicaments psychotropes, étudiées individuellement, ne montrent pas d'impact significatif sur les paramètres étudiés (test de Kruskal-Wallis pour le groupe des patients : $p=0,24$ à $0,44$ pour l'effet de la saison selon le paramètre considéré, $p=0,42$ à $0,92$ pour l'effet des médicaments psychotropes). Toutefois, un effet mineur et cumulatif de ces facteurs ne peut être exclu. Les aléas d'observance du régime alimentaire pauvre en tryptophane préconisé, ainsi que des variations mineures de l'heure de prélèvement, ou encore de la préparation pré-analytique des échantillons (notamment des culots plaquettaires) peuvent également être des sources de variations. Une étude longitudinale mieux contrôlée pour ces différents facteurs de variations potentiels serait requise. En outre, une étude longitudinale chez des témoins permettrait d'estimer la stabilité attendue des paramètres considérés en-dehors d'une situation pathologique.

Ces éléments d'étude longitudinale, même s'il ne s'agit que de données préliminaires, suggèrent que les altérations de la synthèse de la mélatonine pourraient ne pas être un marqueur de trait (reflétant la vulnérabilité à la pathologie) mais un marqueur d'état (associé à une phase donnée de la pathologie). Dans le cas des TSA, les troubles cliniques sont constants dans le temps (contrairement à d'autres pathologies psychiatriques caractérisées par des fluctuations et des rémissions), mais des comorbidités, traitements ou états qui restent à définir pourraient influencer les altérations biochimiques. Une autre hypothèse est que la variabilité elle-même (indépendamment de la nature des variations) est un trait pathologique, qui révèle des anomalies des mécanismes de régulation assurant normalement le contrôle de ces paramètres.

4.2. Discussion : notion d'endophénotype. Anomalies causales vs secondaires.

La notion d'endophénotype a initialement été développée pour identifier de nouveaux facteurs génétiques impliqués dans les pathologies complexes par l'étude des relations

gène-endophénotype-pathologie. Dans cette acception, un endophénotype au sens strict est donc un élément d'une relation causale linéaire reliant des facteurs génétiques à une situation pathologique (cf. introduction, section 2.5). Pour évaluer l'adéquation des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine documentées dans les TSA avec ce concept, on peut passer en revue les critères proposés par Cannon et Keller (2006) pour définir un endophénotype optimal.

1. Un endophénotype devrait être héritable.

La notion de déterminisme génétique est sous-jacente à ce critère. L'héritabilité estimée sur la base d'études de trios pour les différents paramètres de la voie sérotonine-mélatonine explorés au niveau sanguin est globalement médiocre, à l'exception de la NAS plaquettaire, qui semble la plus fortement héritable. Nos données indiquent qu'un effet parental intervient dans le déterminisme des activités AANAT et ASMT plaquettaires. La sérotoninémie est associée à une faible héritabilité chez les patients avec TSA, plus faible que celle observée pour les frères et sœurs non atteints. Ces résultats suggèrent que des facteurs non génétiques – ou du moins non hérités –, qui s'additionnent aux facteurs génétiques, interviennent dans le déterminisme de plusieurs paramètres de la voie sérotonine-mélatonine.

2. Un endophénotype devrait être associé aux causes de la pathologie, et non être une conséquence de la pathologie.

En l'absence d'élucidation des mécanismes des altérations biochimiques, le rôle causal de ces anomalies est difficile à établir. Les connaissances concernant la physiopathologie des TSA produisent un faisceau d'arguments convaincants pour l'implication d'anomalies de la sérotonine et/ou de la mélatonine dans différents aspects de la pathologie, sur la base de leur rôle physiologique dans le développement et le fonctionnement du cerveau, le sommeil, les fonctions digestives et immunitaires... mais ces hypothèses ne sont que spéculatives (cf introduction, section 3.4).

Les modèles animaux fournissent classiquement des arguments de validation d'une atteinte étiologique (validité d'aspect). Des modèles d'hypersérotoninémie génétique ou toxique ont été développés, qui sont en faveur d'un effet délétère de l'hypersérotoninémie. Parmi ceux-ci, on peut citer un modèle murin récemment développé de gain-de-fonction génétique du transporteur de la sérotonine (Veenstra-VanderWeele et al., 2012). Ces souris présentent une hypersérotoninémie et des atteintes comportementales qui récapitulent les symptômes de la triade autistique

(altérations des interactions sociales et des vocalisations, comportements stéréotypés). Quant aux anomalies de la mélatonine, la majorité des souches murines de laboratoires sont génétiquement déficientes pour la synthèse de mélatonine et constituent donc des modèles spontanés de déficit en mélatonine – ce qui suggère que le déficit en mélatonine n'a pas d'effet délétère drastique.

À l'échelle familiale, notre étude a indiqué que les altérations de la voie sérotonine-mélatonine ségrègent imparfaitement avec les TSA dans les familles multiplexes, ce qui est peu en faveur d'un rôle causal de ces altérations, mais n'exclut pas un caractère de facteur de risque.

Globalement, l'état actuel des connaissances ne permet pas d'affirmer le rôle causal des altérations de la voie sérotonine-mélatonine dans les TSA. L'élucidation des mécanismes de ces altérations, et les progrès des connaissances sur la physiopathologie des TSA devrait permettre d'élucider ce point.

3. Plusieurs endophénotypes devraient être impliqués dans une pathologie complexe.

La notion d'étiologie multifactorielle est sous-jacente à ce critère. Les altérations de la voie sérotonine-mélatonine sont fréquentes dans les TSA mais ne sont néanmoins pas retrouvées chez tous les patients. Elles s'additionnent aux autres endophénotypes biochimiques exposés en introduction (section 2.5) En outre, les mécanismes biochimiques que nous avons élucidés au cours de cette étude suggèrent que l'hypersérotoninémie et les altérations de la synthèse de la mélatonine constituent en réalité deux endophénotypes indépendants des TSA.

4. Un endophénotype devrait avoir une distribution continue dans la population générale.

La notion de spectre et de continuum entre le normal et le pathologique est sous-jacente à ce critère. Les traits étudiés dans cette étude sont des traits quantitatifs, et les distributions observées chez les patients et chez les témoins sont partiellement chevauchantes. Par ailleurs, la sécrétion de mélatonine est connue pour être hautement variable dans la population générale, et les sujets présentant des déficits en mélatonine ne sont pas rares (Burgess et Fogg, 2008).

5. Un endophénotype devrait idéalement être mesurable à plusieurs niveaux d'analyses (ou associé à d'autres endophénotypes à d'autres niveaux).

Plusieurs corrélats cliniques des anomalies de la mélatonine ont pu être mis en évidence dans notre étude, qui pourraient constituer des symptômes-candidats ou endophénotypes cliniques associés aux endophénotypes biochimiques. Parmi ceux-ci, les troubles du sommeil apparaissent comme des candidats potentiellement convaincants, dans la mesure où la mélatonine est impliquée dans la physiologie des rythmes circadiens. Une étude plus détaillée des troubles du sommeil et anomalies circadiennes et de leurs associations avec les anomalies de la mélatonine serait requise pour mieux documenter ces relations. Par ailleurs, d'autres endophénotypes biochimiques pourraient être associés aux anomalies de la mélatonine, par exemple l'augmentation du stress oxydant, qui pourrait être en lien avec les propriétés antioxydantes de la mélatonine.

6. Des endophénotypes qui affectent plusieurs pathologies devraient être identifiés pour des pathologies génétiquement liées.

La notion de pléiotropie nosographique est sous-jacente à ce critère. Des anomalies de la mélatonine ont en effet été décrites dans des pathologies neuropsychiatriques connexes des TSA, comme évoqué plus haut (section 3.6). Ces anomalies semblent donc constituer un endophénotype transnosographique.

Les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine remplissent donc partiellement les critères définissant un endophénotype optimal. Il est peu probable qu'elles s'intègrent dans la relation directe gène-endophénotype-pathologie qui constitue le modèle de travail des endophénotypes. En particulier, leur caractère causal ou secondaire est un point crucial qui reste à élucider. Toutefois, les effets délétères de ces altérations sont susceptibles de s'exercer quelle qu'en soit la cause, et ces endophénotypes restent à ce titre informatifs quant aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans les TSA et d'autres troubles neuropsychiatriques. La fréquence élevée de ces anomalies, particulièrement frappante dans le contexte d'hétérogénéité clinique et génétique qui caractérise les TSA, suggère qu'elles s'inscrivent dans des processus physiopathologiques majeurs pour ces pathologies. En outre, ces altérations constituent dans tous les cas une cible thérapeutique – qu'il s'agisse d'un traitement étiologique ou d'un traitement symptomatique – comme le montrent les résultats encourageants obtenus avec les thérapies mélatoninergiques.

4.3. Altérations biochimiques additionnelles dans les glandes pinéales de patients avec TSA

Deux niveaux d'atteinte biochimique de la voie de synthèse de la mélatonine – l'enzyme AANAT et l'enzyme ASMT – ont été identifiés chez les patients avec TSA, tant dans les plaquettes sanguines que dans le tractus gastro-intestinal et les glandes pinéales. La combinaison de ces deux atteintes chez de nombreux patients suggère un dysfonctionnement global de la voie de synthèse de la mélatonine dans les TSA. L'absence d'identification, dans la majorité des cas, d'anomalies monogéniques dans les gènes *AANAT* et *ASMT* susceptibles d'expliquer les anomalies biochimiques observées, renforce cette hypothèse. D'autres protéines de la glande pinéale ont donc été explorées pour estimer l'étendue du dysfonctionnement.

4.3.1. Anomalie d'une protéine de signalisation intracellulaire, la protéine 14-3-3

Dans la glande pinéale, la protéine AANAT phosphorylée forme des complexes avec la protéine chaperonne 14-3-3, qui la protège de la dégradation par le protéasome. Chez l'homme, où la régulation de la synthèse de la mélatonine semble principalement post-traductionnelle, ces complexes impliquent également la protéine ASMT, et ont été proposés comme un mécanisme de régulation (cf annexe 5 : Maronde et al, 2011). Les anomalies de synthèse de la mélatonine observées chez les patients avec TSA pourraient donc être liées à des anomalies de la formation de ces complexes multiprotéiques.

4.3.1.1. Méthode : dosage de la protéine 14-3-3.

La protéine 14-3-3 a été dosée dans les échantillons de glandes pinéales de patients et de témoins par ELISA. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires. Les dosages ont été réalisés dans le service de Biochimie de l'Hôpital Lariboisière (Jean-Marie Launay).

4.3.1.2. Réduction de la protéine 14-3-3 dans les glandes pinéales de patients avec TSA.

Les taux de protéine 14-3-3 apparaissent diminués dans les glandes pinéales des patients avec TSA par rapport aux échantillons témoins (figure 4.1). En terme de variations circadiennes, le taux de protéine 14-3-3 semble légèrement plus élevé chez les sujets témoins décédés le soir où la nuit, mais cette variation n'est pas significative (test de Wilcoxon : $p=0,15$), contrairement aux variations circadiennes des activités des enzymes AANAT et ASMT (cf figure 2.4). Ces données sont en faveur d'une

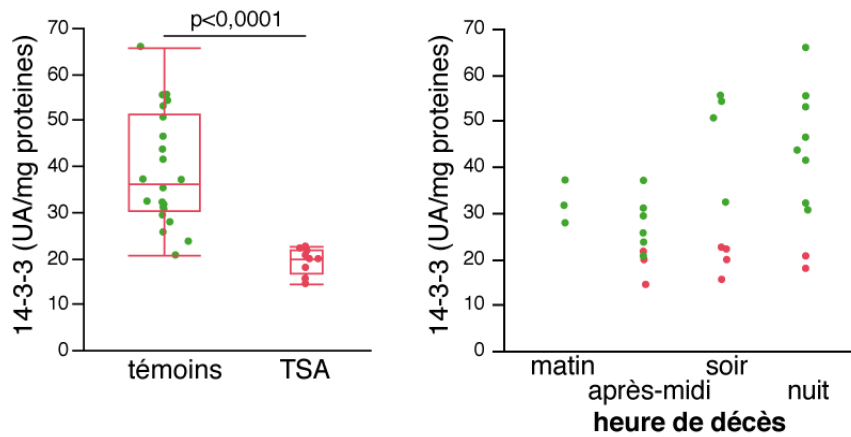


Figure 4.1. dosage de la protéine 14-3-3 dans les échantillons de glandes pinéales. Le groupe témoin a été comparé aux patients par le test de Wilcoxon à deux échantillons.

perturbation des complexes multiprotéiques phospho-AANAT/ASMT/14-3-3 dans la glande pinéale des patients avec TSA.

Une limitation de cette étude est l'absence de spécificité d'isoforme du dosage : il existe 7 isoformes de protéine 14-3-3, codées par des gènes différents. Chez le rat, les complexes AANAT/14-3-3 impliquent les isoformes 14-3-3 ϵ et ζ (Obsil et al., 2001).

4.3.2. Anomalie d'une enzyme de remodelage de la matrice extracellulaire, l'héparane sulfate sulfotransférase

Les principaux éléments des complexes multiprotéiques directement impliqués dans la synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale humaine semblent donc altérés chez les patients avec TSA. Pour déterminer si les altérations sont spécifiques de ces complexes ou relèvent d'une perturbation plus globale de la physiologie de la glande pinéale, nous avons investigué une protéine exprimée dans la glande pinéale, mais non impliquée directement dans la synthèse de la mélatonine. L'expression de l'héparane sulfate sulfotransférase de type HS3ST2 (ou 3OST2) dans la glande pinéale de rat suit un rythme nyctéméral inverse de celui de la mélatonine mais ne semble pas réguler directement la synthèse de la mélatonine (Borjigin et al., 2003). Les héparane sulfate sulfotransférases interviennent dans le remodelage des protéoglycanes de la matrice extracellulaire.

4.3.2.1. Méthode : dosage de l'activité héparane sulfate sulfotransférase

L'activité héparane sulfate sulfotransférase a été déterminée dans les échantillons de glandes pinéales et d'iléons par radioenzymologie, en utilisant comme co-substrat du

³⁵S-PAPS (3'-phospho-adénosine 5'-phospho-sulfate). Les dosages ont été réalisés dans le service de Biochimie de l'Hôpital Lariboisière (Jean-Marie Launay).

4.3.2.3. Réduction de l'activité héparane sulfate sulfotransférase dans les tissus des patients avec TSA.

L'activité héparane sulfate sulfotransférase dans la glande pinéale apparaît effondrée chez les patients avec TSA (figure 4.2.a). Chez les témoins, l'activité plus élevée observée chez les sujets décédés le matin peut être interprétée en termes de variations circadiennes comme un rythme diurne, conformément aux observations rapportées chez le rat.

Dans les échantillons d'iléons, l'activité héparane sulfate sulfotransférase est également significativement réduite chez les patients, bien que l'effet soit moins drastique que dans les glandes pinéales (figure 4.2.b).

Comme pour la protéine 14-3-3, cette étude est limitée par l'absence de spécificité d'isoforme de l'activité héparane sulfate sulfotransférase dosée. Le gène décrit comme

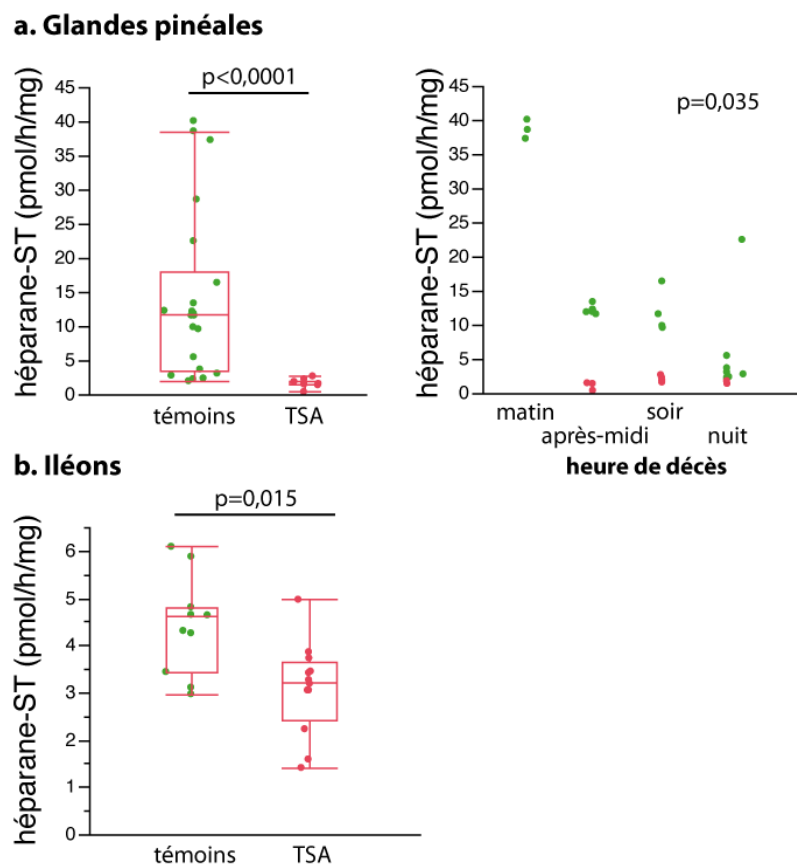


Figure 4.2. Dosage de l'activité héparane sulfate sulfotransférase dans les échantillons de glandes pinéales (a) et d'iléons (b). Les groupes ont été comparés par le test de Wilcoxon.

ayant un rythme d'expression diurne dans la glande pinéale de rat est le gène *HS3ST2* (Borjigin et al., 2003), mais d'autres formes d'héparane sulfate sulfotransférase ont pu être dosées simultanément.

4.4. Discussion : une perturbation globale de la physiologie de la glande pinéale ? Relations avec des altérations neurobiologiques.

Nos résultats révèlent des altérations biochimiques multiples dans la glande pinéale des patients avec TSA. Celles-ci affectent en premier lieu le complexe multiprotéique directement impliqué dans la synthèse de la mélatonine : au moins trois éléments de ce complexe, les enzymes AANAT et ASMT ainsi que la protéine chaperonne 14-3-3, apparaissent affectées. L'étude de l'antigène S, autre composant de ce complexe, ainsi que de la localisation subcellulaire, qui pourrait également constituer un mécanisme de régulation de la synthèse de la mélatonine, seront nécessaire pour mieux documenter ces altérations (cf annexe 5 : Maronde et al, 2011).

Les mécanismes responsables de l'altération de ce complexe ne sont pas élucidés ; il est possible qu'une anomalie quantitative ou qualitative de l'un des composants entraîne une déstabilisation de l'ensemble de la structure et une dégradation des autres composants. Il est également possible que cette altération résulte d'un dysfonctionnement plus global. Certaines activités enzymatiques apparaissent préservées dans les glandes pinéales de patients avec TSA, comme les activités TPH et AADC (cf figure 2.4). Toutefois, l'atteinte d'autres protéines totalement extérieures non impliquées directement dans la synthèse de la mélatonine, les héparane sulfate sulfotransférases, suggèrent un dysfonctionnement global de la glande pinéale chez les patients avec TSA. L'étude plus exhaustive des glandes pinéales par des approches de protéomique permettrait de déterminer l'étendue de ce dysfonctionnement et de caractériser les différents processus affectés.

Ces explorations complémentaires dans les glandes pinéales de patients avec TSA révèlent donc deux nouveaux niveaux d'altérations : une protéine chaperonne intracellulaire, la protéine 14-3-3, et des enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire, les héparane sulfate sulfotransférases. Ces éléments sont susceptibles de constituer un lien avec les anomalies neurobiologiques impliquées dans la physiopathologie des TSA.

Ainsi, les protéines 14-3-3 interviennent dans de nombreux processus de signalisation régulant notamment le cycle cellulaire, la prolifération, la migration et la différenciation, par leurs multiples interactions basées sur la reconnaissance de motifs contenant une phosphosérine ou une phosphothréonine. L'isoforme ζ , qui se lie à la protéine AANAT phosphorylée dans la glande pinéale, est largement exprimée dans la matière grise cérébrale ; elle interagit notamment avec la β -caténine (Tian, 2006) – la voie β -caténine ayant été proposée comme voie impliquée dans les TSA sur la base des récents résultats d'exome (O'Roak et al., 2012), et avec la protéine d'échafaudage DISC1 (Cheah et al., 2012), codée par un gène candidat impliqué dans la schizophrénie (Claes et al., 2012). Les souris déficientes pour la protéine 14-3-3 ζ présentent des anomalies neurodéveloppementales (anomalies de la migration neuronale et de la formation des synapses glutamatergiques), comportementales (hyperactivité, anomalies sensorimotrices) et cognitives (déficits mnésiques et d'apprentissage). L'isoforme ϵ , qui interagit également avec la protéine AANAT phosphorylée, est aussi un partenaire de DISC1 (Taya et al., 2007), et les complexes résultant de cette interaction régulent l'élongation axonale. Les souris déficientes pour la protéine 14-3-3 ϵ présentent des anomalies de la migration neuronale (Toyo-oka et al., 2003). Enfin, ces deux isoformes interviennent dans la signalisation du récepteur de l'insuline (Ogihara et al., 1997). Une altération de la protéine 14-3-3 ζ ou ϵ pourrait donc avoir des conséquences multiples, incluant des altérations neurodéveloppementales et des anomalies de la synthèse de la mélatonine.

L'altération des activités héparane sulfatase retrouvée dans la glande pinéale et le tractus gastro-intestinal révèle une atteinte de la matrice extracellulaire, également susceptible d'avoir de multiples conséquences. En effet, outre leur rôle de structure dans les phénomènes d'adhérence cellulaire, les protéoglycanes interviennent comme co-récepteurs dans de nombreux processus de signalisation, incluant des régulations des processus d'adhérence, de différenciation, de prolifération et de morphogénèse cellulaires (Bishop et al., 2007). Au niveau du système nerveux central, les protéoglycanes régulent la plasticité neuronale et le guidage axonal (Inatani et al., 2003), notamment par leurs interactions avec des signaux de guidage dont la sémaphorine 5A (Kantor et al., 2004), codée par un gène candidat impliqué dans les TSA, ou encore par inhibition de TrkB, récepteur canonique du BDNF, par déphosphorylation (Kurihara et Yamashita, 2012). La déplétion conditionnelle en

héparane sulfates chez les souris adultes est associée à une diminution de la transmission synaptique glutamatergique et à un phénotype comportemental qui récapitule les symptômes de la triade autistique (altérations des interactions sociales et des vocalisations, comportements stéréotypés) (Irie et al., 2012). Chez l'homme, les anomalies majeures de synthèse des héparane sulfates sont à l'origine d'exostoses multiples (tumeurs osseuses bénignes) ; des cas associés à un autisme ont été rapportés (Ishikawa-Brush et al., 1997, Li et al., 2002). L'effet d'altérations plus subtiles du remodelage des protéoglycanes ne sont pas documentés. On peut supposer qu'une anomalie de l'enzyme HS3ST2, dont l'expression est principalement cérébrale et qui catalyse la formation de structures 3-O-sulfoconjuguées quantitativement minoritaires, pourrait constituer un facteur de risque d'anomalies neurodéveloppementales.

Ainsi, les altérations de la protéine 14-3-3 et de l'activité héparane sulfate sulfotransférase mises en évidence dans les glandes pinéales de patients avec TSA révèlent des anomalies susceptibles d'avoir un impact majeur sur le développement et le fonctionnement cérébral. On ne peut exclure que de telles anomalies aient un rôle causal à la fois dans les atteintes neurodéveloppementales et dans les altérations de la synthèse de la mélatonine. L'exploration de la protéine 14-3-3 et du métabolisme des protéoglycanes dans des échantillons de cerveau post mortem de patients avec TSA serait requise pour préciser l'étendue de ces anomalies au-delà de la glande pinéale.

4.5. Discussion : des atteintes multiples du métabolisme ? Relations avec les autres endophénotypes biochimiques des TSA.

Envisagée sous l'angle biochimique, notre étude met en évidence des déficits d'activité de plusieurs enzymes chez les patients avec TSA, parmi lesquelles deux méthyltransférases, ASMT et COMT, deux familles de sulfotransférases, PST et héparane sulfate sulfotransférases, et une acétyltransférase, AANAT. Cette multiplicité d'atteintes, touchant des enzymes impliquées dans des processus physiologiques différents mais de fonctions biochimiques homologues, peut faire envisager des mécanismes communs. Le point commun entre différentes enzymes de fonction homologue réside dans les co-substrats : la S-adénosylméthionine (SAM), donneur de groupement méthyl des méthyltransférases, la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS), donneur de groupement sulfate des sulfotransférases, et l'acétylcoenzyme A, donneur de groupement acétyl des acétyltransférases. Lors des mesures d'activité

enzymatique *in vitro*, les substrats et co-substrats sont ajoutés en excès au milieu réactionnel, et la mesure d'activité enzymatique est donc théoriquement indépendante de leur concentration *in vivo*. Toutefois, certaines enzymes interagissent étroitement avec leur co-substrat : c'est le cas par exemple de l'enzyme ASMT, qui n'a pu être purifiée et cristallisée que sous sa forme liée à la SAM (cf section 3.3). On peut imaginer qu'un déficit de co-substrat *in vivo* ait pour conséquence une déstabilisation de l'enzyme.

Plusieurs éléments en faveur d'anomalies du métabolisme des monocarbones ont été rapportés dans les TSA. La SAM est produite au cours du cycle de la transméthylation à partir de l'homocystéine, convertie en méthionine par la méthionine synthase, enzyme dépendante de la vitamine B12, elle-même issue du métabolisme des folates. Une diminution de la méthionine et de la SAM plasmatiques, ainsi qu'une augmentation de la S-adénosylhomocystéine (SAH) et une diminution du ratio SAM/SAH, ont été rapportées dans une étude portant sur 80 patients avec TSA (James et al., 2006) ainsi que chez les parents, en particulier les mères (James et al., 2008). Les mécanismes des anomalies du métabolisme des monocarbones sont encore à élucider. Une carence systémique majeure en folates est très peu probable dans les TSA, dans la mesure où une telle carence est associée de manière prépondérante à des signes hématologiques (anémie mégalo-blastique) qui ne sont pas observés chez ces patients. En revanche, une prévalence élevée d'autoanticorps dirigés contre le récepteur des folates, qui assure le transport par endocytose à travers la barrière hémato-encéphalique, a été rapportée chez les patients avec TSA et leurs parents (Frye et al., 2012, Ramaekers et al., 2012) ; ces anomalies immunologiques pourraient altérer le métabolisme des monocarbones au niveau central. L'enzyme MTHFR, qui intervient dans le cycle des folates, constitue également un candidat possible : des polymorphismes du gène *MTHFR* ont été significativement associés aux TSA dans plusieurs études indépendantes (cf. méta-analyse de Frustaci et al., 2012), et à la schizophrénie dans une méta-analyse portant sur 1200 patients (Allen et al., 2008), et sont associés par ailleurs à une élévation de l'homocystéinémie (Muntjewerff et al., 2006). En outre, l'enzyme MTHFR intervient dans la formation à partir de la sérotonine de β -carboline, composés neuroactifs liant les récepteurs GABA_A (cf. annexe 1 : Manivet *et al*, 2012). L'exploration biochimique de l'enzyme MTHFR serait intéressante pour déterminer son rôle éventuel dans les anomalies du métabolisme des monocarbones associées aux TSA. Une étude

épidémiologique rapporte que la supplémentation vitaminique périconceptionnelle serait un facteur protecteur contre le risque de TSA, et rapporte des interactions significatives avec le génotype maternel pour le gène *MTHFR* et avec le génotype de l'enfant pour le gène *COMT* (Schmidt et al., 2011).

À l'instar de la SAM et du métabolisme des monocarbones, une investigation des co-substrats des autres enzymes altérées dans les TSA, notamment le PAPS, permettrait de tester l'hypothèse d'anomalies métaboliques systémiques. Les conséquences prévisibles d'altérations des processus de méthylation, d'acétylation et de sulfoconjugaison sont multiples. Outre les composés du métabolisme secondaire comme ceux évoqués dans cette étude, la méthylation concerne l'ADN et les histones, ou encore des molécules de structure comme les phospholipides. L'acétylation concerne le métabolisme énergétique, ainsi que les histones (ce qui pourrait être en lien avec la localisation nucléaire d'AANAT mise en évidence par l'étude de Maronde *et al.* (2011) (cf. annexe 5). La sulfoconjugaison concerne le catabolisme de nombreux composés endogènes et exogènes, ainsi que des molécules de structure (protéoglycanes, glycolipides). Des anomalies de ces métabolismes pourraient donc avoir des effets extrêmement pléiotropes.

4.6. Discussion : Modèles d'interactions entre les altérations de la voie sérotonine-mélatonine et les altérations neurobiologiques des TSA.

Ces éléments de discussion concernant les mécanismes et la causalité des altérations de la voie sérotonine-mélatonine dans les TSA peuvent être remis en perspective avec les différents modèles de relations gène-endophénotype-pathologie évoqués en introduction (section 2, figure 5). Envisagés sous l'angle des relations entre les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine et les anomalies neurobiologiques considérées comme le cœur de la physiopathologie des TSA, trois grands modèles émergent, schématisés par la figure 4.3 :

- Le modèle de travail initial est un modèle multifactoriel, selon lequel les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine s'additionnent de manière indépendante à d'autres atteintes génétiques affectant directement le développement et le fonctionnement neuronal. Ce modèle s'applique probablement dans les cas des patients présentant des variants rares dans les gènes *AANAT* ou *ASMT*. Dans les autres cas, un déterminisme non génétique

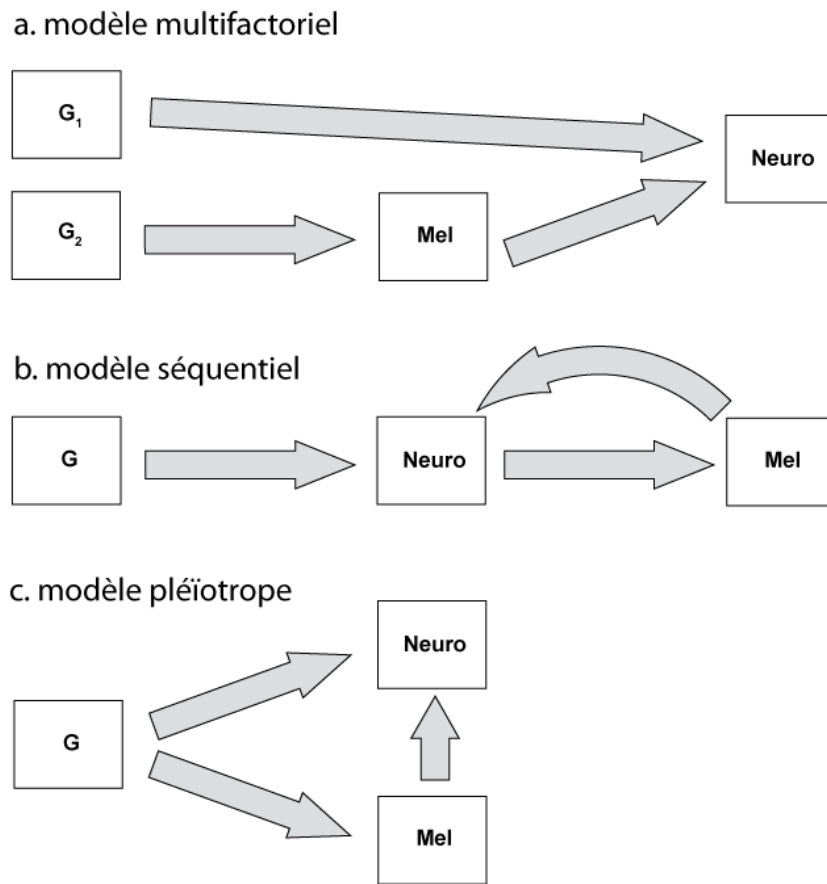


Figure 4.3. Modèles schématiques d'interactions entre les altérations de la voie sérotonine-mélatonine et les altérations neurobiologiques considérées comme le cœur de la physiopathologie des TSA. « G » désigne la cause des altérations, considérée comme génétique par simplification, mais qui peut être d'une autre nature. « Mel » désigne les altérations de la voie sérotonine-mélatonine. « Neuro » désigne les altérations neurobiologiques.

(par exemple, un mécanisme immunologique) et probablement hétérogène serait à envisager. Le développement de modèles animaux combinant plusieurs anomalies génétiques, tels que le modèle murin de Page et al. (2009) combinant des mutations hétérozygotes du gène *Pten* et du gène du transporteur de la sérotonine, permettra de documenter ces effets additifs ou synergiques.

- Un modèle séquentiel peut être envisagé, selon lequel les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine seraient secondaires à des altérations affectant directement des processus neurodéveloppementaux. La prévalence élevée des anomalies de la mélatonine et des rythmes circadiens dans différentes pathologies neuropsychiatriques, cliniquement et étiologiquement hétérogènes, pourrait alors s'interpréter par une sensibilité particulière de ces processus physiologiques aux atteintes du fonctionnement et des réseaux neuronaux. Selon

cette hypothèse, diverses atteintes neurodéveloppementales pourraient engendrer une perturbation des rythmes circadiens et de la mélatonine, processus peu robustes. En retour, ces perturbations seraient susceptibles d'aggraver les anomalies neurodéveloppementales. L'exploration des endophénotypes chez des patients bien caractérisés sur le plan génétique, ainsi que l'exploration systématique des rythmes circadiens dans les modèles animaux d'atteinte génétique du développement neuronal permettront de confirmer cette hypothèse. Les modèles de souris invalidées pour les gènes *Pten* ou *Mecp2* sont documentés pour cet aspect et présentent des anomalies circadiennes (Ey et al., 2011). Un raisonnement similaire peut s'appliquer pour les altérations sérotoninergiques, et les souris porteuses d'une duplication du locus orthologue au locus 15q11-q13 humain (dont les principaux gènes candidats sont les gènes *Ube3a* et trois sous-unités des récepteurs GABA) présentent une réduction des taux de sérotonine cérébrale (Tamada et al., 2010). Toutefois, les auteurs attribuent ce trait à l'atteinte d'un snoRNA ciblant le récepteur 5HT_{2C}, ce qui rejoint plutôt le modèle additif.

- Enfin, nos données suggèrent qu'un modèle pléiotrope pourrait être en cause, selon lequel une même atteinte initiale pourrait avoir des conséquences multiples et engendrer, d'une part, des anomalies neurobiologiques, et d'autre part, des altérations de la voie sérotonine-mélatonine (qui peuvent par ailleurs aggraver les anomalies neurobiologiques). C'est la situation qui peut être prédite en cas d'atteinte d'une protéine 14-3-3, ou du métabolisme des héparane sulfates, ou encore en cas d'atteinte métabolique systémique. Si de telles atteintes sont plausibles d'après nos données, elles restent à documenter plus extensivement chez les patients avec TSA.

Ces trois modèles sont schématiques et non exclusifs. Il est probable que l'hétérogénéité qui caractérise les TSA intervienne également sur ces aspects. Le développement et la caractérisation de modèles animaux de plus en plus sophistiqués, ainsi que l'exploration multidimensionnelle des patients, combinant la génétique et les endophénotypes, permettront de mieux comprendre les interactions entre les anomalies neurobiologiques et les atteintes de la voie sérotonine-mélatonine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'hypersérotoninémie et le déficit en mélatonine ont été décrits comme des endophénotypes des TSA. Ces observations en font des candidats potentiellement impliqués dans la physiopathologie des TSA, de même que leurs différents rôles physiologiques, en particulier l'implication de la sérotonine dans le développement du système nerveux central et ses fonctions de neuromodulateur, l'implication de la mélatonine dans la régulation des rythmes circadiens et ses propriétés anti-oxydantes.

Nos travaux combinent les trois grandes approches utilisables chez l'homme pour investiguer la physiopathologie des maladies complexes – étude d'endophénotypes, étude de tissus post mortem et génétique, appliquées à l'exploration des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine dans les TSA.

L'exploration de la voie sérotonine-mélatonine au niveau sanguin dans la plus grande cohorte de patients avec TSA investiguée à ce jour pour ces anomalies biochimiques permet d'estimer la fréquence de l'hypersérotoninémie à 45% des patients avec TSA, et la fréquence du déficit en mélatonine à 60% environ – le déficit en mélatonine est également retrouvé chez les apparentés au premier degré.

L'étude du métabolisme de la sérotonine et des catécholamines met en évidence des anomalies affectant plusieurs voies cataboliques (MAO, PST et COMT), qui pourraient constituer le mécanisme biochimique de l'hypersérotoninémie et de l'augmentation de la noradrénaline associées aux TSA. Ces résultats peuvent constituer un point de départ pour des explorations biochimiques plus approfondies (spécificités de substrat des anomalies identifiées, étude des cosubstrats) et pour l'élucidation des mécanismes moléculaires de ces altérations.

L'étude de la synthèse de la mélatonine met en évidence une réduction de l'activité des deux enzymes impliquées dans la synthèse, AANAT et ASMT, retrouvée en périphérie (sang, tractus gastro-intestinal) ainsi que dans les glandes pinéales de patients, associées au déficit en mélatonine observé chez les patients avec TSA, et possiblement à une augmentation de la NAS, métabolite intermédiaire qui possède une activité biologique propre.

Les mécanismes des anomalies de synthèse de la mélatonine restent à élucider. Les variants rares des gènes *AANAT* et *ASMT* semblent avoir une contribution mineure. Les polymorphismes du promoteur du gène *ASMT* peuvent expliquer une partie de la variabilité. Des anomalies transcriptionnelles pourraient intervenir en périphérie mais ne

semblent pas avoir d'impact majeur dans la glande pinéale. Nos explorations complémentaires suggèrent de possibles atteintes des régulations post-traductionnelles de la synthèse de la mélatonine. Une étude plus exhaustive des glandes pinéales de patients (histologie, étude des interactions protéine-protéine, protéomique) permettrait de mieux documenter ces régulations et l'étendue des atteintes. Le caractère primaire ou secondaire de ces anomalies reste à déterminer : il peut s'agir de facteurs de risques indépendants, mais également d'atteintes secondaires à des anomalies neurodéveloppementales et/ou métaboliques. L'étude de ces traits biochimiques dans les modèles animaux d'anomalies neurodéveloppementales impliquées dans les TSA ainsi que le développement de modèles animaux récapitulant des atteintes multiples permettraient de mieux documenter les relations entre ces deux niveaux d'atteintes – même si les limites des modèles murins pour l'étude de la mélatonine constituent un obstacle à cette approche. Chez l'homme, des études intégrées de différents endophénotypes (en particulier des endophénotypes neurochimiques et métaboliques) seraient requises pour mieux comprendre les relations entre ces différentes altérations. Enfin, on peut s'attendre à ce que les progrès des connaissances concernant la génétique des TSA aboutisse à terme une nouvelle classification étiologique de ces pathologies. Des études intégrées combinant des approches biochimiques et génétiques permettront de déterminer la place des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine dans la physiopathologie des TSA.

Des corrélats cliniques des anomalies de la voie sérotonine-mélatonine ont pu être identifiés, parmi lesquels une association entre les anomalies de la synthèse de la mélatonine et les troubles du sommeil associés aux TSA. Une étude plus fine du sommeil et des rythmes circadiens chez les patients serait requise pour mieux documenter cette association. Des anomalies de la mélatonine, des rythmes circadiens et des rythmes veille-sommeil ont également été rapportées dans d'autres pathologies neuropsychiatriques, et semblent constituer des endophénotypes transnosographiques.

Enfin, les anomalies de la voie sérotonine-mélatonine constituent des cibles thérapeutiques. En particulier, les premiers résultats encourageants obtenus avec la mélatonine suggèrent qu'elle constitue un traitement bien toléré qui améliore les troubles du sommeil associés aux TSA, et possiblement certains symptômes comportementaux. Des essais thérapeutiques contrôlés à plus grande échelle seront requis pour confirmer cette efficacité.

REFERENCES

- 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467, 1061-73.
- ABRAMSON, R. K., WRIGHT, H. H., CARPENTER, R., BRENNAN, W., LUMPUY, O., COLE, E. & YOUNG, S. R. 1989. Elevated blood serotonin in autistic probands and their first-degree relatives. *J Autism Dev Disord*, 19, 397-407.
- ACKERMANN, K., BUX, R., RUB, U., KORF, H. W., KAUERT, G. & STEHLE, J. H. 2006. Characterization of human melatonin synthesis using autoptic pineal tissue. *Endocrinology*, 147, 3235-42.
- ALBERTI, A., PIRRONE, P., ELIA, M., WARING, R. H. & ROMANO, C. 1999. Sulphation deficit in "low-functioning" autistic children: a pilot study. *Biol Psychiatry*, 46, 420-4.
- ALLEN, N. C., BAGADE, S., MCQUEEN, M. B., IOANNIDIS, J. P., KAVVOURA, F. K., KHOURY, M. J., TANZI, R. E. & BERTRAM, L. 2008. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet*, 40, 827-34.
- AMEIS, S. H. & SZATMARI, P. 2012. Imaging-genetics in autism spectrum disorder: advances, translational impact, and future directions. *Front Psychiatry*, 3, 46.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR)*.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 2012. *DSM-5 Development* [Online]. Available: www.dsm5.org [Accessed].
- AMIET, C., GOURFINKEL-AN, I., BOUZAMONDO, A., TORDJMAN, S., BAULAC, M., LECHAT, P., MOTTRON, L. & COHEN, D. 2008. Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis. *Biol Psychiatry*, 64, 577-82.
- ANDARI, E., DUHAMEL, J. R., ZALLA, T., HERBRECHT, E., LEBOYER, M. & SIRIGU, A. 2010. Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4389-94.
- ANNEY, R., KLEI, L., PINTO, D., REGAN, R., CONROY, J., MAGALHAES, T. R., CORREIA, C., ABRAHAMS, B. S., SYKES, N., PAGNAMENTA, A. T., ALMEIDA, J., BACCHELLI, E., BAILEY, A. J., BAIRD, G., BATTAGLIA, et al. 2010. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet*, 19, 4072-82.
- ASHWOOD, P., KRAKOWIAK, P., HERTZ-PICCIOTTO, I., HANSEN, R., PESSAH, I. & VAN DE WATER, J. 2011. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*, 25, 40-5.
- ASPERGER, H. 1944. Die „Autistischen Psychopathen“ im Kindesalter. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 117, 132-135.
- AUERBACH, B. D., OSTERWEIL, E. K. & BEAR, M. F. 2011. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, 480, 63-8.
- AZMITIA, E. C., SINGH, J. S., HOU, X. P. & WEGIEL, J. 2011a. Dystrophic serotonin axons in postmortem brains from young autism patients. *Anat Rec (Hoboken)*, 294, 1653-62.
- AZMITIA, E. C., SINGH, J. S. & WHITAKER-AZMITIA, P. M. 2011b. Increased serotonin axons (immunoreactive to 5-HT transporter) in postmortem brains from young autism donors. *Neuropharmacology*, 60, 1347-54.
- BAGDY, G., KECSKEMETI, V., RIBA, P. & JAKUS, R. 2007. Serotonin and epilepsy. *J Neurochem*, 100, 857-73.
- BAILEY, A., PALFERMAN, S., HEAVEY, L. & LE COUTEUR, A. 1998. Autism: the phenotype in relatives. *J Autism Dev Disord*, 28, 369-92.
- BAIRD, G., SIMONOFF, E., PICKLES, A., CHANDLER, S., LOUCAS, T., MELDRUM, D. & CHARMAN, T. 2006. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population

- cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Lancet*, 368, 210-5.
- BARON-COHEN, S., ASHWIN, E., ASHWIN, C., TAVASSOLI, T. & CHAKRABARTI, B. 2009. Talent in autism: hyper-systemizing, hyper-attention to detail and sensory hypersensitivity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 1377-83.
- BARON-COHEN, S., WHEELWRIGHT, S., SKINNER, R., MARTIN, J. & CLUBLEY, E. 2001. The autism-spectrum quotient (AQ): evidence from Asperger syndrome/high-functioning autism, males and females, scientists and mathematicians. *J Autism Dev Disord*, 31, 5-17.
- BARTHOLOMEUSZ, H. H., COURCHESNE, E. & KARNS, C. M. 2002. Relationship between head circumference and brain volume in healthy normal toddlers, children, and adults. *Neuropediatrics*, 33, 239-41.
- BERLIN, I., SAID, S., SPREUX-VAROUAUX, O., OLIVARES, R., LAUNAY, J. M. & PUECH, A. J. 1995. Monoamine oxidase A and B activities in heavy smokers. *Biol Psychiatry*, 38, 756-61.
- BERRY-KRAVIS, E., HESSL, D., COFFEY, S., HERVEY, C., SCHNEIDER, A., YUHAS, J., HUTCHISON, J., SNAPE, M., TRANFAGLIA, M., NGUYEN, D. V. & HAGERMAN, R. 2009. A pilot open label, single dose trial of fenobam in adults with fragile X syndrome. *J Med Genet*, 46, 266-71.
- BISHOP, D. V. 1998. Development of the Children's Communication Checklist (CCC): a method for assessing qualitative aspects of communicative impairment in children. *J Child Psychol Psychiatry*, 39, 879-91.
- BISHOP, J. R., SCHUKSZ, M. & ESKO, J. D. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446, 1030-7.
- BISMUTH-EVENZAL, Y., GONOPOLSKY, Y., GURWITZ, D., IANCU, I., WEIZMAN, A. & REHAVI, M. 2012. Decreased serotonin content and reduced agonist-induced aggregation in platelets of patients chronically medicated with SSRI drugs. *J Affect Disord*, 136, 99-103.
- BORJIGIN, J., DENG, J., SUN, X., DE JESUS, M., LIU, T. & WANG, M. M. 2003. Diurnal pineal 3-O-sulphotransferase 2 expression controlled by beta-adrenergic repression. *J Biol Chem*, 278, 16315-9.
- BRAAM, W., SMITS, M. G., DIDDEN, R., KORZILIUS, H., VAN GEIJLSWIJK, I. M. & CURFS, L. M. 2009. Exogenous melatonin for sleep problems in individuals with intellectual disability: a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol*, 51, 340-9.
- BROWN, G. M., PULIDO, O., GROTA, L. J. & NILES, L. P. 1984. N-Acetylserotonin in the central nervous system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 8, 475-80.
- BRUDER, C. E., PIOTROWSKI, A., GIJSBERS, A. A., ANDERSSON, R., ERICKSON, S., DIAZ DE STAHL, T., MENZEL, U., SANDGREN, J., VON TELL, D., POPLAWSKI, A., CROWLEY, M., CRASTO, C., PARTRIDGE, E. C., [...] & DUMANSKI, J. P. 2008. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet*, 82, 763-71.
- BURGESS, H. J. & FOGG, L. F. 2008. Individual differences in the amount and timing of salivary melatonin secretion. *PLoS One*, 3, e3055.
- BUTLER, M. G., DASOUKI, M. J., ZHOU, X. P., TALEBIZADEH, Z., BROWN, M., TAKAHASHI, T. N., MILES, J. H., WANG, C. H., 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, 318-21.
- CABANLIT, M., WILLS, S., GOINES, P., ASHWOOD, P. & VAN DE WATER, J. 2007. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci*, 1107, 92-103.

- CAI, G., EDELMANN, L., GOLDSMITH, J. E., COHEN, N., NAKAMINE, A., REICHERT, J. G., HOFFMAN, E. J., ZURAWIECKI, D. M., SILVERMAN, J. M., HOLLANDER, E., SOORYA, L., ANAGNOSTOU, E., BETANCUR, C. & BUXBAUM, J. D. 2008. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Med Genomics*, 1, 50.
- CANITANO, R. 2007. Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 16, 61-6.
- CANNON, T. D. & KELLER, M. C. 2006. Endophenotypes in the genetic analyses of mental disorders. *Annu Rev Clin Psychol*, 2, 267-90.
- CARNEIRO, A. M., COOK, E. H., MURPHY, D. L. & BLAKELY, R. D. 2008. Interactions between integrin α IIb β 3 and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest*, 118, 1544-52.
- CELESTINO-SOPER, P. B., VIOLANTE, S., CRAWFORD, E. L., LUO, R., LIONEL, A. C., DELABY, E., CAI, G., SADIKOVIC, B., LEE, K., LO, C., GAO, K., PERSON, R. E., MOSS, T. J., GERMAN, J. R., HUANG, N., SHINAWI, M., [...] & BEAUDET, A. L. 2012. A common X-linked inborn error of carnitine biosynthesis may be a risk factor for nondysmorphic autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 7974-81.
- CHAHROUR, M., JUNG, S. Y., SHAW, C., ZHOU, X., WONG, S. T., QIN, J. & ZOGHBI, H. Y. 2008. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*, 320, 1224-9.
- CHAHROUR, M. H., YU, T. W., LIM, E. T., ATAMAN, B., COULTER, M. E., HILL, R. S., STEVENS, C. R., SCHUBERT, C. R., GREENBERG, M. E., GABRIEL, S. B. & WALSH, C. A. 2012. Whole-exome sequencing and homozygosity analysis implicate depolarization-regulated neuronal genes in autism. *PLoS Genet*, 8, e1002635.
- CHAKRABARTI, S. & FOMBONNE, E. 2005. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry*, 162, 1133-41.
- CHEAH, P. S., RAMSHAW, H. S., THOMAS, P. Q., TOYO-OKA, K., XU, X., MARTIN, S., COYLE, P., GUTHRIDGE, M. A., STOMSKI, F., VAN DEN BUUSE, M., WYNshaw-BORIS, A., LOPEZ, A. F. & SCHWARZ, Q. P. 2012. Neurodevelopmental and neuropsychiatric behaviour defects arise from 14-3-3zeta deficiency. *Mol Psychiatry*, 17, 451-66.
- CLAES, S., TANG, Y. L., GILLESPIE, C. F. & CUBELLS, J. F. 2012. Human genetics of schizophrenia. *Handb Clin Neurol*, 106, 37-52.
- CLARKE, G., GRENHAM, S., SCULLY, P., FITZGERALD, P., MOLONEY, R. D., SHANAHAN, F., DINAN, T. G. & CRYAN, J. F. 2012. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry*.
- CLOKIE, S. J., LAU, P., KIM, H. H., COON, S. L. & KLEIN, D. 2012. Micro RNAs in the pineal gland: mir-483 regulates melatonin synthesis by targeting arylalkylamine N-Acetyltransferase. *J Biol Chem*.
- COHEN, D. J., YOUNG, J. G. & ROTH, J. A. 1977. Platelet monoamine oxidase in early childhood autism. *Arch Gen Psychiatry*, 34, 534-7.
- COHEN, I. L., LIU, X., SCHUTZ, C., WHITE, B. N., JENKINS, E. C., BROWN, W. T. & HOLDEN, J. J. 2003. Association of autism severity with a monoamine oxidase A functional polymorphism. *Clin Genet*, 64, 190-7.
- CONSTANTINO, J. N., PRZYBECK, T., FRIESEN, D. & TODD, R. D. 2000. Reciprocal social behavior in children with and without pervasive developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr*, 21, 2-11.
- CONSTANTINO, J.N., ZHANG, Y., FRAZIER, T., ABBACCHI, A. M. & LAW, P. 2010. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *Am J Psychiatry*. 167, 1349-

- COOK, E. H., JR., LEVENTHAL, B. L., HELLER, W., METZ, J., WAINWRIGHT, M. & FREEDMAN, D. X. 1990. Autistic children and their first-degree relatives: relationships between serotonin and norepinephrine levels and intelligence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2, 268-74.
- COOPER, G. M., COE, B. P., GIRIRAJAN, S., ROSENFELD, J. A., VU, T. H., BAKER, C., WILLIAMS, C., STALKER, H., HAMID, R., HANNIG, V., ABDEL-HAMID, H., BADER, P., MCCRACKEN, E., NIYAZOV, D., [...] & EICHLER, E. E. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*, 43, 838-46.
- CORBETT, B. A., KANTOR, A. B., SCHULMAN, H., WALKER, W. L., LIT, L., ASHWOOD, P., ROCKE, D. M. & SHARP, F. R. 2007. A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins. *Mol Psychiatry*, 12, 292-306.
- CORBETT, B. A., MENDOZA, S., WEGELIN, J. A., CARMEAN, V. & LEVINE, S. 2008. Variable cortisol circadian rhythms in children with autism and anticipatory stress. *J Psychiatry Neurosci*, 33, 227-34.
- CORREIA, C. T., COUTINHO, A. M., SEQUEIRA, A. F., SOUSA, I. G., LOURENCO VENDA, L., ALMEIDA, J. P., ABREU, R. L., LOBO, C., MIGUEL, T. S., CONROY, J., COCHRANE, L., GALLAGHER, L., GILL, M., ENNIS, S., OLIVEIRA, G. G. & VICENTE, A. M. 2010. Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav*, 9, 841-8.
- COTE, F., FLIGNY, C., BAYARD, E., LAUNAY, J. M., GERSHON, M. D., MALLET, J. & VODJDANI, G. 2007. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 329-34.
- COURCHESNE, E., KARNS, C. M., DAVIS, H. R., ZICCARDI, R., CARPER, R. A., TIGUE, Z. D., CHISUM, H. J., MOSES, P., PIERCE, K., LORD, C., LINCOLN, A. J., PIZZO, S., SCHREIBMAN, L., HAAS, R. H., AKSHOOMOFF, N. A. & COURCHESNE, R. Y. 2001. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology*, 57, 245-54.
- CROEN, L. A., GREETHER, J. K., YOSHIDA, C. K., ODOULI, R. & HENDRICK, V. 2011. Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 68, 1104-12.
- CURRAN, S., BOLTON, P., ROZSNYAI, K., CHIOCCHETTI, A., KLAUCK, S. M., DUKETIS, E., POUSTKA, F., SCHLITT, S., FREITAG, C. M., LEE, I., MUGLIA, P., POOT, M., STAAL, W., DE JONGE, M. V., OPHOFF, R. A., [...] & COLLIER, D. 2011. No association between a common single nucleotide polymorphism, rs4141463, in the MACROD2 gene and autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B, 633-9.
- CUSMANO-OZOG, K., MANNING, M. A. & HOYME, H. E. 2007. 22q13.3 deletion syndrome: a recognizable malformation syndrome associated with marked speech and language delay. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 145C, 393-8.
- DANIELS, J. L., FORSSEN, U., HULTMAN, C. M., CNATTINGIUS, S., SAVITZ, D. A., FEYCHTING, M. & SPAREN, P. 2008. Parental psychiatric disorders associated with autism spectrum disorders in the offspring. *Pediatrics*. 121, 1357-62.
- DE LEERSNYDER, H. 2006. Inverted rhythm of melatonin secretion in Smith-Magenis syndrome: from symptoms to treatment. *Trends Endocrinol Metab*, 17, 291-8.
- DELORME, R., BETANCUR, C., CHASTE, P., KERNEIS, S., STOPIN, A., MOUREN, M. C., COLLET, C., BOURGERON, T., LEBOYER, M. & LAUNAY, J. M. 2010. Reduced 3-O-methyl-dopa levels in OCD patients and their unaffected parents is associated with the low activity M158 COMT allele. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B, 542-8.

- DIDDE, R. & SIGAFOOS, J. 2001. A review of the nature and treatment of sleep disorders in individuals with developmental disabilities. *Res Dev Disabil*, 22, 255-72.
- DINGEMANSE, J., ZURCHER, G. & KETTLER, R. 2000. Investigation of a correlation between monoamine oxidase B and catechol-O-methyltransferase activity in human blood cells. *Eur J Pharm Sci*, 12, 159-63.
- DURAND, C. M., BETANCUR, C., BOECKERS, T. M., BOCKMANN, J., CHASTE, P., FAUCHEREAU, F., NYGREN, G., RASTAM, M., GILLBERG, I. C., ANCKARSATER, H., SPONHEIM, E., GOUBRAN-BOTROS, H., DELORME, R., CHABANE, N., MOUREN-SIMEONI, M. C., DE MAS, P., BIETH, E., ROGE, B., HERON, D., BURGLIN, 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, 25-7.
- ECKER, C., MARQUAND, A., MOURAO-MIRANDA, J., JOHNSTON, P., DALY, E. M., BRAMMER, M. J., MALTEZOS, S., MURPHY, C. M., ROBERTSON, D., WILLIAMS, S. C. & MURPHY, D. G. 2010. Describing the brain in autism in five dimensions--magnetic resonance imaging-assisted diagnosis of autism spectrum disorder using a multiparameter classification approach. *J Neurosci*, 30, 10612-23.
- EDITORS OF THE LANCET 2010. Retraction: ileal lymphoid nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet*, 445.
- EHLERS, S., GILLBERG, C. & WING, L. 1999. A screening questionnaire for Asperger syndrome and other high-functioning autism spectrum disorders in school age children. *J Autism Dev Disord*, 29, 129-41.
- EHNINGER, D., HAN, S., SHILYANSKY, C., ZHOU, Y., LI, W., KWIATKOWSKI, D. J., RAMESH, V. & SILVA, A. J. 2008. Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med*, 14, 843-8.
- ETAINE, B., DUMAINE, A., BELLIVIER, F., PAGAN, C., FRANCELLE, L., GOUBRAN-BOTROS, H., MORENO, S., DESHOMMES, J., MOUSTAFA, K., LE DUDAL, K., MATHIEU, F., HENRY, C., KAHN, J. P., LAUNAY, J. M., MUHLEISEN, T. W., CICHON, S., BOURGERON, T., LEBOYER, M. & JAMAIN, S. 2012. Genetic and functional abnormalities of the melatonin biosynthesis pathway in patients with bipolar disorder. *Hum Mol Genet*.
- ETAINE, B., MILHIET, V., BELLIVIER, F. & LEBOYER, M. 2011. Genetics of circadian rhythms and mood spectrum disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*, 21 Suppl 4, S676-82.
- EY, E., LEBLOND, C. S. & BOURGERON, T. 2011. Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. *Autism Res*, 4, 5-16.
- FATEMI, S. H., FOLSOM, T. D., KNEELAND, R. E. & LIESCH, S. B. 2011. Metabotropic glutamate receptor 5 upregulation in children with autism is associated with underexpression of both Fragile X mental retardation protein and GABAA receptor beta 3 in adults with autism. *Anat Rec (Hoboken)*, 294, 1635-45.
- FINEGOLD, S. M., DOWNES, J. & SUMMANEN, P. H. 2012. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*, 18, 260-2.
- FOLSTEIN, S. & RUTTER, M. 1977. Genetic influences and infantile autism. *Nature*, 265, 726-8.
- FOMBONNE, E. 2003. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord*, 33, 365-82.
- FOMBONNE, E. 2009. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res*, 65, 591-8.
- FRUSTACI, A., NERI, M., CESARIO, A., ADAMS, J. B., DOMENICI, E., DALLA BERNARDINA, B. & BONASSI, S. 2012. Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med*, 52, 2128-41.

- FRYE, R. E., SEQUEIRA, J. M., QUADROS, E. V., JAMES, S. J. & ROSSIGNOL, D. A. 2012. Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*.
- GALECKI, P., SZEMRAJ, J., BARTOSZ, G., BIENKIEWICZ, M., GALECKA, E., FLORKOWSKI, A., LEWINSKI, A. & KARBOWNIK-LEWINSKA, M. 2010. Single-nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin synthesis rate-limiting enzyme in recurrent depressive disorder. *J Pineal Res*, 48, 311-7.
- GARCIA, K. L., YU, G., NICOLINI, C., MICHALSKI, B., GARZON, D. J., CHIU, V. S., TONGIORGI, E., SZATMARI, P. & FAHNESTOCK, M. 2012. Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71, 289-97.
- GARDENER, H., SPIEGELMAN, D. & BUKA, S. L. 2011. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*, 128, 344-55.
- GILMAN, S. R., IOSSIFOV, I., LEVY, D., RONEMUS, M., WIGLER, M. & VITKUP, D. 2011. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron*, 70, 898-907.
- GIRIRAJAN, S. & EICHLER, E. E. 2010. Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Hum Mol Genet*, 19, R176-87.
- GIRIRAJAN, S., ROSENFELD, J. A., COOPER, G. M., ANTONACCI, F., SISWARA, P., ITSARA, A., VIVES, L., WALSH, T., MCCARTHY, S. E., BAKER, C., MEFFORD, H. C., KIDD, J. M., BROWNING, S. R., [...] & EICHLER, E. E. 2010. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet*, 42, 203-9.
- GLESSNER, J. T., WANG, K., CAI, G., KORVATSKA, O., KIM, C. E., WOOD, S., ZHANG, H., ESTES, A., BRUNE, C. W., BRADFIELD, J. P., IMIELINSKI, M., FRACKELTON, E. C., REICHERT, J., CRAWFORD, E. L., MUNSON, J., & HAKONARSON, H. 2009. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, 459, 569-73.
- GREEN, L., FEIN, D., MODAHL, C., FEINSTEIN, C., WATERHOUSE, L. & MORRIS, M. 2001. Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms. *Biol Psychiatry*, 50, 609-13.
- HALLMAYER, J., CLEVELAND, S., TORRES, A., PHILLIPS, J., COHEN, B., TORIGOE, T., MILLER, J., FEDELE, A., COLLINS, J., SMITH, K., LOTSPEICH, L., CROEN, L. A., OZONOFF, S., LAJONCHERE, C., GREETHER, J. K. & RISCH, N. 2011. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*, 68, 1095-102.
- HALMOY, A., JOHANSSON, S., WINGE, I., MCKINNEY, J. A., KNAPPSKOG, P. M. & HAAVIK, J. 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in offspring of mothers with impaired serotonin production. *Arch Gen Psychiatry*, 67, 1033-43.
- HANLEY, H. G., STAHL, S. M. & FREEDMAN, D. X. 1977. Hyperserotonemia and amine metabolites in autistic and retarded children. *Arch Gen Psychiatry*, 34, 521-31.
- HARTLEY, S. L., SIKORA, D. M. & MCCOY, R. 2008. Prevalence and risk factors of maladaptive behaviour in young children with Autistic Disorder. *J Intellect Disabil Res*, 52, 819-29.
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ 2010. Autisme et autres troubles envahissants du développement. Etat des connaissances hors mécanismes physiopathologiques, psychopathologiques et recherche fondamentale. Argumentaire.
- HEIJTZ, R. D., WANG, S., ANUAR, F., QIAN, Y., BJORKHOLM, B., SAMUELSSON, A., HIBBERD, M. L., FORSSBERG, H. & PETTERSSON, S. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 3047-52.

- HOREV, G., ELLEGOOD, J., LERCH, J. P., SON, Y. E., MUTHUSWAMY, L., VOGEL, H., KRIEGER, A. M., BUJA, A., HENKELMAN, R. M., WIGLER, M. & MILLS, A. A. 2011. Dosage-dependent phenotypes in models of 16p11.2 lesions found in autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 17076-81.
- HU, V. W., SARACHANA, T., KIM, K. S., NGUYEN, A., KULKARNI, S., STEINBERG, M. E., LUU, T., LAI, Y. & LEE, N. H. 2009. Gene expression profiling differentiates autism case-controls and phenotypic variants of autism spectrum disorders: evidence for circadian rhythm dysfunction in severe autism. *Autism Res*, 2, 78-97.
- IBRAHIM, S. H., VOIGT, R. G., KATUSIC, S. K., WEAVER, A. L. & BARBARESI, W. J. 2009. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics*, 124, 680-6.
- INATANI, M., IRIE, F., PLUMP, A. S., TESSIER-LAVIGNE, M. & YAMAGUCHI, Y. 2003. Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science*, 302, 1044-6.
- IOSSIFOV, I., RONEMUS, M., LEVY, D., WANG, Z., HAKKER, I., ROSENBAUM, J., YAMROM, B., LEE, Y. H., NARZISI, G., LEOTTA, A., KENDALL, J., GRABOWSKA, E., MA, B., MARKS, S., RODGERS, L., STEPANSKY, [...] & WIGLER, M. 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*, 74, 285-99.
- IRIE, F., BADIE-MAHDAVI, H. & YAMAGUCHI, Y. 2012. Autism-like socio-communicative deficits and stereotypies in mice lacking heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 5052-6.
- ISHIKAWA-BRUSH, Y., POWELL, J. F., BOLTON, P., MILLER, A. P., FRANCIS, F., WILLARD, H. F., LEHRACH, H. & MONACO, A. P. 1997. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet*, 6, 1241-50.
- JACQUEMONT, S., REYMOND, A., ZUFFEREY, F., HAREWOOD, L., WALTERS, R. G., KUTALIK, Z., MARTINET, D., SHEN, Y., VALSESIA, A., BECKMANN, N. D., THORLEIFSSON, G., BELFIORE, M., BOUQUILLON, S., et al. 2011. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature*, 478, 97-102.
- JAMAIN, S., QUACH, H., BETANCUR, C., RASTAM, M., COLINEAUX, C., GILLBERG, I. C., 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, 27-9.
- JAMAIN, S., RADYUSHKIN, K., HAMMERSCHMIDT, K., GRANON, S., BORETIUS, S., VAROQUEAUX, F., RAMANANTSOA, N., GALLEGO, J., RONNENBERG, A., WINTER, D., FRAHM, J., FISCHER, J., BOURGERON, T., EHRENREICH, H. & BROSE, N. 2008. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1710-5.
- JAMES, S. J., MELNYK, S., FUCHS, G., REID, T., JERNIGAN, S., PAVLIV, O., HUBANKS, A. & GAYLOR, D. W. 2009. Efficacy of methylcobalamin and folinic acid treatment on glutathione redox status in children with autism. *Am J Clin Nutr*, 89, 425-30.
- JAMES, S. J., MELNYK, S., JERNIGAN, S., CLEVES, M. A., HALSTED, C. H., WONG, D. H., CUTLER, P., BOCK, K., BORIS, M., BRADSTREET, J. J., BAKER, S. M. & GAYLOR, D. W. 2006. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B, 947-56.
- JAMES, S. J., MELNYK, S., JERNIGAN, S., HUBANKS, A., ROSE, S. & GAYLOR, D. W. 2008. Abnormal transmethylation/transsulfuration metabolism and DNA

- hypomethylation among parents of children with autism. *J Autism Dev Disord*, 38, 1966-75.
- JANG, S. W., LIU, X., PRADOLDEJ, S., TOSINI, G., CHANG, Q., IUUVONE, P. M. & YE, K. 2010. N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3876-81.
- KANNER, L. 1943. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2, 217-250.
- KANTOR, D. B., CHIVATAKARN, O., PEER, K. L., OSTER, S. F., INATANI, M., HANSEN, M. J., FLANAGAN, J. G., YAMAGUCHI, Y., SRETAVAN, D. W., GIGER, R. J. & KOLODKIN, A. L. 2004. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron*, 44, 961-75.
- KATOH-SEMBA, R., WAKAKO, R., KOMORI, T., SHIGEMI, H., MIYAZAKI, N., ITO, H., KUMAGAI, T., TSUZUKI, M., SHIGEMI, K., YOSHIDA, F. & NAKAYAMA, A. 2007. Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *Int J Dev Neurosci*, 25, 367-72.
- KEMA, I. P., SCHELLINGS, A. M., HOPPENBROUWERS, C. J., RUTGERS, H. M., DE VRIES, E. G. & MUSKIET, F. A. 1993. High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. *Clin Chim Acta*, 221, 143-58.
- KENNEDY, S. H., KUTCHER, S. P., RALEVSKI, E. & BROWN, G. M. 1996. Nocturnal melatonin and 24-hour 6-sulphatoxymelatonin levels in various phases of bipolar affective disorder. *Psychiatry Res*, 63, 219-22.
- KOLEVZON, A., GROSS, R. & REICHENBERG, A. 2007. Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 161, 326-33.
- KONG, X., LI, X., CAI, Z., YANG, N., LIU, Y., SHU, J., PAN, L. & ZUO, P. 2008. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol*, 28, 569-79.
- KONTUREK, S. J., KONTUREK, P. C., BRZozowska, I., PAWLIK, M., SLIWOWSKI, Z., CZESNIKIEWICZ-GUZI, M., KWIECIEN, S., BRZozowski, T., BUBENIK, G. A. & PAWLIK, W. W. 2007. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol*, 58, 381-405.
- KOOLEN, D. A., PFUNDT, R., DE LEEUW, N., HEHIR-KWA, J. Y., NILLESEN, W. M., NEEFS, I., SCHELTINGA, I., SISTERMANS, E., SMEETS, D., BRUNNER, H. G., VAN KESSEL, A. G., VELTMAN, J. A. & DE VRIES, B. B. 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat*, 30, 283-92.
- KRIPKE, D. F., NIEVERGELT, C. M., TRANAH, G. J., MURRAY, S. S., MCCARTHY, M. J., REX, K. M., PARIMI, N. & KELSOE, J. R. 2011. Polymorphisms in melatonin synthesis pathways: possible influences on depression. *J Circadian Rhythms*, 9, 8.
- KULMAN, G., LISSONI, P., ROVELLI, F., ROSELLI, M. G., BRIVIO, F. & SEQUERI, P. 2000. Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children. *Neuro Endocrinol Lett*, 21, 31-34.
- KUPERMAN, S., BEEGHLY, J. H., BURNS, T. L. & TSAI, L. Y. 1985. Serotonin relationships of autistic probands and their first-degree relatives. *J Am Acad Child Psychiatry*, 24, 186-90.
- KURIHARA, D. & YAMASHITA, T. 2012. Chondroitin sulfate proteoglycans down-regulate spine formation in cortical neurons by targeting tropomyosin-related kinase B (TrkB) protein. *J Biol Chem*, 287, 13822-8.
- KUWANO, Y., KAMIO, Y., KAWAI, T., KATSUURA, S., INADA, N., TAKAKI, A. & ROKUTAN, K. 2011. Autism-associated gene expression in peripheral leucocytes

- commonly observed between subjects with autism and healthy women having autistic children. *PLoS One*, 6, e24723.
- LAKE, C. R., ZIEGLER, M. G. & MURPHY, D. L. 1977. Increased norepinephrine levels and decreased dopamine-beta-hydroxylase activity in primary autism. *Arch Gen Psychiatry*, 34, 553-6.
- LAM, K. S. & AMAN, M. G. 2007. The Repetitive Behavior Scale-Revised: independent validation in individuals with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 37, 855-66.
- LAM, K. S., AMAN, M. G. & ARNOLD, L. E. 2006. Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. *Res Dev Disabil*, 27, 254-89.
- LAUNAY, J. M., 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, 333-47.
- LAUNAY, J. M., DEL PINO, M., CHIRONI, G., CALLEBERT, J., PEOCH, K., MEGNIEN, J. L., MALLET, J., SIMON, A. & RENDU, F. 2009. Smoking induces long-lasting effects through a monoamine-oxidase epigenetic regulation. *PLoS One*, 4, e7959.
- LAUNAY, J. M., FERRARI, P., HAIMART, M., BURSZTEJN, C., TABUTEAU, F., BRACONNIER, A., PASQUES-BONDOUX, D., LUONG, C. & DREUX, C. 1988. Serotonin metabolism and other biochemical parameters in infantile autism. A controlled study of 22 autistic children. *Neuropsychobiology*, 20, 1-11.
- LAUNAY, J. M., GEOFFROY, C., COSTA, J. L. & ALOUF, J. E. 1984. Purified -SH-activated toxins (streptolysin O, alveolysin): new tools for determination of platelet enzyme activities. *Thromb Res*, 33, 189-96.
- LEBLOND, C. S., HEINRICH, J., DELORME, R., PROEPPER, C., BETANCUR, C., HUGUET, G., KONYUKH, M., CHASTE, P., EY, E., RASTAM, M., ANCKARSATER, H., NYGREN, G., GILLBERG, I. C., MELKE, J., TORO, R., REGNAULT, B., FAUCHEREAU, F., MERCATI, O., LEMIERE, N., SKUSE, D., POOT, M., HOLT, R., MONACO, A. P., JARVELA, I., KANTOJARVI, K., VANHALA, R., CURRAN, S., COLLIER, D. A., BOLTON, P., CHIOCCHETTI, A., KLAUCK, S. M., POUSTKA, F., FREITAG, C. M., WALTES, R., KOPP, M., DUKETIS, E., BACCHELLI, E., MINOPOLI, F., RUTA, L., BATTAGLIA, A., MAZZONE, L., MAESTRINI, E., SEQUEIRA, A. F., OLIVEIRA, B., VICENTE, A., OLIVEIRA, G., PINTO, D., SCHERER, S. W., ZELENIKA, D., DELEPINE, M., LATHROP, M., BONNEAU, D., GUINCHAT, V., DEVILLARD, F., ASSOULINE, B., MOUREN, M. C., LEBOYER, M., GILLBERG, C., BOECKERS, T. M. & BOURGERON, T. 2012. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genet*, 8, e1002521.
- LEBOYER, M., BELLIVIER, F., NOSTEN-BERTRAND, M., JOUVENT, R., PAULS, D. & MALLET, J. 1998. Psychiatric genetics: search for phenotypes. *Trends Neurosci*, 21, 102-5.
- LEBOYER, M., PHILIPPE, A., BOUVARD, M., GUILLOUD-BATAILLE, M., BONDOUX, D., TABUTEAU, F., FEINGOLD, J., MOUREN-SIMEONI, M. C. & LAUNAY, J. M. 1999. Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biol Psychiatry*, 45, 158-63.
- LEMONNIER, E. & BEN-ARI, Y. 2010. The diuretic bumetanide decreases autistic behaviour in five infants treated during 3 months with no side effects. *Acta Paediatr*, 99, 1885-8.
- LESURTEL, M., SOLL, C., GRAF, R. & CLAVIEN, P. A. 2008. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci*, 65, 940-52.

- LEVENTHAL, B. L., COOK, E. H., JR., MORFORD, M., RAVITZ, A. & FREEDMAN, D. X. 1990. Relationships of whole blood serotonin and plasma norepinephrine within families. *J Autism Dev Disord*, 20, 499-511.
- LEVY, D., RONEMUS, M., YAMROM, B., LEE, Y. H., LEOTTA, A., KENDALL, J., MARKS, S., LAKSHMI, B., PAI, D., YE, K., BUJA, A., KRIEGER, A., YOON, S., TROGE, J., RODGERS, L., IOSSIFOV, I. & WIGLER, M. 2011. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron*, 70, 886-97.
- LEWY, A. J. 2009. Circadian misalignment in mood disturbances. *Curr Psychiatry Rep*, 11, 459-65.
- LEWY, A. J., LEFLER, B. J., EMENS, J. S. & BAUER, V. K. 2006. The circadian basis of winter depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7414-9.
- LEYFER, O. T., FOLSTEIN, S. E., BACALMAN, S., DAVIS, N. O., DINH, E., MORGAN, J., TAGER-FLUSBERG, H. & LAINHART, J. E. 2006. Comorbid psychiatric disorders in children with autism: interview development and rates of disorders. *J Autism Dev Disord*, 36, 849-61.
- LEZOUALCH, F., SKUTELLA, T., WIDMANN, M. & BEHL, C. 1996. Melatonin prevents oxidative stress-induced cell death in hippocampal cells. *Neuroreport*, 7, 2071-7.
- LI, H., YAMAGATA, T., MORI, M. & MOMOI, M. Y. 2002. Association of autism in two patients with hereditary multiple exostoses caused by novel deletion mutations of EXT1. *J Hum Genet*, 47, 262-5.
- LICHTENSTEIN, P., CARLSTROM, E., RASTAM, M., GILLBERG, C. & ANCKARSATER, H. 2010. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *Am J Psychiatry*, 167, 1357-63.
- LITTLEWOOD, J., GLOVER, V., SANDLER, M., PETTY, R., PEATFIELD, R. & ROSE, F. C. 1982. Platelet phenolsulphotransferase deficiency in dietary migraine. *Lancet*, 1, 983-6.
- LORD, C., PETKOVA, E., HUS, V., GAN, W., LU, F., MARTIN, D. M., OUSLEY, O., GUY, L., BERNIER, R., GERDTS, J., ALGERMISSEN, M., WHITAKER, A., SUTCLIFFE, J. S., WARREN, Z., KLIN, A., SAULNIER, C., HANSON, E., [...] & RISI, S. 2012. A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 69, 306-13.
- LORD, C., RISI, S., LAMBRECHT, L., COOK, E. H., JR., LEVENTHAL, B. L., DILAVORE, P. C., 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, 205-23.
- 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, 659-85.
- MA, D., SALYAKINA, D., JAWORSKI, J. M., KONIDARI, I., WHITEHEAD, P. L., ANDERSEN, A. N., HOFFMAN, J. D., SLIFER, S. H., HEDGES, D. J., CUKIER, H. N., GRISWOLD, A. J., MCCAULEY, J. L., BEECHAM, G. W., WRIGHT, H. H., ABRAMSON, R. K., MARTIN, E. R., HUSSMAN, J. P., GILBERT, J. R., CUCCARO, M. L., HAINES, J. L. & PERICAK-VANCE, M. A. 2009. A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1. *Ann Hum Genet*, 73, 263-73.
- MANEGLIER, B., ROGEZ-KREUZ, C., CORDONNIER, P., THEROND, P., ADVENIER, C., DORMONT, D., CLAYETTE, P. & SPREUX-VAROUQUAUX, O. 2004. Simultaneous measurement of kynurenine and tryptophan in human plasma and supernatants of cultured human cells by HPLC with coulometric detection. *Clin Chem*, 50, 2166-8.
- MARAZZITI, D., PALEGO, L., DELL'OSSO, L., BATISTINI, A., CASSANO, G. B. & AKISKAL, H. S. 1996. Platelet sulfotransferase in different psychiatric disorders. *Psychiatry Res*, 65, 73-8.

- MARONDE, E., SAADE, A., ACKERMANN, K., GOUBRAN-BOTROS, H., PAGAN, C., BUX, R., BOURGERON, T., DEHGHANI, F. & STEHLE, J. H. 2011. Dynamics in enzymatic protein complexes offer a novel principle for the regulation of melatonin synthesis in the human pineal gland. *J Pineal Res*, 51, 145-55.
- MCPHEETERS, M. L., WARREN, Z., SATHE, N., BRUZEK, J. L., KRISHNASWAMI, S., JEROME, R. N. & VEENSTRA-VANDERWEELE, J. 2011. A systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 127, e1312-21.
- MEIKLE, L., TALOS, D. M., ONDA, H., POLLIZZI, K., ROTENBERG, A., SAHIN, M., JENSEN, F. E. & KWIATKOWSKI, D. J. 2007. A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *J Neurosci*, 27, 5546-58.
- MELKE, J., GOUBRAN BOTROS, H., CHASTE, P., BETANCUR, C., NYGREN, G., ANCKARSATER, H., RASTAM, M., STAHLBERG, O., GILLBERG, I. C., DELORME, R., CHABANE, N., MOUREN-SIMEONI, M. C., FAUCHEREAU, F., DURAND, C. M., CHEVALIER, F., DROUOT, X., COLLET, C., LAUNAY, J. M., LEBOYER, M., GILLBERG, C. & BOURGERON, T. 2008. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*, 13, 90-8.
- MILES, J. H., TAKAHASHI, T. N., BAGBY, S., SAHOTA, P. K., VASLOW, D. F., WANG, C. H., HILLMAN, R. E. & FARMER, J. E. 2005. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A*, 135, 171-80.
- MING, X., BRIMACOMBE, M. & WAGNER, G. C. 2007. Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain Dev*, 29, 565-70.
- MIYAZAKI, K., NARITA, N., SAKUTA, R., MIYAHARA, T., NARUSE, H., OKADO, N. & NARITA, M. 2004. Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study. *Brain Dev*, 26, 292-5.
- MOSS, J. & HOWLIN, P. 2009. Autism spectrum disorders in genetic syndromes: implications for diagnosis, intervention and understanding the wider autism spectrum disorder population. *J Intellect Disabil Res*, 53, 852-73.
- MULDER, E. J., ANDERSON, G. M., KEMPERMAN, R. F., OOSTERLOO-DUINKERKEN, A., MINDERAA, R. B. & KEMA, I. P. 2010. Urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid, serotonin and 6-sulphatoxymelatonin in normoserotonemic and hyperserotonemic autistic individuals. *Neuropsychobiology*, 61, 27-32.
- MUNTJEWERFF, J. W., KAHN, R. S., BLOM, H. J. & DEN HEIJER, M. 2006. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 11, 143-9.
- NAKATANI, J., TAMADA, K., HATANAKA, F., ISE, S., OHTA, H., INOUE, K., TOMONAGA, S., WATANABE, Y., CHUNG, Y. J., BANERJEE, R., IWAMOTO, K., KATO, T., OKAZAWA, M., YAMAUCHI, K., TANDA, K., TAKAO, K., MIYAKAWA, T., BRADLEY, A. & TAKUMI, T. 2009. Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell*, 137, 1235-46.
- NEALE, B. M., KOU, Y., LIU, L., MA'AYAN, A., SAMOCHA, K. E., SABO, A., LIN, C. F., STEVENS, C., WANG, L. S., MAKAROV, V., POLAK, P., YOON, S., MAGUIRE, J., CRAWFORD, E. L., CAMPBELL, N. G., GELLER, E. T., [...] & DALY, M. J. 2012. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 485, 242-5.
- NIR, I., MEIR, D., ZILBER, N., KNOBLER, H., HADJEZ, J. & LERNER, Y. 1995. Brief report: circadian melatonin, thyroid-stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. *J Autism Dev Disord*, 25, 641-54.
- NURNBERGER, J. I., JR., ADKINS, S., LAHIRI, D. K., MAYEDA, A., HU, K., LEWY, A., MILLER, A., BOWMAN, E. S., MILLER, M. J., RAU, L., SMILEY, C. & DAVIS-

- SINGH, D. 2000. Melatonin suppression by light in euthymic bipolar and unipolar patients. *Arch Gen Psychiatry*, 57, 572-9.
- O'ROAK, B. J., DERIZIOTIS, P., LEE, C., VIVES, L., SCHWARTZ, J. J., GIRIRAJAN, S., KARAKOC, E., MACKENZIE, A. P., NG, S. B., BAKER, C., RIEDER, M. J., NICKERSON, D. A., BERNIER, R., FISHER, S. E., SHENDURE, J. & EICHLER, E. E. 2011. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet*, 43, 585-9.
- O'ROAK, B. J., VIVES, L., GIRIRAJAN, S., KARAKOC, E., KRUMM, N., COE, B. P., LEVY, R., KO, A., LEE, C., SMITH, J. D., TURNER, E. H., STANAWAY, I. B., VERNOT, B., MALIG, M., BAKER, C., REILLY, B., AKEY, J. M., BORENSTEIN, E., RIEDER, M. J., NICKERSON, D. A., BERNIER, R., SHENDURE, J. & EICHLER, E. E. 2012. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485, 246-50.
- OBSIL, T., GHIRLANDO, R., KLEIN, D. C., GANGULY, S. & DYDA, F. 2001. Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell*, 105, 257-67.
- OGIHARA, T., ISOBE, T., ICHIMURA, T., TAOKA, M., FUNAKI, M., SAKODA, H., ONISHI, Y., INUKAI, K., ANAI, M., FUKUSHIMA, Y., KIKUCHI, M., YAZAKI, Y., OKA, Y. & ASANO, T. 1997. 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem*, 272, 25267-74.
- OLLIVIER, L. 1971. L'héritabilité et sa mesure. *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris.*, XII^e Série, 159-167.
- PAGE, D. T., KUTI, O. J., PRESTIA, C. & SUR, M. 2009. Haploinsufficiency for Pten and Serotonin transporter cooperatively influences brain size and social behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 1989-94.
- PALMIERI, L. & PERSICO, A. M. 2010. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: cause or effect? *Biochim Biophys Acta*, 1797, 1130-7.
- PECA, J., FELICIANO, C., TING, J. T., WANG, W., WELLS, M. F., VENKATRAMAN, T. N., LASCOLA, C. D., FU, Z. & FENG, G. 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472, 437-42.
- PENAGARIKANO, O., ABRAHAMS, B. S., HERMAN, E. I., WINDEN, K. D., GDALYAHU, A., DONG, H., SONNENBLICK, L. I., GRUVER, R., ALMAJANO, J., BRAGIN, A., GOLSHANI, P., TRACHTENBERG, J. T., PELES, E. & GESCHWIND, D. H. 2011. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*, 147, 235-46.
- PINEL, P., FAUCHEREAU, F., MORENO, A., BARBOT, A., LATHROP, M., ZELENKA, D., LE BIHAN, D., POLINE, J. B., BOURGERON, T. & DEHAENE, S. 2012. Genetic variants of FOXP2 and KIAA0319/TTRAP/THEM2 locus are associated with altered brain activation in distinct language-related regions. *J Neurosci*, 32, 817-25.
- PINTO, D., PAGNAMENTA, A. T., KLEI, L., ANNEY, R., MERICO, D., REGAN, R., CONROY, J., MAGALHAES, T. R., CORREIA, C., ABRAHAMS, B. S., ALMEIDA, J., BACCHELLI, E., BADER, G. D., BAILEY, A. J., BAIRD, G., et al. 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, 466, 368-72.
- PITON, A., GAUTHIER, J., HAMDAN, F. F., LAFRENIERE, R. G., YANG, Y., HENRION, E., LAURENT, S., NOREAU, A., THIBODEAU, P., KAREMERA, L., SPIEGELMAN, D., KUKU, F., DUGUAY, J., [...] & ROULEAU, G. A. 2011. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 16, 867-80.

- RAHMAN, S. A., MARCU, S., KAYUMOV, L. & SHAPIRO, C. M. 2010. Altered sleep architecture and higher incidence of subsyndromal depression in low endogenous melatonin secretors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 260, 327-35.
- RAMAEKERS, V. T., QUADROS, E. V. & SEQUEIRA, J. M. 2012. Role of folate receptor autoantibodies in infantile autism. *Mol Psychiatry*.
- RAMOCKI, M. B. & ZOGHBI, H. Y. 2008. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature*, 455, 912-8.
- REDCAY, E. & COURCHESNE, E. 2005. When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports. *Biol Psychiatry*, 58, 1-9.
- REDDY, K. S. 2005. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet*, 6, 3.
- REDON, R., ISHIKAWA, S., FITCH, K. R., FEUK, L., PERRY, G. H., ANDREWS, T. D., FIEGLER, H., SHAPERO, M. H., CARSON, A. R., CHEN, W., CHO, E. K., DALLAIRE, S., FREEMAN, J. L., GONZALEZ, J. R., GRATACOS, M., [...] & HURLES, M. E. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 444-54.
- REHEN, S. K., YUNG, Y. C., MCCREIGHT, M. P., KAUSHAL, D., YANG, A. H., ALMEIDA, B. S., KINGSBURY, M. A., CABRAL, K. M., MCCONNELL, M. J., ANLIKER, B., FONTANOZ, M. & CHUN, J. 2005. Constitutional aneuploidy in the normal human brain. *J Neurosci*, 25, 2176-80.
- ROLLINS, B., MARTIN, M. V., MORGAN, L. & VAWTER, M. P. 2010. Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B, 919-36.
- ROPER, H. H. 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 11, 161-87.
- ROSENBERG, R. E., LAW, J. K., YENOKYAN, G., MCGREADY, J., KAUFMANN, W. E. & LAW, P. A. 2009. Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 163, 907-14.
- ROSENHALL, U., NORDIN, V., SANDSTROM, M., AHLSEN, G. & GILLBERG, C. 1999. Autism and hearing loss. *J Autism Dev Disord*, 29, 349-57.
- ROSSIGNOL, D. A. & FRYE, R. E. 2012a. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 17, 290-314.
- ROSSIGNOL, D. A. & FRYE, R. E. 2012b. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. *Mol Psychiatry*, 17, 389-401.
- SALMAN, E. D., KADLUBAR, S. A. & FALANY, C. N. 2009. Expression and localization of cytosolic sulfotransferase (SULT) 1A1 and SULT1A3 in normal human brain. *Drug Metab Dispos*, 37, 706-9.
- SANDERS, S. J., ERCAN-SENCICEK, A. G., HUS, V., LUO, R., MURTHA, M. T., MORENO-DE-LUCA, D., CHU, S. H., MOREAU, M. P., GUPTA, A. R., THOMSON, S. A., MASON, C. E., BILGUVAR, K., CELESTINO-SOPER, P. B., [...] & STATE, M. W. 2011. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*, 70, 863-85.
- SANDERS, S. J., MURTHA, M. T., GUPTA, A. R., MURDOCH, J. D., RAUBESON, M. J., WILLSEY, A. J., ERCAN-SENCICEK, A. G., DILULLO, N. M., PARIKSHAK, N. N., STEIN, J. L., WALKER, M. F., OBER, G. T., TERAN, N. A., [...] & STATE, M. W. 2012. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, 485, 237-41.

- SAUNA, Z. E. & KIMCHI-SARFATY, C. 2011. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*, 12, 683-91.
- SCHAAF, C. P. & ZOGHBI, H. Y. 2011. Solving the autism puzzle a few pieces at a time. *Neuron*, 70, 806-8.
- SCHMIDT, R. J., HANSEN, R. L., HARTIALA, J., ALLAYEE, H., SCHMIDT, L. C., TANCREDI, D. J., TASSONE, F. & HERTZ-PICCIOTTO, I. 2011. Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. *Epidemiology*, 22, 476-85.
- SCHUMANN, C. M. & NORDAHL, C. W. 2011. Bridging the gap between MRI and postmortem research in autism. *Brain Res*, 1380, 175-86.
- SCHWARCZ, R., BRUNO, J. P., MUCHOWSKI, P. J. & WU, H. Q. 2012. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci*.
- SHULHA, H. P., CHEUNG, I., WHITTLE, C., WANG, J., VIRGIL, D., LIN, C. L., GUO, Y., LESSARD, A., AKBARIAN, S. & WENG, Z. 2012. Epigenetic signatures of autism: trimethylated H3K4 landscapes in prefrontal neurons. *Arch Gen Psychiatry*, 69, 314-24.
- SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*, 55, 325-95.
- SIMONOFF, E., PICKLES, A., CHARMAN, T., CHANDLER, S., LOUCAS, T. & BAIRD, G. 2008. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 47, 921-9.
- SIVERTSEN, B., POSSERUD, M. B., GILLBERG, C., LUNDERVOLD, A. J. & HYSING, M. 2012. Sleep problems in children with autism spectrum problems: a longitudinal population-based study. *Autism*, 16, 139-50.
- SOLMAZ, I., GURKANLAR, D., GOKCIL, Z., GOKSOY, C., OZKAN, M. & ERDOGAN, E. 2009. Antiepileptic activity of melatonin in guinea pigs with pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurol Res*, 31, 989-95.
- SOMPOL, P., LIU, X., BABA, K., PAUL, K. N., TOSINI, G., IUVONE, P. M. & YE, K. 2011. N-acetylserotonin promotes hippocampal neuroprogenitor cell proliferation in sleep-deprived mice. *Proc Natl Acad Sci US A*, 108, 8844-9.
- SORIA, V., MARTINEZ-AMOROS, E., ESCARAMIS, G., VALERO, J., CRESPO, J. M., GUTIERREZ-ZOTES, A., BAYES, M., MARTORELL, L., VILELLA, E., ESTIVILL, X., MENCHON, J. M., GRATACOS, M. & URRETAVIZCAYA, M. 2010. Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. *J Pineal Res*, 49, 35-44.
- ST POURCAIN, B., WANG, K., GLESSNER, J. T., GOLDING, J., STEER, C., RING, S. M., SKUSE, D. H., GRANT, S. F., HAKONARSON, H. & DAVEY SMITH, G. 2010. Association between a high-risk autism locus on 5p14 and social communication spectrum phenotypes in the general population. *Am J Psychiatry*, 167, 1364-72.
- STATE, M. W. & LEVITT, P. 2011. The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience*, 14, 1499-1506.
- SUDHOF, T. C. 2008. Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455, 903-11.
- SUZUKI, K., MATSUZAKI, H., IWATA, K., KAMENO, Y., SHIMMURA, C., KAWAI, S., YOSHIHARA, Y., WAKUDA, T., TAKEBAYASHI, K., TAKAGAI, S., MATSUMOTO, K., TSUCHIYA, K. J., IWATA, Y., NAKAMURA, K., TSUJII, M., SUGIYAMA, T. & MORI, N. 2011. Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One*, 6, e20470.
- SZATMARI, P., PATERSON, A. D., ZWAIGENBAUM, L., ROBERTS, W., BRIAN, J., LIU, X. Q., VINCENT, J. B., SKAUG, J. L., THOMPSON, A. P., SENMAN, L., FEUK, L., QIAN, C., BRYSON, S. E., JONES, M. B., MARSHALL, C. R., et al. 2007. Mapping

- autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*, 39, 319-28.
- TABUCHI, K., BLUNDELL, J., ETHELTON, M. R., HAMMER, R. E., LIU, X., POWELL, C. M. & SUDHOF, T. C. 2007. A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science*, 318, 71-6.
- TAMADA, K., TOMONAGA, S., HATANAKA, F., NAKAI, N., TAKAO, K., MIYAKAWA, T., NAKATANI, J. & TAKUMI, T. 2010. Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling. *PLoS One*, 5, e15126.
- TAYA, S., SHINODA, T., TSUBOI, D., ASAKI, J., NAGAI, K., HIKITA, T., KURODA, S., KURODA, K., SHIMIZU, M., HIROTSUNE, S., IWAMATSU, A. & KAIBUCHI, K. 2007. DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci*, 27, 15-26.
- TAYLOR, B., MILLER, E., FARRINGTON, C. P., PETROPOULOS, M. C., FAVOT-MAYAUD, I., LI, J. & WAIGHT, P. A. 1999. Autism and measles, mumps, and rubella vaccine: no epidemiological evidence for a causal association. *Lancet*, 353, 2026-9.
- TIAN, Q. 2006. Proteomic exploration of the Wnt/beta-catenin pathway. *Curr Opin Mol Ther*, 8, 191-7.
- TIERNEY, E., BUKELIS, I., THOMPSON, R. E., AHMED, K., ANEJA, A., KRATZ, L. & KELLEY, R. I. 2006. Abnormalities of cholesterol metabolism in autism spectrum disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B, 666-8.
- TOMA, C., ROSSI, M., SOUSA, I., BLASI, F., BACCHELLI, E., ALEN, R., VANHALA, R., MONACO, A. P., JARVELA, I. & MAESTRINI, E. 2007. Is ASMT a susceptibility gene for autism spectrum disorders? A replication study in European populations. *Mol Psychiatry*, 12, 977-9.
- TORDJMAN, S., ANDERSON, G. M., PICHARD, N., CHARBUY, H. & TOUITOU, Y. 2005. Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. *Biol Psychiatry*, 57, 134-8.
- TORO, R., KONYUKH, M., DELORME, R., LEBLOND, C., CHASTE, P., FAUCHEREAU, F., COLEMAN, M., LEBOYER, M., GILLBERG, C. & BOURGERON, T. 2010. Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet*, 26, 363-72.
- TOYO-OKA, K., SHIONOYA, A., GAMBELLO, M. J., CARDOSO, C., LEVENTER, R., WARD, H. L., AYALA, R., TSAI, L. H., DOBYNS, W., LEDBETTER, D., HIROTSUNE, S. & WYNshaw-BORIS, A. 2003. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet*, 34, 274-85.
- TYCE, G. M. 1990. Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol*, 16 Suppl 3, S1-7.
- VAN DER HEIJDEN, K. B., SMITS, M. G. & GUNNING, W. B. 2005. Sleep-related disorders in ADHD: a review. *Clin Pediatr (Phila)*, 44, 201-10.
- VEENSTRA-VANDERWEELE, J. & COOK, E. H., JR. 2004. Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*, 9, 819-32.
- VEENSTRA-VANDERWEELE, J., MULLER, C. L., IWAMOTO, H., SAUER, J. E., OWENS, W. A., SHAH, C. R., COHEN, J., MANNANGATTI, P., JESSEN, T., THOMPSON, B. J., YE, R., KERR, T. M., CARNEIRO, A. M., CRAWLEY, J. N., SANDERS-BUSH, E., MCMAHON, D. G., RAMAMOORTHY, S., DAWS, L. C., SUTCLIFFE, J. S. & BLAKELY, R. D. 2012. Autism gene variant causes hyperserotonemia, serotonin receptor hypersensitivity, social impairment and repetitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 5469-74.

- VOINEAGU, I., WANG, X., JOHNSTON, P., LOWE, J. K., TIAN, Y., HORVATH, S., MILL, J., CANTOR, R. M., BLENCOWE, B. J. & GESCHWIND, D. H. 2011. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474, 380-4.
- WAKEFIELD, A. J., MURCH, S. H., ANTHONY, A., LINNELL, J., CASSON, D. M., MALIK, M., BERELOWITZ, M., DHILLON, A. P., THOMSON, M. A., HARVEY, P., VALENTINE, A., DAVIES, S. E. & WALKER-SMITH, J. A. 1998. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet*, 351, 637-41 [Retracted].
- WALTERS, J. T. & OWEN, M. J. 2007. Endophenotypes in psychiatric genetics. *Mol Psychiatry*, 12, 886-90.
- WALTERS, R. G., JACQUEMONT, S., VALSESIA, A., DE SMITH, A. J., MARTINET, D., ANDERSSON, J., FALCHI, M., CHEN, F., ANDRIEUX, J., LOBBENS, S., DELOBEL, B., STUTZMANN, F., EL-SAYED MOUSTAFA, J. S., [...] & BECKMANN, J. S. 2010. A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature*, 463, 671-5.
- WANG, K., ZHANG, H., MA, D., BUCAN, M., GLESSNER, J. T., ABRAHAMS, B. S., SALYAKINA, D., IMIELINSKI, M., BRADFIELD, J. P., SLEIMAN, P. M., KIM, C. E., HOU, C., FRACKELTON, E., CHIAVACCI, R., TAKAHASHI, N., [...] & HAKONARSON, H. 2009. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*, 459, 528-33.
- WARREN, Z., MCPHEETERS, M. L., SATHE, N., FOSS-FEIG, J. H., GLASSER, A. & VEENSTRA-VANDERWEELE, J. 2011. A systematic review of early intensive intervention for autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 127, e1303-11.
- WEGIEL, J., SCHANEN, N. C., COOK, E. H., SIGMAN, M., BROWN, W. T., KUCHNA, I., NOWICKI, K., IMAKI, H., MA, S. Y., MARCHI, E., WIERZBA-BOBROWICZ, T., CHAUHAN, A., CHAUHAN, V., COHEN, I. L., LONDON, E., FLORY, M., LACH, B. & WISNIEWSKI, T. 2012. Differences between the pattern of developmental abnormalities in autism associated with duplications 15q11.2-q13 and idiopathic autism. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71, 382-97.
- WEISS, L. A., ABNEY, M., COOK, E. H., JR. & OBER, C. 2005. Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *Am J Hum Genet*, 76, 33-41.
- WEISS, L. A., SHEN, Y., KORN, J. M., ARKING, D. E., MILLER, D. T., FOSSDAL, R., SAEMUNDSEN, E., STEFANSSON, H., FERREIRA, M. A., GREEN, T., PLATT, O. S., RUDERFER, D. M., WALSH, C. A., ALTSHULER, D., CHAKRAVARTI, A., TANZI, R. E., STEFANSSON, K., SANTANGELO, S. L., GUSELLA, J. F., SKLAR, P., WU, B. L. & DALY, M. J. 2008. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*, 358, 667-75.
- WEISS, L. A., VEENSTRA-VANDERWEELE, J., NEWMAN, D. L., KIM, S. J., DYTCH, H., MCPEEK, M. S., CHENG, S., OBER, C., COOK, E. H., JR. & ABNEY, M. 2004. Genome-wide association study identifies ITGB3 as a QTL for whole blood serotonin. *Eur J Hum Genet*, 12, 949-54.
- WEISS, L. A., ARKING, D. E. ; GENE DISCOVERY PROJECT OF JOHN HOPKINS & THE AUTISM CONSORTIUM, DALY, M. J. & CHAKRAVARTI, A. 2009. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*. 461, 802-8.
- WEISS, M. D., WASDELL, M. B., BOMBEN, M. M., REA, K. J. & FREEMAN, R. D. 2006. Sleep hygiene and melatonin treatment for children and adolescents with ADHD and initial insomnia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 45, 512-9.
- WHEELWRIGHT, S., AUYEUNG, B., ALLISON, C. & BARON-COHEN, S. 2010. Defining the broader, medium and narrow autism phenotype among parents using the Autism Spectrum Quotient (AQ). *Mol Autism*, 1, 10.
- WILLIAMS, N. M., ZAHARIEVA, I., MARTIN, A., LANGLEY, K., MANTRIPRAGADA, K., FOSSDAL, R., STEFANSSON, H., STEFANSSON, K., MAGNUSSON, P.,

- GUDMUNDSSON, O. O., GUSTAFSSON, O., HOLMANS, P., OWEN, M. J., O'DONOVAN, M. & THAPAR, A. 2010. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet*, 376, 1401-8.
- WILLS, S., CABANLIT, M., BENNETT, J., ASHWOOD, P., AMARAL, D. G. & VAN DE WATER, J. 2009. Detection of autoantibodies to neural cells of the cerebellum in the plasma of subjects with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*, 23, 64-74.
- WING, L. 1981. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol Med*, 11, 115-129.
- WULFF, K., DIJK, D. J., MIDDLETON, B., FOSTER, R. G. & JOYCE, E. M. 2012. Sleep and circadian rhythm disruption in schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 200, 308-16.
- YASUDA, S., LIU, M. Y., SUIKO, M., SAKAKIBARA, Y. & LIU, M. C. 2007. Hydroxylated serotonin and dopamine as substrates and inhibitors for human cytosolic SULT1A3. *J Neurochem*, 103, 2679-89.

