Recherche de gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaires

Aude Nicolas

▶ **To cite this version:**

Aude Nicolas. Recherche de gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0095 . tel-01124049

HAL Id: tel-01124049
https://theses.hal.science/tel-01124049

Submitted on 6 Mar 2015

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-EST

ECOLE DOCTORALE SCIENCES de la VIE et de la SANTE

Thèse de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée par

Aude NICOLAS

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris-Est

RECHERCHE DE GENES DE VULNERABILITE AUX TROUBLES BIPOLAIRES

Thèse dirigée par Monsieur le Docteur Stéphane JAMAIN
et co-dirigée par Madame le Professeur Marion LEBOYER

Thèse soutenue le 14 décembre 2011 devant le jury composé de :

Professeur Marion Leboyer	**Présidente du Jury**
Professeur Bruno GIROS	**Rapporteur**
Professeur Pierre-Michel LLORCA	**Rapporteur**
Docteur Stéphane JAMAIN	**Directeur de thèse**

Il y a une souffrance, une jubilation, une solitude et une terreur propres à ce type de folie. Dans les envolées, c'est fantastique. Les idées et les émotions fusent à la vitesse des étoiles filantes. On les suit, on les lâche, on en trouve de meilleures qui brillent encore plus. La timidité s'en va, les mots et les gestes exacts vous viennent à point nommé. Le pouvoir de captiver les autres est une certitude intérieure. On trouve de l'intérêt aux gens inintéressants. La sensualité est omniprésente, comme est irrésistible le désir de séduire et d'être séduit. Une impression de facilité, d'intensité, de puissance, de bien-être, d'opulence et d'euphorie vous gagne jusqu'à la moelle.
Et puis soudain ça change. Les idées folles sont trop nombreuses et vont trop vite. La lucidité fait place à une confusion accablante. La mémoire disparaît. Sur le visage des amis, l'inquiétude remplace l'amusement et la fascination. Tout ce qui marchait tout seul va maintenant à contre-courant - on devient irritable, mauvais, craintif, insupportable, totalement égaré dans les plus sombres cavernes de l'esprit. On n'était pas au courant de l'existence de ces cavernes. Et cela n'a pas de fin, la folie creusant elle-même sa demeure. Ça continue de plus belle et, bientôt, comme la manie vous fait au moins la grâce d'effacer partiellement les souvenirs, vos comportements stériles, frénétiques et incongrus n'existent plus que dans la mémoire des autres. Et ensuite ? Après les médicaments, le psychiatre, le désespoir, la dépression, l'overdose ? Tout le fatras de sentiments à trier. Qui est trop poli pour dire quoi ? Qui sait quoi ? Qu'est-ce que j'ai fait ? Pourquoi ? Et (plus obsédant) quand cela va-t-il recommencer ? Ensuite, aussi, viennent les désolants pense-bêtes médicaments à prendre, à refuser, à oublier, à prendre, à refuser, à oublier, mais toujours à prendre. Les cartes de crédit supprimées, les explications à fournir au travail, les excuses à formuler, les souvenirs intermittents (mais qu'est-ce que j'ai fait ?), l'amitié perdue ou lassée, un mariage détruit. Et toujours : quand cela va-t-il recommencer ? Lesquels de mes sentiments sont vrais ? Quel moi est moi ? Le moi brut, impulsif, chaotique, débordant d'énergie, complètement marteau ? Ou le moi timide, renfermé, désespéré, suicidaire, défaitiste et exténué ? Sans doute un peu des deux, en espérant ni l'un ni l'autre. Virginia Woolf a tout dit de ses propres montées et descentes vertigineuses : « Dans quelle mesure nos sentiments naissent-ils du vide sur lequel nous vivons ? Qu'y a-t-il de réel en tout cela ? »

De l'exaltation à la dépression, Kay Jamison

Remerciements

Je remercie le Professeur Marion Leboyer de m'avoir acceptée dans son laboratoire prestigieux de psychiatrie génétique et d'avoir co-encadré cette thèse. Je la remercie de ces conseils, de m'avoir guidée et aidée pour finir cette thèse. Je la remercie d'avoir accepté d'être présidente du jury, malgré son emploi du temps très chargé.

Je remercie le Docteur Stéphane Jamain, pour la formation par la recherche qu'il m'a donnée et pour nos réflexions scientifiques. Je le remercie aussi de son exigence, grâce à lui et cette première expérience professionnelle, j'ai appris à mieux me connaître et j'ai pris conscience du fonctionnement du monde professionnel.

Je remercie les Professeurs Pierre-Michel Llorca et Brunos Giros, d'avoir accepté de juger ce travail, dans des conditions d'urgence déplorables. J'en suis profondément désolée et je m'en excuse.

Je remercie le Directeur d'école doctorale, le Professeur Alain Berdeaux pour son précieux soutien.

Je remercie aussi les membres de l'équipe 15, pour leur aide. Je pense à Bruno Etain pour la partie clinique de cette thèse et pour ces résultats de thèse. Je remercie Jasmine Deshommes et Anaïs Gombert pour les ADN, Norah Zidane, Lucie Chevallier et Annabelle Henrion pour leur contribution à ces travaux et Anne Dumaine, Flavie Mathieu, Mohammed Lajnef, Mohammed Mustapha, Laëtitia Frankel, Tiffany, Boris pour leur contribution aux travaux du laboratoire. Je les remercie aussi tous pour leur agréable compagnie. Je remercie aussi les psychiatres de l'équipe.

Je remercie les membres de la plateforme de génomique : Bruno Costes et Natacha Martin. L'équipe 9 (Flavia, Jeanine, Marie-Lyne, Christelle, Tiphanie, Marion, Céline) pour le partage des locaux, des produits de culture cellulaire et leur compagnie. Je remercie aussi les membres de l'équipe 11 : Pascale, Alexandre, Loïc, Yuri, Laure, Alix, Agathe et Nicole pour leur précieuse aide en génétique, en culture cellulaire et biologie moléculaire, leur disponibilité, leur conseils.

Je remercie aussi Véronique Pingault, qui m'a donné l'opportunité d'une première expérience en enseignement dans des conditions idéales.

Je remercie les membres du comité Codopodo et notre super secrétaire pour leur soutien, leur aide, leur compagnie et nos conversations passionnantes du midi. Je remercie mes amis et particulièrement Alice, Naïke, François, Josselin, Loïc, Hani, Arounie, Emilie, pour leur soutien et leurs encouragements.

Je remercie ma famille qui m'a portée pendant toutes ces années.

Enfin, je remercie les patients et leur famille.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ANKS1B : *ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B* (NM_181670)

ARHGEF3 : *rho guanine nucleotide exchange factor 3* (NM_001128615)

ARNm : Acide Ribonucléique messager

BP : Troubles bipolaires

CDH8 : *cadherin-8 preproprotein* (NM_001796)

CACNA2D3 : voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-3 (NM_018398)

CADPS : calcium-dependent secretion activator isoform 1 (NM_003716)

CAST : *cytomatricix protein p110*

cM : centiMorgan

CNV : *Copy Number Variation*

Ct : *Cycle number Threshold*

Ddl : degrée de liberté

DGV : *Database of Genomic Variants*

DSM-IV : *Diagnostic Statistical Manual* (version 4)

Et al : et alii

ERBB4 : *receptor tyrosine-protein kinase erbB-4 isoform JM-a/CVT-1 precursor*

GPHN : Gephyrin

GWAS : *Genome Wide Association Study* (étude d'association pangénomique)

GABARAPL1: *gamma-aminobutyric acid receptor-associated* (NM_031412)

GSMA : *Genom Scan Meta analysis*

HRM : *High Melting Curve*

Kb : kilobase

KO : knock out

LINGO2 : *leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing nogo receptor-interacting protein 2 precursor* (NM_152570)

LOD Score : *logarithm of the odds*

MAF : *Minor Allele Frequency*

MLS : Maximum Likelihood Score

NPL : Non Parametric Lodscore

NRXN1 : Neurexin 1

PLCXD3 : Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3

PLEKHA5 : Pleckstrin Homology Domain-Containing Protein, Family A , Member 5

Pb : paire de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PXK : PX domain-containing protein kinase-like protein (NM_017771)

SCA : troubles schizoaffectifs

TB : Trouble Bipolaire

SNAP25 : Synaptosomal-Associated Protein, 25-kD (OMIM600322)

SYNPR : Synaptoporin (NM_001130003)

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

TBDP : Trouble Bipolaire à Début Précoce

UCSC : *University of Santa Cruz*

UP : dépression unipolaire

Résumé

Affectant plus de 1% de la population, les troubles bipolaires constituent l'une des maladies mentales les plus fréquentes, sévères et dévastatrices. Ces troubles de l'humeur se caractérisent par une alternance d'épisodes maniaques (humeur exaltée, euphorie, irritabilité) et d'épisodes dépressifs, entrecoupés de phases de rémission. Malgré une composante génétique démontrée, les études génétiques peinent à identifier des gènes de vulnérabilité à cause de facteurs environnementaux et d'une hétérogénéité génétique, sous-tendue par une forte hétérogénéité clinique.

Une analyse de liaison sur l'ensemble du génome de 87 paires de germains atteints de trouble bipolaire à début précoce, sous-groupe cliniquement homogène de patients, a révélé des liaisons suggestives avec les régions chromosomiques 3p14 et 20p12. Un variant fonctionnel dans le promoteur du gène *SNAP25*, situé en 20p12, est associé au trouble bipolaire à début précoce. Ce gène code une protéine essentielle à la libération de neurotransmetteurs. Nous avons étudié 2 gènes candidats à la vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce, localisés dans la région 3p14, *SYNPR* et *CADPS*, codant des partenaires de *SNAP25*. Nous avons identifié des mutations non-synonymes et une délétion dans *CADPS*, chez 4,5% des patients, suggérant son implication dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires et suggérant une hétérogénéité génétique.

Une recherche de micro-remaniements chromosomiques a identifié sept nouveaux gènes candidats aux troubles bipolaires : *NRXN1*, *LINGO2*, *CDH8*, *ANKS1b*, *GPHN*, *PLCXD3* et *GABARAPL1*. Les protéines codées sont impliquées dans la transmission synaptique.

Ces résultats font concevoir une modification de la fonction synaptique dans la vulnérabilité génétique des troubles bipolaires. Ces études permettront, à plus long terme, une meilleure compréhension de la physiopathologie des troubles bipolaires et peut-être d'identifier des biomarqueurs de ces troubles. Elles devraient également permettre d'ouvrir de nouvelles voies d'exploration pour les stratégies thérapeutiques.

Mots-clés : troubles bipolaires, génétique, trouble bipolaire à début précoce, 3p14, *SYNPR*, *CADPS*, *PLCXD3*, synapse.

Abstract

Bipolar Affective Disorder (BPAD) is a common, severe and fatal psychiatric disease, affecting approximately 1% of general population. Despite a demonstrated genetic component, genetic studies have difficulties in identifying vulnerability genes, because of environnemental effects, clinic heterogenity and genetic heterogeneity. We performed a linkage study in 87 sib-pairs with early-onset bipolar affective disorder type I probands, which reported suggestive linkage in 3p14 and 20p12. Functional variant in *SNAP25* promotor, located in 20p12 is associated with early-onset BPAD. This gene encodes essential protein implicated in neurotransmitters release. We studied two candidate genes for vulnerability to BPAD, *SYNPR* and *CADPS*, located in 3p14, encoding SNAP25 cellular partners. We reported patient-specific non-synonymous variants and a 9kb coding deletion in 4,5% of patients, for *CADPS* gene, suggesting its implication in vulnerability to BPAD. We enlarged these findings by genome wide search for Copy Number Variants. We choosed 7 variants affecting synaptic genes: *NRXN1*, *LINGO2*, *CDH8*, *ANKS1b*, *GPHN*, *PLCXD3* and *GABARAPL1* as new candidate genes for BPAD. These findings suggested a modified synaptic function in bipolar patients. These studies would allowed a better understanding of pathophysiology of bipolar affective disorder and could open new ways of diagnostic, preventive and therapeutic strategies.

Keywords : bipolar affective disorder, early-onset, 3p14, *SYNPR*, *CADPS*, *PLCXD3*, synaptic genes.

Sommaire

Remerciements 3
Abréviations 4
Chapître I : Introduction 10
Les troubles bipolaires 10
La génétique des troubles bipolaires 11
a. Mise en évidence d'une composante génétique 11
b. Identification des gènes impliqués dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires 15
Objectif de la thèse : trouver des gènes de vulnérabilité aux TB 40
Chapître II : Matériels et Méthodes 42
Population étudiée 42
Les échantillons de cerveaux 43
Biologie moléculaire 43
a. Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) 43
b. Purification du produit de PCR 44
c. Réaction de séquence 44
d. Purification du produit de la réaction de séquence 44
e. Séquençage 44
f. Génotypage individuel 45
g. Recherche de polymorphisme par HRM 46
h. Etude transcriptionnelle 47
i. Recherche de CNV 48
Clonage 49
Culture cellulaire 50
a. Protocole de transfection, plaque 6 puits, cellules COS, Lipofectamine 2000 50
b. Western Blot 52
c. Immunocytochimie avec anticorps secondaire fluorescent 53
Chapître III : Etude de la région 3p14 55
La région 3p14 55
a. La liaison de la région 3p14 aux troubles bipolaires 55
b. Recherche de rares micro-remaniements chromosomiques dans la région 3p14 60
c. Recherche de variants fréquents associés aux troubles bipolaires dans la région 3p14 62
SYNPR 64
a. Recherche de variants dans SYNPR 65
b. Etude d'association avec les SNP identifies lors du séquençage 69
c. Etude d'expression 71
CADPS 73
a. Recherche de microremaniements chromosomiques dans *CADPS* 73
b. Recherche de mutations dans *CADPS* 74
c. Variants dans CADPS = variants de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce? 80
d. Etudes fonctionnelles 83
Chapître IV : Recherche de CNV sur l'ensemble du génome 85
Etude d'association pangénomique 85
Sélection des variants rares à étudier 88

Recherche de mutations dans *PLCXD3* 92
Retour à la clinique 95
a. Genre 95
b. Prévalences 95
c. Caractéristiques cliniques 96
Chapître IV : Discussion générale et perspectives 101
Implication des gènes étudiés dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires 101
Implications cliniques 110
Implication des modèles génétiques des troubles bipolaires 114
Chapître V : Conclusion 117
Chapître VI : Bibliographie 119
Chapître VII : Annexe 1 138
Annexe1 : Projet FRM 138

Chapître I : Introduction

Les troubles bipolaires

Les troubles bipolaires (TB) se caractérisent par une alternance d'épisodes thymiques dépressifs, mixtes ou (hypo)maniaques entrecoupés de périodes de rémission à priori asymptomatiques. Il s'agit d'une maladie chronique qui débute classiquement chez l'adulte jeune.

Les troubles bipolaires font partie des dix maladies les plus invalidantes, en nombre d'années de vie perdues (par décès prématuré) et/ou vécues avec un handicap (Rouillon *et al.*, 2005). Ils touchent environ 1% de la population, conduisent à une surmortalité suicidaire et non-suicidaire (Osby *et al.*, 2001) et sont à l'origine d'un dysfonctionnement social chez deux tiers des patients (Suppes *et al.*, 2001). De fait, les répercussions de cette maladie chroniques sur la qualité et la durée de vie des patients sont sévères. Au-delà d'une description clinique fine et stable dans le temps, une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie apparaît nécessaire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'étiologie des troubles bipolaires repose en partie sur des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux (Leboyer *et al.*, 2005). Les arguments étayant cette hypothèse s'appuient sur l'agrégation familiale, avec un risque de développer la maladie chez un apparenté de premier degré dix fois supérieur au risque de la population générale(McGuffin *et al.*, 1989), et sur les études de jumeaux qui montrent de manière constante une concordance plus forte chez les monozygotes que chez les dizygotes (McGuffin *et al.*, 2003). De plus les études d'adoption décrivent une plus grande fréquence de troubles bipolaires chez les parents biologiques comparés aux parents adoptifs de patients bipolaires (Mendlewicz *et al.*, 1977). Les facteurs environnementaux les mieux décrits sont les traumatismes pendant l'enfance (Etain *et al.*, 2008), la perturbation des rythmes circadiens, (Ellicott *et al.*, 1990), (Frank *et al.*, 2005).

La présente thèse s'inscrit dans la recherche, menée depuis plusieurs décennies, de facteurs de vulnérabilité génétiques aux troubles bipolaires. Puisque la composante génétique était évidente, les études génétiques qui ont suivi se sont concentrées à identifier ces facteurs

génétiques de vulnérabilité. Plus de 345 études génétiques ont vu le jour, dont 97 études de liaisons et 248 études d'associations. Ces études se sont heurtées à la complexité génétique de la pathologie. Cette complexité est d'autant plus grande que la pathologie est hétérogène cliniquement. A l'exemple de la maladie d'Alzheimer, du cancer du sein, nous avons identifié un sous-groupe de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce, qui présente une atteinte clinique plus sévère accompagnée d'une plus grande agrégation familiale. Le mode de transmission au sein de ces familles correspond à celui d'un locus majeur. Cette thèse s'intéressera plus particulièrement à l'identification de facteurs de vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires à début précoce. Pour ce faire, nous avons usé de différentes stratégies. La première est une approche gène candidat positionnel, au cours de laquelle, les gènes *SYNPR* et *CADPS* ont été analysés. La deuxième est une recherche de micro-remaniements chromosomiques sur génome entier. La dernière correspond à une étude d'association sur génome entier. Chacune de ces approches ont montré des résultats positifs qui nécessitent d'être approfondis et répliqués. Ces données confirment donc l'utilisation du sous-groupe homogène de patients atteints de trouble bipolaire à début précoce dans les études d'identifications de facteurs de vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires. Grâce à ces travaux, la physiopathologie des troubles bipolaires pourrait être mieux comprise et pourraient, à moyen terme, aider au diagnostic, à la prévention et au soin.

La génétique des troubles bipolaires

a. Mise en évidence d'une composante génétique

Agrégation familiale

Les études familiales ont été nombreuses dans les troubles bipolaires. L'étude de la concentration de la pathologie au sein de familles a montré que le risque relatif d'un apparenté était supérieur à 1, suggérant une agrégation familiale. Ce risque relatif est variable d'une étude à l'autre, puisque la prévalence de la maladie au sein des apparentés de 1er degré fluctue de 1,5% (Winokur *et al.*, 1982) à 18,7% (Mendlewicz *et al.*, 1980). Ces fluctuations sont liées à des critères diagnostiques variables (Research Diagnostic Criteria, DSM-II-IV), des tailles de populations de patients et de leurs apparentés parfois petites. La prévalence de la maladie chez les apparentés de 1er degré a été estimée à 10% (Mortensen *et al.*, 2003). En 2009,

Lichtenstein et al. (Lichtenstein *et al.*, 2009) publiaient une étude suédoise reliant les données de registres multi-générationnel et d'hospitalisations de 1973 à 2004, soit les données 40487 patients bipolaires et de leurs apparentés. Ils ont montré que le risque relatif d'un enfant était de 6,4 (intervalle de confiance à 95% : 5,9-7,1), d'un germain était de 6,9 (intervalle de confiance : 7,1-8,8) et d'un demi-germain partageant la mère était de 4,4 (intervalle de confiance : 2,7-7,4) et d'un demi-germain partageant le père était de 2,4 (intervalle de confiance : 1,4-4,1). Le risque relatif des 1/2 germains paternels est diminué de moitié comparé au risque relatif de 1/2 germains maternels. La fausse paternité peut expliquer une petite part de cette différence, mais ce résultat pourrait sous-tendre une composante environnementale et/ou une composante génétique mitochondriale ou soumise à l'empreinte parentale. Ainsi cette grande étude a confirmé l'agrégation familiale reportée dans les nombreuses études précédemment réalisées dans les troubles bipolaires.

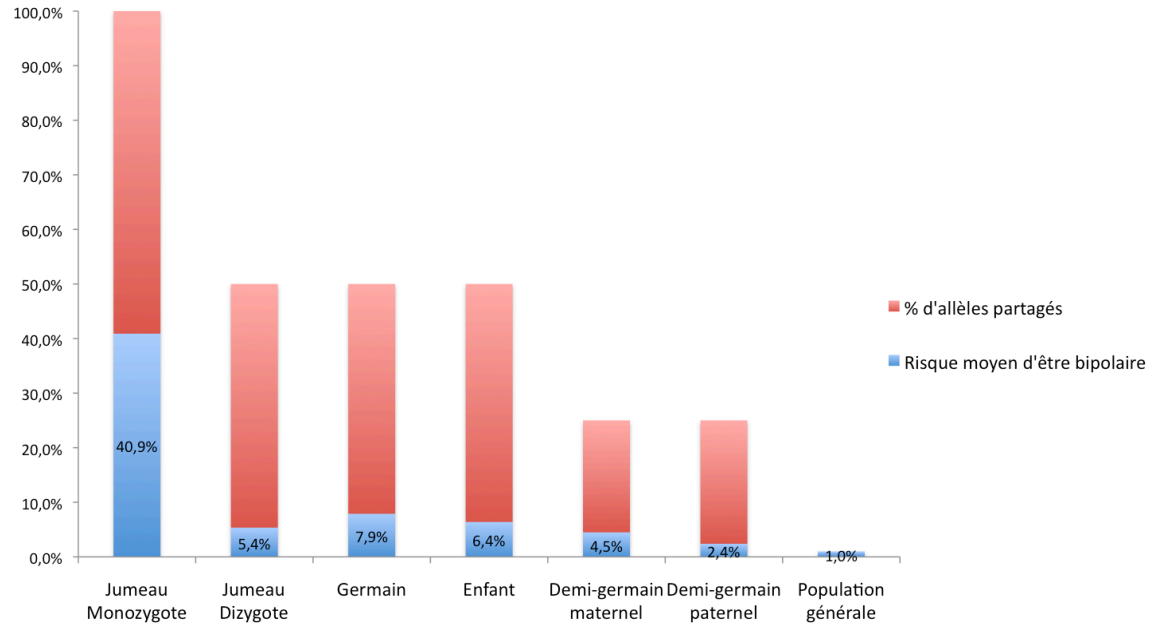

Figure I.1 : Incidence des troubles bipolaires de type I chez les apparentés d'individus bipolaires de type I. Résultats combinés des différentes études génétiques publiées à ce jour.

Etude de jumeaux

Les différentes études de jumeaux convergent vers des conclusions similaires, malgré des chiffres variables. A savoir qu'il existe une composante environnementale puisque le taux de concordance des jumeaux monozygotes est inférieur à 100%. Le taux de concordance des jumeaux monozygotes (20-75%) est supérieur à celui des jumeaux monozygotes (0-11,1%), il semblerait donc qu'il existe une composante génétique à ces troubles. Cette composante a été quantifiée grâce au calcul de l'héritabilité. L'héritabilité est définie comme la part de la

variance phénotypique liée aux facteurs génétiques. Elle s'exprime comme suit : h^2=(% MZ concordants-%DZ concordants)/(100-%DZ concordants) et est estimée à environ 80% dans les troubles bipolaires. Les études de jumeaux ont par ailleurs, testé différents modèles étiologiques. Le modèle environnement spécifique et le modèle environnement commun et spécifique ont été exclus, contrairement aux modèles génétique + environnement spécifique ou génétique + environnement spécifique et commun. Les facteurs de risque environnementaux sont méconnus, quelques uns sont toutefois relatés dans la littérature tels que les complications obstétricales -controversées puisque d'après l'étude de Kieseppä (Kieseppa *et al.*, 2004), il n'existe pas de différence significative de complications postnatales entre les proposants et leur jumeau- les infections prénatales ou durant la petite enfance et les deuils précoces. Comme dans la dépression, il est possible que l'environnement prénatal, tel qu'un stress subi par la future mère gestante soit un facteur de risque à la pathologie. L'environnement prénatal (Phillips, 1993) et les composants environnementaux de l'adulte diffèrent entre les jumeaux monozygotes et les jumeaux dizygotes. Tout d'abord l'environnement prénatal, peut varier si les fœtus sont dans le même chorion et le même placenta ou non. Si les jumeaux monozygotes sont bien séparés (chorion et placenta) alors, les données seront comparables avec les jumeaux dizygotes. Sinon, les jumeaux monozygotes risquent d'avoir un environnement prénatal plus similaire que celui des jumeaux dizygotes. Le taux de concordance des jumeaux monozygotes sera supérieur à celui des jumeaux dizygotes et cette différence sera attribuée à tort à une part génétique. Pour réaliser ces études de jumeaux alors qu'il y a une suspicion de facteurs de risque prénataux comme dans le cas des troubles bipolaires, il faudrait se restreindre aux jumeaux monozygotes dichorioniques et diplacentaires. Malheureusement, aucune étude de jumeaux dans les troubles bipolaires n'a été réalisée avec ces restrictions.

Les études d'adoption

Ces études d'adoption permettent de séparer la composante génétique et la composante environnementale prénatale de la composante environnementale post-natale. Peu d'études d'adoption ont été effectuées dans les troubles bipolaires. Ces études sont limitées par la faible probabilité de recruter de telles familles et de disposer des données des parents biologiques. Ces études ont montré que la prévalence de la pathologie est supérieure chez les parents biologiques (7%) comparé aux parents adoptifs (1,8%), cette dernière étant proche de celle de la population générale (Mendlewicz *et al.*, 1977), (Wender *et al.*, 1986), (Lichtenstein *et al.*, 2009). Lichtenstein et al, ont montré que le risque relatif d'un adopté sachant que le parent

biologique est atteint et que le parent adoptif ne l'est pas est de 4,3 (intervalle de confiance : 2,0-9,5) et que le risque relatif d'un adopté sachant que le parent adoptif est atteint et que le parent biologique ne l'est pas est de 1,3 soit proche de celui de la population générale. Ces résultats montrent que l'environnement post-natal a peu d'effet sur l'étiologie des troubles bipolaires.

Les analyses de ségrégation

Les analyses de ségrégation s'intéressent à la transmission d'un phénotype au sein de familles. Elles permettent de déterminer le mode de transmission et la pénétrance du phénotype étudié. Les études de population ont montré qu'autant d'hommes que de femmes étaient atteints de trouble bipolaire. Manifestement la pathologie ne présente pas de mode de transmission monogénique liée au chromosome Y, puisque des femmes sont atteintes. Les analyses de ségrégation dans les troubles bipolaires montrent des résultats controversés et se sont heurtées à des difficultés méthodologiques. L'hétérogénéité de la maladie, BPI, BPII, les troubles schizoaffectifs, la comorbidité au sein des familles d'autres troubles psychiatriques tels que la schizophrénie, la dépression unipolaire, des addictions à l'alcool a complexifié les analyses de ségrégation. La maladie n'apparaît pas à la naissance et le diagnostique est long à établir. La composante environnementale ajoute un biais à ces études. Parmi ces études, l'analyse de (Blangero *et al.*, 1989) a montré que la ségrégation de la maladie présentait des effets familiaux complexes. D'autres études (Rice *et al.*, 1987), (Spence *et al.*, 1995) ont montré que le modèle de transmission qui correspond le mieux était un locus majeur avec un fond polygénique. Grigoroiu-Serbanescu et al, (Grigoroiu-Serbanescu *et al.*, 2001) ont confirmé ces résultats chez les patients atteints de troubles bipolaires avec un âge d'apparition des premiers symptômes < 25 ans. Paul et al, (Pauls *et al.*, 1995) ont analysé la ségrégation des troubles bipolaires au sein de 42 familles Amish de l'Ancien Ordre comprenant au total 685 apparentés. Dix neuf de ces familles partagent au moins un ancêtre commun récent, alors que les 23 autres partagent au moins un ancêtre commun plus éloigné. Si les 42 familles sont prises en compte dans l'analyse de la ségrégation, la transmission autosomique dominante est rejetée. Par contre, pour les 19 familles les plus proches, le model de transmission autosomique dominante est le plus pertinent. Lorsque les 23 autres familles sont étudiées, les modèles polygénique ou oligogénique correspondent le mieux aux observations. Il est donc probable qu'il existe plusieurs modèles de transmission mendélien et oligo(poly)génique suivant les familles avec une coexistence possible de ces différents modèles au sein d'une même famille.

Ainsi ces différentes stratégies excluent l'action exclusive de l'environnement post-natal mais convergent vers une composante génétique complexe en interaction avec l'environnement dans l'étiologie des troubles bipolaires. Du fait de ces observations, plusieurs hypothèses existent. La première : 'multiple rare variants for common diseases' et la deuxième 'common variants for common diseases'. Les études génétiques qui ont suivi, ont cherché à identifier qualitativement et quantitativement les gènes impliqués en utilisant plusieurs stratégies complémentaires : analyses de liaison, études d'association, recherches de micro-remaniements chromosomiques et études transcriptomiques et épigénétiques.

b. Identification des gènes impliqués dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires

En 2008, Serretti et Mandeli (Serretti *et al.*, 2008) synthétisaient les résultats de 345 études comprenant 97 études de liaisons et 248 études d'associations afin d'identifier des régions génomiques d'intérêt.

Analyses de liaison sur génome entier

Les analyses de liaisons permettent de localiser des régions génétiques qui pourraient contenir des gènes de vulnérabilité. Cette stratégie d'étude est utilisée pour identifier des gènes majeurs de vulnérabilité à une pathologie donnée et s'avère efficace pour les maladies mendéliennes, monogéniques et oligogéniques. Cette stratégie est donc pertinente pour tester l'hypothèse de multiples variants rares qui pourraient être impliqués dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Plus d'une centaine d'études de liaisons des troubles bipolaires sont publiées à ce jour, donnant lieux à de nombreux résultats divergents sur les régions chromosomiques impliquées. Tout d'abord, le trouble bipolaire est une pathologie complexe et hétérogène génétiquement. Elle nécessite donc un nombre de patients analysés élevé afin d'avoir suffisamment de puissance statistique pour détecter une liaison génétique. A une puissance donnée, la valeur du lod score est linéairement proportionnelle à la taille de l'échantillon. Ensuite, certaines de ces études réalisent plusieurs analyses (paramétriques et/ou non paramétriques) avec plusieurs groupes phénotypiques augmentant alors le nombre de tests statistiques et de faux positifs. Ces analyses de liaisons paramétriques supputent un mode de transmission, une valeur de pénétrance, un taux de phénocopies, alors que le mode de transmission de cette pathologie est inconnu. L'existence de grandes familles avec de

nombreux individus atteints est rare. Pour ces différentes raisons, nous nous sommes plutôt intéressés aux résultats des méta-analyses ou d'analyses de liaisons non paramétriques sur une grande population de paires de germains atteints. Cette méthode identifie les régions génétiques plus fréquemment partagées par des germains atteints que ne le voudrait le hasard, au moyen d'un calcul statistique qui est le lod score. La méthode des lod scores s'intéresse à la co-ségrégation d'un marqueur génétique avec la maladie. Kruglyak et al (Kruglyak *et al.*, 1995), (Lander *et al.*, 1995) proposèrent qu'un lod score de 3,6 avec une valeur de p de 2.10^{-5} était la valeur seuil de significativité pour une étude de paires de germains, avec un risque de 5% d'avoir des faux-positifs, ils proposèrent la valeur de 4,1 comme valeur seuil de significativité du NPL (pour Lod score Non-paramétrique) des études de germains.

Badner et Gershon ont publié en 2002 (Badner *et al.*, 2002) une méta-analyse de liaison dans le trouble bipolaire et la schizophrénie. Ils ont poolé les résultats de 11 criblages systématiques réalisés dans les troubles bipolaires (comprenant différentes populations de patients : Américains, Irlandais, Ecossais, Canadiens, Costaricains et Turques) combinant les données de familles nucléaires et multiplexes, et comptant au total 1228 patients (BPI&II : troubles bipolaires de type I&II, de troubles schizoaffectifs (SCA), de dépression unipolaire (UP)). Les auteurs ont développé une méthode d'analyse, appelée MSP pour *Multiple Scan Probability*, basée sur les valeurs de p reportées dans les analyses de liaisons publiées. Les régions chromosomiques avec une valeur de $p<0,01$ dans les 11 études, sont intégrées dans la méta-analyse. Les résultats montrent une forte évidence d'avoir des gènes impliqués dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires dans les régions 13q et 22q. Les régions 13q et 22q sont les plus liées, avec respectivement, pour une analyse unique MSP, $p=9.10^{-6}$ et $p=3.10^{-5}$. Ces deux régions sont aussi liées avec, pour les mêmes analyses, des valeurs de $p=4.10^{-4}$ et $p=2.10^{-4}$, dans leur méta-analyse réalisée à partir de 17 études de criblage systématique comptant au total 1929 patients atteints de schizophrénie.

En 2003, Segurado *et al* (Segurado *et al.*, 2003) ont sélectionné 18 études de liaisons sur génome entier comprenant au total 2589 patients atteints de BPI&II, SCA, UP et d'autres troubles de l'humeur. Les auteurs ont utilisé la méthode GSMA pour *Genom Scan Meta analysis* décrite par Wise *et al* (Wise *et al.*, 1999), pour tester la liaison de régions chromosomiques en fonction de quatre groupes phénotypiques. Cette étude utilise une méthode de classement non-paramétrique pour identifier des régions génétiques présentant un partage constamment augmenté des valeurs de p ou des LOD scores. Cette méthode classe les régions génétiques à partir des LOD scores ou des valeur de p obtenues pour chaque criblage.

Les rangs additionnés au travers des différentes études sont comparés à la probabilité d'une distribution aléatoire de ses rangs assignés. Aucune région, dans aucun modèle ne remplit les critères de significativité statistique pour génome entier. Cependant, des valeur de p<0,01 sont observées dans les régions 9p22.3-21.1 et 10q11.21-22.1 pour le groupe phénotypique BPI et SCA et 14q24.1-32.12 pour le groupe phénotypique BPI&II et SCA. Les auteurs trouvent que peu de familles (370 familles comptant au total 928 patients) ont été analysées dans la catégorie "groupe phénotypique BPI et SCA", comparé aux méta-analyses réalisées dans la schizophrénie qui montraient des valeurs de p plus significatives. Ces résultats nécessiteraient de plus grands échantillons de données. Cette étude n'a pas mis en évidence de chevauchement de régions liées aux troubles bipolaires et à la schizophrénie (groupe phénotypique très large).

McQueen *et al* (McQueen *et al.*, 2005), plutôt que d'utiliser les statistiques de liaisons et/ou les valeurs de p de chaque étude (Levinson *et al.*, 2003), se sont basés sur les génotypes de 11 criblages systématiques soit au total 5179 sujets de 1023 familles. Les auteurs ont estimé, d'après la publication de Balcanu (Bacanu, 2005), une valeur seuil de LOD score non paramétrique de liaison significative de 3,03 et une valeur seuil de liaison suggestive de 1,75. Une liaison significative en 6q (Lod Score=4,19) est trouvée pour le groupe de phénotype BPI et SCA et cette liaison est suggestive pour le groupe de phénotype BPI&II, SCA et UP (Lod score=1,74). Une autre liaison significative est trouvée en 8q pour ce même groupe phénotypique (Lod score=3,4). Des signaux de différents degrés de liaison avec le chromosome 6 ont été rapportés dans les données individuelles de cette méta-analyse et dans des échantillons indépendants. En effet, une étude danoise (Ewald *et al.*, 2002) a rapporté un LOD score maximum de 3,8 pour le marqueur proche du pic de cette méta-analyse. Segurado *et al* , ont trouvé une valeur de p<0,1, pour leur modèle de groupe phénotypique étroit dans cette région. Ils ont aussi rapporté que la région 8q pourrait contenir un locus faiblement lié aux troubles bipolaires dans leur modèle étroit (BPI&II et SCA) avec une valeur de p<0,05 *(Segurado et al., 2003)*. Enfin Badner *et al*, n'ont pas recensé de liaison ni en 6q ni en 8q (Badner *et al.*, 2002).

Badner *et al* (Badner *et al.*, 2011), ont réalisé une analyse de liaison grâce à un génotypage de plus grande densité soit 1SNP/500kb, de 972 familles soit au total 3484 sujets (2284 BPI, 498 BPII, 702 UP). Les auteurs ont réalisé des analyses de liaisons paramétriques et non paramétriques en fonction de différents groupes phénotypiques. Les résultats les plus positifs apparaissent pour la région 6q21 (Lod score non paramétrique=3,4 pour le rs1046943) et la région 9q21 (Lod score non paramétrique=3,4 pour le rs722642) en utilisant le groupe

phénotypique BPI et SCA. Ces résultats sont significatifs pour les critères de criblage systématique, mais ne résistent pas aux corrections pour analyses multiples. L'analyse de liaison paramétrique n'a pas permis d'obtenir des résultats aussi significatifs. La liaison entre la région 6q et les troubles bipolaires a aussi été identifiée dans la méta-analyse de McQueen *et al*. Cependant ces résultats ne sont pas indépendants. Des associations et des variations du nombre de copies (CNV) spécifiques de patients ont déjà été identifiées dans ces régions. Les auteurs ont par ailleurs exploré des covariables telles que l'âge d'apparition des troubles et ont trouvé des liaisons significatives à l'échelle du génome, mais qui ne résistent pas aux corrections pour le nombre de phénotypes testés. Les familles avec un âge d'apparition précoce des symptômes montrent une évidence augmentée de liaison avec le chromosome 2 à 118cM pour le groupe phénotypique BPI&II et SCA, avec un NPL de 5,18 et une valeur de p=0,0007, pour 429 familles sur 785. Notre équipe a montré une liaison, spécifique d'un sous-groupe de patients présentant un âge d'apparition précoce, pour la région 2q14, proche de 10 à 30cM (Mathieu *et al.*, 2010).

Dans l'ensemble, les résultats les plus significatifs de ces analyses de liaisons sont obtenus pour le groupe phénotypique étroit qui inclut les BPI et SCA, malgré une diminution en taille de population de patients. Ces résultats peuvent s'interpréter par un groupe plus homogène cliniquement qui sous-tend une plus faible hétérogénéité génétique. Cette diminution de l'hétérogénéité génétique est essentielle pour identifier les gènes impliqués. Ces méta-analyses ou ces analyses de liaisons pour certaines, ne sont pas indépendantes, pour d'autres, elles utilisent des méthodes d'identification différentes, il est donc difficile de comparer leurs résultats. La stratégie utilisée dans les deux dernières études présentées ici, semble la plus pertinente et nécessite des réplications. Malheureusement il sera difficile de travailler sur des populations de patients aussi grandes, l'alternative serait de réaliser une analyse de liaison sur des grandes familles en se restreignant à l'étude de patients atteints ou d'individus non atteints mais transmetteurs. Ensuite, il faudrait réduire la taille des régions liées puisque la plupart des études ont une densité d'un marqueur pour 10cM, les régions liées s'étendent donc au minimum sur 10cM. Ce fine-mapping précisera la région afin d'identifier le ou les gène(s) incriminé(s). Jusqu'à présent les analyses de liaison n'ont pas permis de trouver des régions liées probantes et consensuelles et de ce fait mettent en exergue une hétérogénéité génétique. Ces études ne permettent pas de conclure sur l'hypothèse de multiples variants rares impliqués dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. L'étude de Badner *et al* (Badner *et al.*, 2002) a montré que certaines régions sont partagées avec la schizophrénie. Ces études sont efficaces

pour trouver des gènes majeurs, mais a une puissance limitée pour détecter des gènes à effet modeste. Les études d'association sont une alternative pour identifier ces gènes à effet modéré.

Etudes d'association pangénomiques

Un nombre de polymorphismes dans une grande variété de gènes candidats a été testé en association dans les troubles bipolaires. La plupart n'ont pas montré d'association statistiquement convaincante et ceux qui ont été associés significativement, présentent des odds ratios de 1,1-1,3, qui sont cohérents avec un modèle polygénique des troubles bipolaires. Ces dernières années, le développement du design des études d'association sur l'ensemble du génome (GWAS pour *Genome-wide association study*) et le développement de méthodes d'analyses ont rendu possible la recherche de multiples variations génétiques sous-tendant la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Ces études ne supputent pas les gènes ou les régions génétiques qui pourraient porter des variations de vulnérabilité. Elles sont une alternative puissante aux analyses de liaisons qui sont souvent impuissantes à détecter des gènes de vulnérabilité à des phénotypes complexes. En novembre 2008, le NIMH listait 200 résultats différents significatifs ($p<5.10-8$) pour 59 pathologies. Certains peuvent être des faux-positifs, dûs au hasard ou à des problèmes d'ordre technique. Cependant, la plupart de ces résultats ont été répliqués dans des échantillons indépendants. Ceci confirme que des variants fréquents expliquent une part du risque génétique de ces pathologies, comme le prédisait l'hypothèse « common variants for common diseases ». Cette approche génétique a révélé plusieurs variations génétiques associées à de nombreux traits ou maladies (2007).

Grâce aux avancées techniques et à une meilleure connaissance du génome, depuis plusieurs années, il est possible de réaliser des études d'associations pangénomiques (GWAS pour Genome-Wide Association Study). A ce jour, 7 GWAS ont comparé les fréquences de variants fréquents entre des patients atteints de troubles bipolaires et des témoins en analysant des échantillons génotypés individuellement ou poolés. Le tableau 1 fait le bilan des résultats de ces différentes études d'association. Ces études se sont focalisées sur les variants les plus associés. Dans l'ensemble, peu de résultats sont en dessous du seuil de significativité $p=5.10^{-8}$ et les odds ratios s'éloignent peu de la valeur d'équilibre. Ces études se sont focalisées sur les variants les plus associés et ces variants diffèrent d'une étude à l'autre. L'étude de Ferreira publiée en 2008 (Ferreira *et al.*, 2008), a reporté que plusieurs SNP s'étendant sur une région d'environ 145kb dans et autour du gène *ANK3* étaient associés aux troubles bipolaires. En effet, leur travaux combinant plusieurs études a identifié une association significative à l'échelle du génome entier pour les SNP rs10994336 (imputé)/rs1938526 (génotypé) ;

p=9,1.10^{-9}/1,3.10^{-8} ; OR=1,45/1,395 localisés dans *ANK3*. Les deux autres associations les plus fortes dans cette étude étaient pour les variants rs2172835 (*C15Orf53*) et rs1006737 (*CACNA1C*). Les travaux de Baum *et al* (Baum *et al.*, 2008), montraient que le rs9804190, localisé dans un intron d'*ANK3*, faisait partie des 88 variants retenus qui remplissaient les critères de réplication de cette étude. Schulze *et al* (Schulze *et al.*, 2009), ont génotypé spécifiquement les rs9804190 et rs10994336 chez 1668 patients et 1604 témoins (p=3.10-6, OR=1,32 ; p= 1,7.10-5, OR=1,54). Ils n'ont pas détecté d'interaction entre ces deux variants, qui sont chacun associés indépendamment aux troubles bipolaires. Ces associations sont répliquées dans les différentes études qui ont suivi : Scott *et al* (Scott *et al.*, 2009), ont trouvé pour le rs10994336 une valeur de p=0,04, et un OR=1,37, Smith *et al* (Smith *et al.*, 2009),ont montré pour le rs1938526 une valeur de p=0,036 et un OR=1,31 et Cichon *et al* (Cichon *et al.*, 2011), répliquent l'association avec le rs9804190 avec une valeur de p=5,93 x 10^{-4}, OR=1,32 et identifié une tendance à l'association pour le rs10994336, avec une valeur de $p_{imputé}$=0,131 et un $OR_{imputé}$=1,22. Smith *et al* (Smith *et al.*, 2009), ont testé 10 SNP dans *ANK3* et aucun autre que les précédemment cités n'avait de valeur de P<0,05. Même si parfois les valeurs de p ne sont pas toujours significatives pour certaines à cause d'un problème de puissance, les valeurs des OR sont relativement constantes et plus élevées que la plupart des valeurs correspondant aux autres 'top' SNP des différentes études d'association précitées. Ces résultats convergent donc vers une association répliquée pour les variants rs9804190 et rs10994336. D'autres variants ont été testés lors d'études de réplication, comme le rs1006737 dans *CACNA1C*, mais aucun n'est autant répliqué que les variants dans *ANK3*. Cichon *et al* (Cichon *et al.*, 2011), ont montré par un GWAS, suivi de plusieurs réplications dans des échantillons indépendants et enfin une méta-analyse combinant l'ensemble de ces résultats, que le variant rs1064395 localisé dans la séquence 3'UTR de *NCAN* est significativement associé au trouble bipolaire et est répliqué (p=2,14.10-9 ; OR=1,17) dans la plupart des échantillons. Il est intéressant de noter que les fréquences d'un échantillon à l'autre peuvent beaucoup varier comme par exemple de 15 à 26% chez les patients et ces variations sont surtout importantes chez les patients puisque les fréquences varient de 14 à 21% chez les témoins. Le variant suivant les échantillons, par exemple l'échantillon russe ou l'échantillon de l'étude GAIN-EA/TGEN, n'est pas toujours associé, bien que toujours plus fréquent chez les patients et les OR dans ces cas sont très proches de 1.

Année	Auteur	Origine	Pathologie	Plate-forme	Cas (n)	Témoins (n)	Top' SNP	Localisation chromosomique	Gène le plus proche	Position dans le gène	Valeurs de p	OR
2007	WTCCC	RU	BPI et BPII Szaff	Affymetrix 500K	1868	2938	rs420259	16p12.2	PALB2	intron	6,3.10-8	2,08
2007	Baum	USA & Allemagne	BPI	Illumina 500K	1233	1439	rs1012053	13q14.11	DGKH	intron	1,5.10-8	1,59
2008	Sklar	USA RU	BPI	Affymetrics 500K or 5.0	1461	2008	rs4939921	18q21.1	MYO5B	intron	1,7.10-7	1,51
							rs1705236	12q21.1	TSPAN8	intron	6,1.10-7	0,58
2008	Baum	Méta-analyse combinant les données du WTCCC (2008) et de Baum (2008)			3101	4377	rs10791345	11q25	JAM3	intron	10-8	1,25
							rs4806874	19p13.3	SLC39A3/Zn2+transporter ZIP3	intron	5.10-8	1,2
2008	Ferreira	Méta-analyse combinant les données du WTCCC (2008), de Sklar (2008) et de Ferreira (2008)			4387	6209	rs10994336 (imputé)/rs 1938526 (génotypé)	19q21.2	ANK3	intron	9,1.10-9/1,3.10-8	1,45/1,395
							rs2172835	15q14	C15Orf53	intron	7,5.10-7	0,853
							rs1006737	12p13.33	CACNA1C	intron	7,0.10-8	1,18
2009	Scott	Méta-analyse combinant les données d'un échantillon indépendant du NIMH, de Londres,			3684	14507	rs472913	1p32.1	pas de gène		2,0.10-7	1,18
							rs1042779	3p21.1	ITIH9	Exon (nsyn)	1,8.10-7	1,19
							rs17418283	15q15	MCTP1	intron	1,3.10-7	1,21
2009	Smith	Europe	BP et Szaff	Affymetrics 702044 SNP	1001	1033	rs5907577	Xq27.1	pas de gène		1,6.10-6	1,48
		Afrique	BP et Szaff	Affymetrics 702044 SNP	345	670	rs2111504	19q13.11	DPY19L3	intron	1,5.10-6	1,74
2011	Cichon	Méta-analyse combinant les données du WTCCC, du projet GAIN·	BPI, BPII, Scaff, BP-NOS	HumanHap550v3 BeadArrays (Illumina	8441	35362	rs1064395	19p13.11	NCAN	3'UTR	2,14.10-9	1,17
							rs11764590	7q22.3	MAD1L1	intron	1,28.10-7	1,26

Tableau I.1 : bilan des études d'associations pangénomiques réalisées dans les troubles bipolaires

Tableau I.2 : Résultats des différentes études d'association réalisées pour plusieurs variants dans le gène ANK3.

Evidence d'association au locus d'ANK3 dans l'ensemble des études d'association pangénomique dans le trouble bipolaire.

GWAS précédant l'étude de Cichon					**GWAS de Cichon**	
SNP	**Echantillon**	**Etude**	**P-value**	**OR (allèle)**	**Tendance P**	**OR (allèle)**
rs10994336	WTCCC + STEP-UCL + ED-DUB-STEP2	Ferreira et al. (2008)	9,1 x 10-9	1,45 (T)	0,131 (imp)	1,22 (T)
	Allemand	Schulze et al. (2009)	0,0001	1,70 (T)		
	NIMH waves 1-4		0,112	1,39 (T)		
	NIMH waves 5		0,241	1,33 (T)		
	Méta-analyse des 3 échantillons		1,7 x 10-5	1,54 (T)		
	GSK	Scott, Muglia et al. (2009)	0,042	1,37 (n.d.)		
	GSK + NIMH waves 1-5		0,012	1,40 (n.d.)		
rs1938526	WTCCC + STEP-UCL + ED-DUB-STEP2	Ferreira et al. (2008)	1,3 x 10-8	1,40 (G)	0,0766	1,25 (G)
rs9804190	Allemand	Schulze et al. (2009)	0,0006	1,34 (C)	5,93 x 10-4	1,32 (C)
	NIMH waves 1-4		0,05	1,24 (C)		
	NIMH waves 5		0,017	1,38 (C)		
	Méta-analyse des 3 échantillons		3 x 10-6	1,32 (C)		

NIMH, National Institute of Mental Health; OR, odds ratio;n.d., non disponible; Tendance, Cochran-Armitage trend test; imp, Imputation réalisée avec MACH (version 1.0.16) résultat>95%

Pour compléter ces études génétiques, il aurait été intéressant de réaliser une étude d'expression en fonction du génotype. *NCAN* est exprimé dans les aires corticales et hippocampiques de la souris. Ce gène code la protéine Neurocan, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui serait impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire. Les souris invalidées pour le gène, ne présentent pas de défaut dans la morphologie de leur cerveau et la transmission synaptique semble normale. Cependant, la maintenance de la longue-phase de potentiation à long terme, est réduite dans la région hippocampique CA1. Ces résultats sont à approfondir pour identifier des modifications plus subtiles dans le cerveau. ANK3 est exprimé dans le cerveau et son expression est diminuée en réponse au Li^{2+}. L'Ankyrin 3, nœud de Ranvier, est une protéine adaptatrice trouvée dans le segment initial de l'axone qui régule l'assemblage des canaux sodiques voltage-dépendants. L'expression de ces gènes dans le cerveau, ainsi que la fonction des protéines encodées sont cohérents avec les critères de sélection des gènes candidats à la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

Bien que les études d'association pangénomique ont montré que les variants dans ou à proximité des gènes *ANK3* et *NCAN* sont associés significativement aux troubles bipolaires et sont répliqués. Ces variants ne rendent compte que d'une petite part de la vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires. Les variants les plus associés diffèrent d'une étude d'association pangénomique à l'autre et sous-tendent une hétérogénéité génétique.

⇒Arguments en faveur d'une composante génétique et d'une polygénicité aux troubles bipolaires

Jusqu'à présent, les méta-analyses ont montré un excès de SNP qui répliquent des associations. Par exemple Cichon *et al* (Cichon *et al.*, 2011), ont génotypé les 48 SNP associés avec une valeur de $p<0,01$, 8 étaient répliqués alors que le nombre attendu par chance était 2,4 p=2,11.10-4. De même Smith *et al* (Smith *et al.*, 2009), ont montré que dans deux échantillons indépendants, ils avaient un excès de 89/503 SNP identiques associés avec une valeur de $p<0,05$, pour des valeurs de puissance statistique >60%. Ces associations sont spécifiques des patients atteints de troubles bipolaires comme l'ont montré les études de Scott et al (Scott *et al.*, 2009) et de Smith *et al* 2011(Smith *et al.*, 2011), en comparant les données du WTCCC pour les maladies suivantes : l'hypertension, la maladie de Crohn, l'arthrose rhumatoïde, les diabètes de type 1 et 2 et la maladie des artères coronaires. En permutant le statut des individus génotypés, pour des puissances statistiques élevées, la proportion de valeurs de $p<0,05$ est inférieure à celle obtenue avec les statuts appropriés. Ainsi, il existe des

SNP associés communs aux différentes études pangénomiques, plus souvent que ne le voudrait le hasard. Grâce aux données du WTCCC, Smith *et al* (Smith *et al.*, 2011), ont montré qu'à une puissance de 60 à 80%, la proportion de SNP qui ont une valeur de $p<0,05$ est la plus élevée pour les SNP proches des exons associés dans la même direction. Ces variants pourraient avoir un effet sur la régulation des gènes avoisinant. Ces résultats vont dans le sens d'une composante génétique aux troubles bipolaires, d'une hétérogénéité génétique et d'une polygénicité.

D'autres arguments sont en faveur d'une polygénicité et de modèles génétiques plus complexes dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Les différentes études d'associations pangénomiques ont impliqué différents variants à différents loci rarement répliqués.

Baum *et al* (Baum *et al.*, 2008), ont voulu savoir si des loci particuliers influençaient plus que d'autres le risque d'avoir un trouble bipolaire. Ils ont testé des combinaisons de 2 à 3 loci à partir de 37 SNP génotypés individuellement sur les 88 SNP qui avaient une valeur de $p<0,05$ dans les échantillons allemands et du NIMH. Au total, 95 combinaisons sur 1072 étaient significatives après correction de Bonferroni, et 20% de ces combinaisons contenaient les deux SNP les plus associés de l'étude localisés dans *SORCS2* (rs10937823) et *DGKH* (rs1170191). Sur les 37 SNP, 28 étaient validés, soit 76% parmi lesquels 10, soit 36% étaient répliqués après génotypage individuel dans l'échantillon allemand. Les auteurs ont compté le nombre d'allèles à risque portés par chaque patient et chaque témoin. La proportion de patients augmente avec le nombre d'allèles à risque porté. La probabilité d'être porteur de 19 allèles à risque est presque 4 fois plus probable chez les patients que chez les témoins (prévalence ratio = 3.8, 95% CI 1.24–11.6, w2 = 20.25, $p = 6{,}8.10^{-6}$). Cette étude a détecté et répliqué l'association de plusieurs variants à plusieurs loci. Elle permet de conclure que

1) aucun variant fréquent ne semble nécessaire et suffisant pour développer la pathologie.

2) la contribution de chaque variant au risque de développer la pathologie est modeste et que ce risque augmente avec le nombre d'allèles à risque porté.

3) les gènes dans lesquels des variants sont associés et répliqués, se localisent dans des régions de liaisons aux troubles bipolaires ou à la schizophrénie. Ces résultats suggèrent que le trouble bipolaire est une maladie polygénique influencée par de nombreux variants de faible effet.

Les analyses de génotype et d'hétérogénéité, menées à bien par Ferreira *et al* (Ferreira *et al.*, 2008), ont montré que les 3 variants les plus associés de leur étude avaient un effet additif et de magnitude similaire. Ils ont aussi réalisé une recherche sur l'ensemble du génome de 2 loci afin d'identifier une relation épistatique entre les loci à effet modéré à fort. Ils ont

identifié 7 paires de régions interagissant avec une valeur de $p<5.10^{-5}$, totalisant 61 interactions. Deux régions 4p14 et 12p11 comptent 52/62 des interactions. L'interaction simple la plus forte, bien que non significative est trouvée pour les variants rs2055888 (4p14) et rs7139306 (12p11) ($p=9,34.10^{-12}$ à $1,2.10^{-12}$). Ces deux variants se localisent dans des régions intergéniques. Les résultats de ces modèles complexes sont à répliquer dans des études indépendantes pour pouvoir conclure sur ces modèles génétiques dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

Ainsi, ces larges études sur le génome entier ouvrent de nouvelles voies dans la compréhension de la physiopathologie du trouble. D'une part, les conséquences fonctionnelles des quelques variants fréquents associés et leur rôle dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires sont à investir. Et d'autre part, les résultats qui ne sont pas parfaitement concordants, ouvrent de nouvelles voies vers des modèles plus complexes, ou d'autres hypothèses, ou bien un affinement des groupes de patients étudié en sous-groupes cliniquement homogènes.

⇒ **Contre-arguments en faveur d'une composante génétique fréquente aux troubles bipolaires :**

Jusqu'où va l'implication de ces variants à faible effet?

L'étude de Scott (Scott *et al.*, 2009) a montré que suivant l'origine ethnique, les top SNP ne sont pas les mêmes entre les Africains et les Européens. Ces résultats suggèrent que la variation génétique qui contribue à la vulnérabilité aux troubles bipolaires diffère entre les deux groupes ancestraux. Ce manque de cohérence peut montrer une hétérogénéité génétique avec des événements mutationnels indépendants, ou bien montrer que l'environnement peut modifier la vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires. Le variant le plus associé dans l'étude de Scott *et al* (Scott *et al.*, 2009) est le rs1825828 localisé en 3q11.2, $P=7,0.10^{-7}$, qui en réalité est peu génotypé et correspond à un faux positif. Baum *et al* (Baum *et al.*, 2008), ont génotypés 37 variants individuellement et ont comparé les associations obtenues par le génotype sur puce et ce génotype individuel. Le taux de concordance est de 76%. Ainsi les résultats obtenus pour les associations les plus significatives devraient systématiquement être vérifiés par une autre technique indépendante.

Malgré les associations significatives et répliquées, obtenues pour des variants dans *ANK3* et *NCAN*, les études d'associations pangénomiques présentent des résultats très discordants les uns des autres, pas une étude ne présente les mêmes top SNP à partir d'échantillons indépendants. Les OR ne diffèrent que faiblement de la valeur d'équilibre. Peu d'associations ne dépassent le seuil de significativité $p<5.10^{-8}$. Scott a réalisé un premier GWAS avec les données de génotypage du NIMH et de GSK, aucune association significative n'a été identifiée. Elle a retenu les 7 régions génétiques qui avaient une valeur de $p<10^{-5}$. Aucune de ces régions n'est répliquée dans l'échantillon du WTCCC. Les associations dans *NCAN* ne sont pas systématiquement répliquées. Il est aussi étonnant de remarquer que les top SNP ne répliquent pas les données des gènes candidats précédemment étudiés en association comme *COMT*, *MAOA*, *BDNF*… Toutes ces observations ne sont pas en faveur d'une composante génétique fréquente évidente.

Les variants étudiés associés peuvent être les variants fonctionnels ou être en déséquilibre de liaison avec le variant fonctionnel. Dans ce dernier cas de figure, le variant fonctionnel est identifié de manière indirecte. Ainsi, il reste à identifier les variants fonctionnels et à comprendre leur rôle dans la vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires.

Ces études d'associations ne sont pas exhaustives. En effet, elles s'intéressent à beaucoup de variants fréquents, mais pas à tous. Elles vont aider à une meilleure compréhension de la génétique des troubles bipolaires mais cependant, les loci identifiés aujourd'hui n'expliquent que 1 à 2% de la responsabilité génétique de la maladie. Mais surtout ces études ne s'intéressent pas aux variants rares qui pourraient avoir un fort effet dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, comme les micro-remaniements chromosomiques.

Les recherches de micro-remaniements chromosomiques dans les troubles bipolaires

Les CNV contribuent à une part importante de la variabilité du génome, soit près de 12%, alors que les SNP n'y contribuent qu'à 0,1%. Ces CNV surviennent majoritairement éloignés des gènes (99%) et les duplications sont significativement plus fréquentes que les délétions (Redon *et al.*, 2006).

Les CNV surviennent par des réarrangements de structure du génome tels que les délétions, les duplications, les inversions et les translocations. Les conséquences de ces variations de structures de l'ADN sont un nombre anormal de copies d'une ou plusieurs sections de l'ADN. Les *low copy repeats* (LCRs), qui sont des séquences répétées spécifiques de régions, sont

susceptibles de réarrangements génomiques tels que les CNV. Des facteurs tels que la taille, l'orientation, le pourcentage de similarité et la distance entre les copies influencent ces réarrangements. Parmi les régions présentant des CNV, 95,6% ont des variants rares et seulement 4,4% ont des variants communs (Pinto *et al.*, 2007). La distribution des CNV dans le génome n'est pas aléatoire et est fortement corrélée avec ses caractéristiques, comme les exons, les éléments mobiles tels que les séquences Alu et les duplications segmentaires (DS), qui sont des segments d'ADN aux séquences presque identiques (Cheung *et al.*, 2003) donnant naissance aux LCR. Les points chauds correspondent pour 1/3 aux régions péricentromérique et subtélomériques, connues pour être instables et très polymorphes. Il existe aussi une corrélation avec les DS et les CNV puisque plus de la moitié des nucléotides constitutifs des DS chevauchent des CNV ou les régions dupliquées sont enrichies de 4 à 10 fois en CNV. Cette corrélation est liée à la genèse de ces CNV par recombinaison entre allèles non homologues. Les régions riches en CNV et SD sont aussi riches en gènes. Ces gènes sont impliqués dans la perception sensorielle (tels que les récepteurs olfactifs), le système immunitaire, l'adhésion cellulaire (tels que les cadhérines) et les protéines de structures (Cooper *et al.*, 2007). Les CNV non localisés dans des SD sont dans des régions pauvres en gènes. Les conséquences de l'ensemble de ces CNV peuvent être neutres ou sujettes à des pressions de sélection positive ou négative. Ces CNV peuvent être des vecteurs de l'évolution de l'espèce. Il est clair que certains CNV contribuent à des phénotypes, incluant de nombreux syndromes génétiques, tels que la vision des couleurs, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer. En effet, 14,5% des gènes référencés dans OMIM varient à cause de CNV. Certaines maladies neuropsychiatriques telles que la schizophrénie (Stefansson *et al.*, 2008), l'autisme, les troubles de l'hyperactivité et de l'attention (Williams *et al.*, 2010), ont montré une fréquence plus élevée de micro-remaniements rares chez des patients comparé aux témoins (Merikangas *et al.*, 2009). Soit la genèse de ces micro-remaniements chromosomiques, soit les gènes modifiés par ces micro-remaniements sont impliqués dans l'étiologie de ces pathologies.

A ce jour, plusieurs études se sont intéressées au rôle des CNV dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Ces travaux ont montré des résultats qui divergent pour les valeurs et les différences de fréquences de CNV. Malheureusement, les puces utilisées, les logiciels utilisés, le nombre d'individus ne sont pas les mêmes. Ces différences sont visibles dans le taux de CNV>100kb par individus qui diffère, parfois, d'un facteur 2 d'une étude à l'autre. Lorsque les CNV sont considérés dans leur ensemble, leur taux par individu a tendance à être plus faible chez les patients comparés aux témoins, il en est de même lorsque seules les micro-

délétions ou les micro-duplications sont étudiées. Lorsque les CNV rares sont considérés, leur taux par individu n'est pas significativement différent entre les patients et les témoins. Seule l'étude de Zhang *et al* (Zhang *et al.*, 2009), a montré un taux de délétions rares par individus significativement plus élevé chez les patients comparé aux témoins (0,176 vs 0,13 ; p=0,01). Cette différence est d'autant plus importante quand la population de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce est étudiée (0,203 vs 0,134 ; p=0,004). Ces résultats ne sont pas répliqués par les trois autres études qui ont suivies, qui ont trouvé, à contrario, une surreprésentation des micro-délétions rares chez les témoins. Les travaux de Zhang et al, Grozeva *et al* (Grozeva *et al.*, 2010), McQuillin *et al* (McQuillin *et al.*, 2011) et Priebe *et al* (Priebe *et al.*, 2011) n'ont pas trouvé de taux de micro-duplications rares plus élevé chez les patients comparé aux témoins. Cependant Priebe *et al*, ont montré une surreprésentation de ces micro-délétions chez les patients présentant un âge de début précoce (p=0,01). Pour résumer, ces études n'ont pas montré de résultats qui convergeraient vers une surreprésentation de CNV chez les patients bipolaires.

Type de variants	Classe	Etude	Fréquence chez tous les patients bipolaires	Fréquence chez les patients bipolaires à début précoce	Fréquence chez les témoins
CNV	**Tous**	Grozeva	0,51 (p=0,1)	-	0,55
		Mc Quillin	0,818 (p=0,036)	-	1,013
		Priebe	(p=ns)	(p=0,087)	-
	Rares	Zhang	0,411 (p=0,156)	0,426 (p=0,38)	0,38
		Grozeva	0,12 (p=0,55)	(p=ns)	0,13
		McQuillin	0,4219 (p=ns)	0,277 (p=ns)	0,5372
		Priebe	(p=ns)	**(p=0,045)**	-
Micro-délétions	**Toutes**	Grozeva	0,19 (p=0,01)	-	0,23
		McQuillin	0,471 (p=ns)	-	0,529
		Priebe	(p=ns)	(p=ns)	-
	Rares	Zhang	**0,176 (p=0,01)**	**0,203 (p=0,004)**	0,134
		Grozeva	0,06 (p=0,77)	-	0,062
		McQUillin	0,2658 (p=ns)	-	0,2951
		Priebe	(p=ns)	(p=ns)	-
Micro-duplications	**Toutes**	Grozeva	0,32 (p=0,84)	-	0,32
		McQuillin	0,463 (p=ns)	-	0,484
		Priebe	(p=ns)	(p=0,024)	-
	Rares	Zhang	0,235 (p=0,706)	0,223 (p=0,753)	0,246
		Grozeva	0,08 (p=0,17)	-	0,09
		McQuillin	0,197 (p=0,03)	-	0,2739
		Priebe	**(p=0,063)**	**(p=0,01)**	-

Tableau I.3 : Comparaison du taux de CNV>100kb entre les patients bipolaires, bipolaires à début précoce et les témoins. Les valeurs allant dans le sens d'une surreprésentation des variants chez les témoins sont en rouge et chez les patients en gras.

Le mécanisme de genèse de CNV ne semble pas impliqué dans la génétique des troubles bipolaires. Cependant, ces résultats sont intéressants pour les gènes dont le nombre de copies

est modifié exclusivement chez les patients ou bien pour les micro-remaniements associés aux troubles bipolaires. En effet, les micro-remaniements modifiant les séquences codantes d'un gène peuvent avoir un effet délétère sur la protéine encodée. Chacun des gènes altérés spécifiquement dans l'ADN des patients est possiblement un gène de vulnérabilité aux troubles bipolaires.

Il est intéressant de savoir, pour chaque étude si les CNV identifiés affectent plus de gènes en fonction de la population étudiée et si oui quelle catégorie de gènes. Zhang *et al*, (Zhang *et al.*, 2009), ont montré, à l'aide du programme IPA pour *Ingenuity Pathways Analysis*, que les gènes de leurs patients atteints de troubles bipolaires, interrompus par des micro-délétions uniques sont surreprésentés dans les réseaux de gènes relatifs aux désordres psychologiques (Test exact de Fisher, $p=6{,}30.10^{-6}$) et à l'apprentissage (Test exact de Fisher, $p=8{,}29.10^{-3}$). L'étude de Grozeva *et al (Grozeva et al., 2010)*, s'est intéressée, chez les patients bipolaires, aux gènes modifiés par les variants du nombre de copies uniques ou dans leur totalité. Dans les deux cas, elle reporte que les gènes modifiés par ces variants ne surreprésentent pas significativement un réseau particulier. Priebe *et al* (Priebe *et al.*, 2011), ont montré, à l'aide du programme IPA, que les gènes modifiés par des micro-duplications ou des micro-délétions uniques, spécifiques des patients présentant un âge de début précoce des premiers symptômes, surreprésentent les catégories de gènes suivantes : troubles du système endocrinien, maladie génétique, maladie métabolique, maladie du système immunitaire et maladie infectieuse. Ces résultats sous-tendent une forte hétérogénéité génétique. Ces résultats, ne convergent pas pour une catégorie de gène, un réseau particulier ou une famille de gènes. L'apparition de CNV est un mécanisme relativement rare et il est possible que les gènes affectés de CNV rares indépendants soient des gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaires. En d'autres termes, il est peu probable que plusieurs CNV indépendants modifient le nombre de copie d'un même gène par le seul biais du hasard chez des patients atteints des troubles bipolaires et plus largement chez des patients atteints de maladies psychiatriques. McQuillin *et al* (McQuillin *et al.*, 2011), ont trouvé 26 régions interrompant des gènes spécifiquement chez les patients bipolaires. Parmi ces régions, trois chevauchent des variants reportés dans les études de Zhang *et al* (Zhang *et al.*, 2009) et de Grozeva *et al* (Grozeva *et al.*, 2010). Les régions modifiées sont le chromosome 1(144439082–144791590, gènes modifiés : *PDZK1, GPR89A, GPR89C, NBPF11, LOC728912, FAM108A3*), le chromosome 10 (50334496–50490772, gènes modifiés : *ERCC6, PGBD3, CHAT, SLC18A3 ;* 51497689–52053743, gènes modifiés : *FAM21A, FAM21B, ASAH2, SGMS1*). De plus, McQuillin *et al*, ont montré que des variants du nombre de copie modifient des gènes qui sont aussi altérés dans d'autres pathologies

psychiatriques telles que la dépression, la schizophrénie et l'autisme. La quasi totalité du gène *ERBB4* pour *receptor tyrosine-protein kinase erbB-4 isoform JM-a/CVT-1 precursor* (2q24) est dupliquée par un CNV chez un patient atteint de troubles bipolaires (Grozeva *et al.*, 2010) un patient schizophrène présentant, un âge d'apparition très précoce : 13 ans, porte une délétion de 399kb enlevant les 9 derniers exons du gène (Walsh *et al.*, 2008). *ERBB4* est un membre de la famille des protéines kinases Tyr et la super famille des récepteurs à l'*EGF* (*Epidermal Growth Factor*). Cette protéine se lie et est activée par les neurégulines. L'allèle mutant portant la délétion ne possède plus le domaine kinase intracellulaire. La protéine résultante aurait un effet dominant négatif et causerait des défauts de migration neuronale et de neurotransmission synaptique. Ainsi, *ERBB4* pourrait être un gène de vulnérabilité commun aux troubles bipolaires et à la schizophrénie. Grozeva *et al* (Grozeva *et al.*, 2010) a reporté une duplication de 160kb englobant plusieurs gènes dont *SHANK2*. Berkley en 2010 (Berkel *et al.*, 2010), a identifié, chez un patient atteint de retard mental (1/184) et un patient atteint de syndrome du spectre autistique (1/396), deux délétions *de novo*, absentes de l'ADN de 5023 individus contrôles enlevant le domaine PDZ de la protéine (p=0,011) et plusieurs variants non-synonymes (cf la figure I.4).

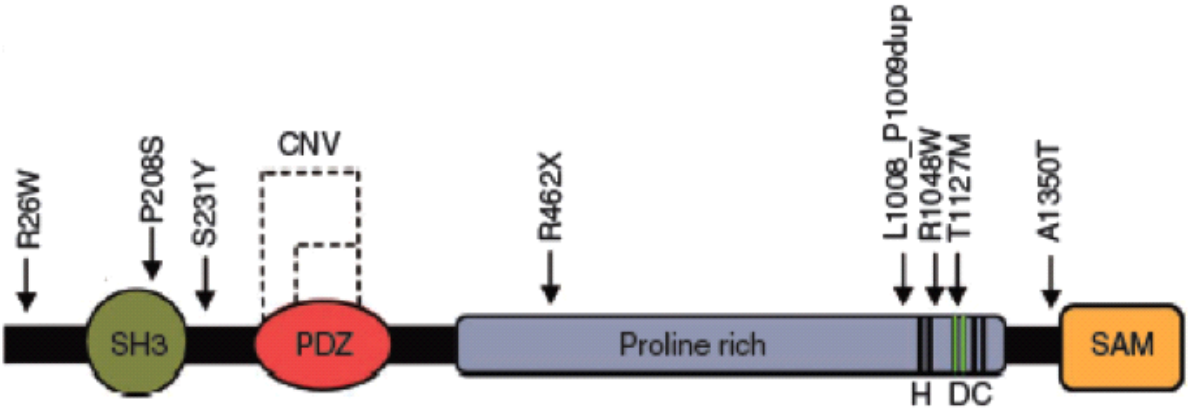

Figure I.4 : Putatifs variants étiologiques résultants dans des modifications des acides aminés ou une troncature de SHANK2 dans le retard mental et les troubles du spectre autistique. SH3, Src homology 3 domain; PDZ, postsynaptic density 95/Discs large/zona occludens-1 homology domain; Proline-rich region; SAM, sterile alpha motif domain; H, HOMER binding motif; D, dynamin-2 binding motif; C, cortactin binding motif.

Le gène *SHANK2* pourrait-être un gène de vulnérabilité aux troubles bipolaires, à l'autisme et au retard mental.

Le gène *GRIK2* est localisé dans une région de liaison à l'autisme : 6q21. L'étude génétique du gène chez 33 patients autistes a montré qu'un variant non-synonyme : M867I était plus

fréquemment transmis par la mère (TDT χ^2 = 7,4; df = 1; P = 0,007 ; (Bah *et al.*, 2004). McQuillin *et al* (McQuillin *et al.*, 2011), reportent deux rares duplications des 7 premiers exons du gène portée par deux patients bipolaires et Walsh *et al* (Walsh *et al.*, 2008) ont reporté une délétion d'une partie du gène chez un patient schizophrène (âge de début 17 ans). Le gène *GRIK2* pourrait être un gène commun à la vulnérabilité aux troubles bipolaires, à l'autisme et à la schizophrénie. Saus *et al* (Saus *et al.*, 2010), ont publié une étude de recherche de micro-remaniements chromosomiques, par MLPA, dans 68 gènes dont les protéines encodées sont impliquées dans la signalisation du système nerveux, chez des patients atteints de troubles de l'humeur, de schizophrénie, de troubles anxieux, de troubles des conduites alimentaires et des témoins. Une délétion dans *GRM7* (Récepteur métabotropique au glutamate 7), 2 duplications de *DISC1*, une délétion et une duplication de *PRODH* sont reportées chez des patients atteints de troubles de l'humeur. Les témoins ne présentent pas de micro-remaniements dans *GRM7*. Zhang *et al* (Zhang *et al.*, 2009), ont identifié une délétion unique, spécifique d'un patient atteint de troubles bipolaires, qui enlève 3 exons du gène en 5'. Ce gène est aussi associé à la dépression majeure (Muglia *et al.*, 2010) aux troubles bipolaires (2007) et présente des micro-remaniements chez des patients atteints d'autisme et de schizophrénie (Walsh *et al.*, 2008). Les gènes du système glutamatergique ont déjà été suspectés dans la vulnérabilité aux troubles psychiatriques et les résultats des études de micro-remaniements ajoutent des arguments à cette hypothèse. Ainsi, ces nombreux exemples montrent qu'il existe des recouvrements entre les gènes modifiés dans les troubles bipolaires et d'autres pathologies psychiatriques telles que l'autisme et la schizophrénie. De même il existe des recouvrements entre les gènes altérés par des CNV dans la schizophrénie et l'autisme. Par exemple, de larges et rares délétions dans *CDH8* et *SHANK3* sont présentes dans l'ADN de patients affectés par des troubles du spectre autistique ou une schizophrénie. Grozeva *et al* (Grozeva *et al.*, 2010), ont aussi montré que des CNV dans ou à proximité des cadhérines : *CDH12*, *CDH15* et *CDH18*, la famille des SHANK : *SHANK2*, les neuroligines : *NLGN1*, sont trouvés spécifiquement dans l'ADN de patients bipolaires. Ces études montrent que des CNV altèrent, dans ces pathologies psychiatriques, des familles de gènes telles que les cadhérines, la famille des SHANK, les neuroligines, ou des systèmes tels que le système glutamatergique. Ainsi, des micro-remaniements rares absents de l'ADN d'individus contrôles ou bien associés affectent des gènes communs à plusieurs pathologies psychiatriques. L'ensemble de ces travaux suggère que ces maladies psychiatriques semblent être génétiquement hétérogènes et que des gènes de vulnérabilité pourraient être communs à ces différentes pathologies.

Grâce à ces données, de nouvelles hypothèses étiologiques génétiques émergent.

1) Des gènes communs sont responsables d'une part de la vulnérabilité aux maladies psychiatriques. Le type de variant : duplication ou délétion, les gènes modificateurs et l'environnement, pourraient influencer l'apparition d'une pathologie psychiatrique plutôt qu'une autre.

2) La famille de gènes est commune à la vulnérabilité aux maladies psychiatriques. Mais certains gènes d'une même famille sont spécifiques d'une pathologie psychiatrique.

3) Certains gènes n'appartenant pas à une famille particulière de gènes de vulnérabilité, sont modifiés spécifiquement chez des individus atteints de la pathologie considérée.

4) Les 3 hypothèses coexistent

5) L'environnement a un rôle majeur dans la vulnérabilité aux maladies psychiatriques ou seul l'environnement a un rôle dans la vulnérabilité aux maladies psychiatriques.

En plus des arguments génétiques, plusieurs arguments cliniques sont en faveur de la première hypothèse. L'existence d'un continuum dans la symptomatologie de la schizophrénie et des troubles bipolaires, avec entre les deux pathologies, les troubles schizoaffectifs. On constate des coagrégations dans les familles entre la schizophrénie et les troubles bipolaires ou entre la schizophrénie et l'autisme. En effet, d'après l'étude de Lichtenstein *et al* (Lichtenstein *et al.*, 2009), le risque relatif de développer une schizophrénie sachant que son germain est atteint de troubles bipolaires est de 3,7 et dans la situation contraire, le risque relatif est de 3,9. Et malgré la quasi absence de comorbidité entre l'autisme et les troubles bipolaires, on peut envisager que ce n'est pas le gène, mais le type de variant dans ce cas de figure qui prime dans la vulnérabilité génétique à une des ces deux pathologies psychiatriques.

Cependant, on ne peut pas exclure un rôle principal de l'environnement.

Cette hypothèse expliquerait la comorbidité entre la schizophrénie et l'autisme ou la schizophrénie et les troubles bipolaires et les troubles schizoaffectifs dans le sens d'un continuum avec aux extrémités l'autisme puis la schizophrénie puis les troubles schizo-affectifs puis les troubles bipolaires.

Etudes d'association du nombre de copies dans les troubles bipolaires

A ce jour, peu d'études se sont intéressées aux différences de fréquences de CNV entre des patients bipolaires et des témoins. La principale, publiée en 2010 par le WTCCC (Craddock *et al.*, 2010) a testé 3,432 CNV polymorphes chez 16000 cas dont 2000 patients atteints de troubles bipolaires et 3000 témoins afin de réaliser des études d'association pour chacun des

ses variants. Les gènes candidats retenus dans le cas des troubles bipolaires sont *ANK3, CACNA1C, DISC1, NRXN1, ZNF804A*. Malheureusement aucune association significative n'a été trouvée entre les troubles bipolaires et un CNV particulier dans ces gènes candidats ou dans les autres gènes candidats des autres pathologies testées.

Yang *et al* (Yang *et al.*, 2009), ont étudié la ségrégation de CNV, grâce à des puces Illumina 550k, au sein d'une famille d'Amish de l'Ancien Ordre s'étalant sur 3 générations et comptant 46 individus génotypés. Au total, 50 CNV ont été identifiés, parmi lesquels, quatre sont plus fréquents chez les patients atteints de troubles de l'humeur : une duplication fréquente en 6q27, une rare duplication en 9q21.11, une duplication fréquente en 12p13.31 et une délétion fréquente en 15q11.2. Ces CNV affectent le niveau d'expression des gènes à proximité. Olsen et al (Olsen *et al.*, 2011), grâce à une analyse combinée de 3 échantillons de cas et de témoins provenant du Danemark, de Norvège et d'Islande, ont réalisé une étude d'association pour les variants de ces 4 régions, chez 1897 patients (1223 UP et 463 BP) et 11231 témoins. Malheureusement cette étude ne réplique pas les résultats des précédentes études. Il est possible que la vulnérabilité aux troubles de l'humeur dans cette famille ne soit pas liée à des micro-remaniements chromosomiques.

Un CNV dans le gène *GSK3β* interrompt les cinq derniers exons du gène et deux autres gènes annotés (*NR1I2* et *C3orf15*). La population de patients de Lachman *et al*, atteints de troubles bipolaires présente une augmentation de fréquence de ce CNV comparé aux témoins (p=0,002). Ainsi ce résultat suggère que le gène *GSK3β*, codant une glycogène synthase kinase, une protéine clef de la voie de signalisation Wnt et qui est une cible des sels de Li^{2+}, pourrait être impliquée dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires (Lachman *et al.*, 2007).

Des délétions dans la région du syndrome vélocardiofacial ont été impliquées dans les troubles bipolaires (Papolos *et al.*, 1996). Cependant, Grozeva *et al*, n'observent aucune délétion chez leurs patients (Grozeva *et al.*, 2010). Des duplications réciproques sont trouvées chez 8 contrôles. Bien que des microduplications de la région 22q11 partagent des caractéristiques du VCFS, leurs résultats ne sont pas cohérents avec l'hypothèse d'une prédisposition aux troubles bipolaires par des duplications de la région 22q11 (Ensenauer *et al.*, 2003). Priebe *et al* ont testé si le nombre de CNV dans la région 22q11 était statistiquement différent entre une population de 882 patients et 872 témoins. Les auteurs n'ont trouvé de différences statistiques ni pour les micro-délétions et ni pour les micro-duplications. Cependant, il aurait été intéressant de tester sur la cohorte de patients à début précoce exclusivement. Les auteurs ont aussi étudié d'autres régions génétiques précédemment associées aux troubles neuropsychiatriques telles que la région 1q21 (micro-

délétion : autisme, retard mental et schizophrénie), 2p16 (microdélétion : autisme et schizophrénie), 7q34-36 (microdélétion : Schizophrénie) 15q11 (microdélétion: schizophrénie), 15q13 (microdélétion: autisme, retard mental, schizophrénie), 17p12 (microdélétion : schizophrénie). Aucun CNV dans ces régions n'a tendance à être surreprésenté chez les patients (Priebe *et al.*, 2011). La région 16p11.2 a été impliquée dans la schizophrénie (Walsh *et al.*, 2008) et l'autisme (Weiss *et al.*, 2008). Dans l'étude de Grozeva *et al*, des micro-duplications dans cette région sont surreprésentées chez les cas (0,4% vs 0,2% ; test exact de Fisher, p=0,15 ; (Grozeva *et al.*, 2010). De même, Priebe *et al,* ont observé une tendance à la surreprésentation des microduplications de la région 16p11 chez les patients bipolaires comparé aux témoins (0,23% vs 0% ; (Priebe *et al.*, 2011).
Ainsi, peu d'études d'association ont été réalisée entre les CNV et les troubles bipolaires. Parmi ces études, peu présentent des résultats significatifs et aucune ne réplique les résultats des études d'association gène candidat ou pangénomiques, précédemment réalisées dans les troubles bipolaires à part la micro-duplication en 16p11 et la duplication dans *GSK3* qui restent à approfondir.

La recherche, la caractérisation et la spécificité à la pathologie ou l'association des variants du nombre de copies est une voie prometteuse dans l'identification de variants de vulnérabilité aux troubles bipolaires. Ces recherches sont effectuées sur génome entier, elles ne souffrent pas de biais par une approche gènes-candidats. La technique de détection de ces variants avec la présence de plusieurs variants avec des intensités de fluorescence et un taux d'hérérozygotie modifiés, confirmés par d'autres techniques de dosage géniques (PCRq ou utilisation d'autres puces), limite la présence de faux positifs. Les micro-remaniements peuvent présenter des conséquences fonctionnelles plus délétères que de simples variations ponctuelles. Nous avons vu, par exemple, leurs conséquences sur le niveau d'expression des gènes au voisinage des ces CNV (Yang *et al.*, 2009) et sur la fonction de la protéine *ERBB4* avec un effet dominant-négatif (Walsh *et al.*, 2008). Leur taux par individu est beaucoup plus faible (CNV de plus de 100kb : <1/individu) que celui de variants non-synonymes (environ 400/individus), ce qui rend plus rapide et plus efficace le ciblage des gènes d'intérêt. Maintenant il s'agit de trier ces variants du nombre de copie, de répliquer les résultats et de réaliser des études fonctionnelles pour comprendre leur rôle dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

Etudes épigénétiques et transcriptomiques

L'environnement peut influencer le risque de développer une maladie combiné avec des variations génétiques, en agissant sur l'expression de gènes par le biais de mécanismes épigénétiques. Bien que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones soient les mécanismes épigénétiques étudiés le plus fréquemment, d'autres processus épigénétiques sont aussi connus pour réguler la fonction des gènes tels que l'inactivation du chromosome X. Les études épigénétiques et transcriptionnelles sont limitées par la disponibilité de l'organe phare des maladies psychiatriques à savoir, le cerveau.

Les études transcriptionnelles et épigénétiques sont réalisées à partir de différents matériels : des homogénats d'extraits de cerveaux post-mortem, des cellules issues de tissus périphériques, des cellules en culture, ou des animaux modèles de la maladie. Les homogénats interrogent directement le profil épigénétique au site d'intérêt. Cependant, au cours du cycle de vie d'une cellule, d'un type cellulaire à l'autre (neurone, cellules gliales, oligodendrocyte), d'une région cérébrale à l'autre, l'épigénome varie. Le traitement médicamenteux des patients, l'abus de drogue, la consommation régulière de drogue et de tabac peuvent aussi jouer sur l'expression des gènes. Par exemple, le valproate inhibe les histones déacétylases (Chen *et al.*, 2007). Des échantillons de cerveau humain sont difficiles à obtenir. Ils sont collectés post-mortem et le manque de contrôles expérimentaux avant que ces échantillons n'entrent dans les banques présente des limites non négligeables. Le transcriptome diffère entre les cellules issues de lignées, les tissus périphériques et les cellules nerveuses. Une augmentation du niveau d'expression de *NRG1* a été identifiée dans des tissus cérébraux post-mortem de patients schizophrènes. En 2011, Brennand *et al*, ont confirmé cette augmentation du niveau d'expression de *NRG1*, dans des neurones issus de hiPSC de patients schizophrènes, mais pas dans leurs fibroblastes, ni leurs hiPSC et ni leurs cellules progénitrices de neurones (Brennand *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent qu'il est important de réaliser des études d'expression sur le type cellulaire adéquat avec la pathologie étudiée.

Jusqu'à présent, la plupart des études épigénétiques et transcriptionnelles ont présenté des approches gènes-candidats. Les études épigénétiques ont tout d'abord montré des résultats positifs, par exemple, en analysant la méthylation des promoteurs de la *REELIN* (Abdolmaleky *et al.*, 2004) et de *COMT* (Abdolmaleky *et al.*, 2006), dans des échantillons issus de lobes frontaux de cerveaux post-mortem. Cependant ces résultats n'ont pas été répliqués dans les travaux qui ont suivi. Les études sont divergentes, soit pour la méthode utilisée, soit pour les îlots CpG étudiés, soit pour les régions cérébrale étudiées. Rosa *et al*, ont comparé les patterns d'inactivation du chromosome X à partir d'ADN issus de sang ou de

prélèvement buccaux, entre des paires de jumelles monozygotes concordantes et discordantes pour les troubles bipolaires et des témoins monozygotes. Les jumelles discordantes bipolaires montrent de plus grandes différences dans la méthylation des allèles paternels et maternels que les jumelles concordantes (Rosa *et al.*, 2008). Ces données suggèrent qu'un loci sur le chromosome X pourrait être impliqué dans la pathologie. Mill *et al*, ont été les premiers à utiliser une approche épigénomique. Ils ont passé au crible, grâce à des puces à îlots CpG, l'ADN extrait de lobe frontal post-mortem de patients bipolaires, schizophrènes et de témoins et l'ADN de lignée germinale de patients bipolaires et de témoins. Plusieurs gènes glutamatergiques et GABAergiques, ainsi que des loci impliqués dans le développement neuronal et des loci dans des régions liées aux psychoses sont affectés par ces modifications en méthylation. Il semblerait que des facteurs sexe-spécifiques jouent un rôle fort dans la pathologie, puisqu'il n'existe pas de chevauchement significatif entre les hommes et les femmes dans leurs différences de profils de méthylation lorsque les ADN de patients bipolaires sont comparé avec ceux des témoins. De plus les hommes bipolaires ne présentent pas de différence significative de profil de méthylation dans leur lignée germinale, comparé aux témoins. Les auteurs n'ont pas trouvé de différences de quantité de méthylation des promoteurs de la *COMT* et de la *REELIN* (Mill *et al.*, 2008). Ces résultats nécessitent d'être répliqués.

Pour comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent une pathologie, de nombreux groupes se sont intéressés au profil d'expression dans des cerveaux post-mortem ou des tissus de patients comparé à des témoins. Depuis les années 2000, en plus de l'approche gène-candidat, la technologie des puces d'expression a été utilisée. Encore plus récemment, le séquençage d'ARN a révolutionné la discipline. Le tableau I.4 synthétise les gènes présentés comme dérégulés chez des patients bipolaires dans au moins deux études de puces à ADN sur des cerveaux post-mortem. La plupart des articles se sont concentrés sur le cortex préfrontal. Cependant, d'autres se sont intéressés au cortex cingulaire antérieur (McCullumsmith *et al.*, 2007), à l'hippocampe (Konradi *et al.*, 2004) et au thalamus (Chu *et al.*, 2009). Lin *et al*, ont classé ces gènes dérégulés, en fonction de leurs propriétés fonctionnelles, en quatre groupes : les gènes synaptiques, les gènes associés à des fonctions nerveuses et/ou gliales, des gènes métaboliques et des gènes avec des fonctions générales telles que la signalisation ou la dégradation protéique, non spécifiques du cerveau (Lin *et al.*, 2011a). Ces gènes dérégulés ouvrent de nouvelles voies à explorer, ou infirment des gènes et/ou des familles de gènes soulignées par les études génétiques (*MAOA, GABRA5, GRM3, ERBB3*). Lin *et al*, ont

récemment publié une analyse d'expression sur génome entier à partir de cellules nerveuses différenciées dérivées de cellules pluripotentes induites (Lin *et al.*, 2011b). Il serait intéressant d'appliquer cette méthodologie pour comparer le transcriptome de patients bipolaires, schizophrènes avec celui de contrôles. Ces données seront à comparer avec celles obtenues à partir de l'étude de cerveaux post-mortem. L'étude des modèles de souris invalidés pour les gènes dérégulés dans les troubles bipolaires sont à approfondir, afin de mieux comprendre son rôle dans la physiopathologie des troubles bipolaires. Ces différents outils offrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de la physiopathologie des troubles bipolaires. Il est aussi intéressant de noter que la plupart des résultats de ces études transcriptomiques sont convergents avec ceux obtenus dans la schizophrénie.

Catégorie de gènes	Processus cellulaires	Type de Dérégulation	Gène	Nom détaillé	Référence	Modèle de souris	Résultats positifs	Référence
Gènes synaptiques		Augmentation	MAOA*	Monoamine oxidase A	Shao et Vawter 2008			
			GABRA5	Gamma-aminobutyric acid A receptor, alpha 5	Choudary et al, 2005	Gabra5 H10R KI	Conditionnement de trace par la peur facilité	Crestani et al, 2002
			GRM3#	Glutamate receptor, metabotropic 3	Choudary et al, 2005			
		Diminution	GAD1*	Glutamate decarboxylase 1	Konradi et al, 2004	Gad 67 KO Gad1 KO	Fente palatine létale	Asada et al, 1997 Condie et al, 1997
						Gad1floxé KO	Innervation GABAergique perisomatique déficiente dans le cortex visuel	Chattopadhyaya et al, 2007
			YWHAZ*	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Chu et al, 2009			
					Konradi et al, 2004			
			ERBB3*	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homologue 3	Tkachev et al, 2003			
Autres gènes neuronaux ou gliaux	Protéines de la myéline	Diminution	CLDN11*	Claudin 11	Tkachev et al, 2003	OSP/claudin-11 KO	Jonctions serrées manquantes dans la myéline du SNC, conduction ralentie, faiblesse des pattes arrières	Gow et al 1999
			MAG*	Myelin associated glycoprotein	Tchakev et al, 2003	MAG KO	Déficits moteurs, hyperactivité, dégénération axonale	Pan et al, 2005
			SOX10*	SRY(Sex determining region Y)-box 10	Tkachev et al, 2003	SOX10 KO	Mort à la naissance, pas de glie périphérale, pas de différenciation terminale des oligodendrocytes formant la myéline	Britsch at al, 2001
					Iwamoto et al, 2004			Stolot et al, 2002
	Neuropeptides		TF*	Transferrin	Tkachev et al, 2003			
			NPY*	Neuropeptide Y	Kuromitsu et al, 2001	NPY KO	Anxiogénique dans l'openfield, hypoalgésique	Bannon et al, 2000
						NPY Y2 receptor KO	Hyperlocomotion dans un nouvel openfield	Karl et al, 2010
			SST*	Somatostatin	Konradi et al, 2004	SST KO	Apprentissage moteur altéré	Zeyda et al, 2001
Gènes métaboliques	Métabolisme mitochondrial et énergétique	Augmentation	MRPL3	Mitchondrial ribosomal protein L3	Iwamoto et al, 2005a			
			UQCRC2	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	Iwamoto et al, 2005a			
		Diminution	ATP5C3	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial Fo complex, subunit CT (subunit 9)	Sun et al, 2006			
					Konradi et al, 2004			
			ATP5G1	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	Sun et al, 2006			
					Konradi et al, 2004			
			MRPL3		Konradi et al, 2004			
			UQCRC2		Sun et al, 2006			
	Métabolisme des acides aminés		ATP6V1A*	ATP synthase, H+ transporting lysosomal 70 kDa, V1 subunit A (ATP6V1A)	Chu et al, 2009			
					Konradi et al, 2004			
			GOT1*	Glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	Konradi et al, 2004			
Gènes avec des fonctions générales	Transduction du signal	Augmentation	PDE1A	Phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent (PDE1A)	Iwamoto et al, 2004			
	Cytosquelette		HSPB1*	Heat shock 27 kDa protein 1 (HSPB1)	Iwamoto et al, 2004	Tg overexpression human HSP27	Protège contre une blessure suite à une ischemie/ réperfusion	Hollander et al, 2004
	Ubiquitine/protéasome/ dégradation de protéines	Diminution	PSMC6*	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	Konradi et al, 2004			

*** trouvé aussi dans la schizophrénie**
 # dérégulation inverse dans la schizophrénie

Tableau I.4 : bilan des résultats répliqués des études d'expression réalisées dans les troubles bipolaires et des phénotypes des modèles de souris correspondant aux gènes d'intérêt.

Pour résumer, une composante génétique aux troubles bipolaires a été démontrée par plusieurs études complémentaires. Les études génétiques qui ont essayé de caractériser cette composante génétique montrent, dans l'ensemble des résultats discordants, ne permettant pas de trancher entre une hypothèse ou l'autre ou d'impliquer un gène en particulier. Ces résultats sont sans doute la conséquence d'une population cliniquement hétérogène. Ainsi, nous avons cherché à travailler sur une population de patients cliniquement homogène afin de réduire l'hétérogénéité génétique, si elle existe, impliquée dans la variabilité phénotypique.

Malgré une composante génétique démontrée, l'étiologie et la physiopathologie sont inconnues et aucun marqueur biologique ni génétique n'a, à ce jour, été clairement identifié, dû, probablement, à une forte hétérogénéité clinique. Par conséquent, notre équipe s'est focalisée sur des patients atteints de trouble bipolaire à début précoce (TBDP) qui représentent un sous-groupe cliniquement plus homogène avec une plus forte agrégation familiale.

Ce démembrement clinique a déjà fait ces preuves par le passé, dans la recherche de gènes de vulnérabilité à des maladies complexes telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le cancer du sein.

Bellivier *et al*, ont comparé la distribution d'une population de 211 patients en fonction de leur âge d'apparition des premiers symptômes, avec différents modèles. Un modèle avec un mélange de 3 Gaussiennes, correspond le mieux à cette distribution. La première présente un âge moyen de 16,9 ans et correspondrait à 41,4% de la population, la deuxième montre un âge moyen de 26,9 ans et constituerait à 41,9% de la cohorte et la dernière, 46,2 ans (Bellivier *et al.*, 2001). Cette distribution théorique en 3 sous-groupes a été répliquée (Bellivier *et al.*, 2001, Bellivier *et al.*, 2003, Lin *et al.*, 2006, Manchia *et al.*, 2008, Hamshere *et al.*, 2009, Severino *et al.*, 2009) et la valeur seuil qui sépare les sous-groupes d'âge d'apparition précoce et intermédiaire a été caractérisée à 21 ans. Ces études ont montré que les apparentés de proposant atteint de trouble bipolaire à début précoce ont un risque relatif augmenté par rapport aux apparentés de proposant ayant un âge d'apparition tardif (Rice *et al.*, 1987). Les patients atteints de troubles bipolaires à début précoce présentent donc une plus forte agrégation. Ils ont une pathologie plus sévère menant à la manifestation de nombreuses complications cliniques, avec un plus grand risque d'alcoolisme, d'abus de drogues et de suicidalité. Ces risques plus élevés sont retrouvés ainsi que celui d'un âge de début précoce chez les apparentés du probant atteint de troubles bipolaires à début précoce. Ainsi, le trouble bipolaire a début précoce présente une agrégation familiale avec modèle de ségrégation

correspondant à locus majeur de vulnérabilité et une plus grande homogénéité clinique et constituent de ce fait un sous-groupe intéressant à partir duquel réaliser des études génétiques.

Objectif de la thèse : trouver des gènes de vulnérabilité aux TB

En 2006, nous avons réalisé une étude de liaison sur l'ensemble du génome de 87 paires de germains atteints de trouble bipolaire à début précoce (Etain *et al.*, 2006). Cette étude a montré que ces patients partageaient plus fréquemment 6 régions chromosomiques parmi lesquelles les régions 3p14 et 20p12. Le gène *SNAP25*, situé en 20p12, code une protéine de 25kDa associée aux synaptosomes. Cette protéine est localisée à la membrane plasmique et est essentielle à la fusion vésiculaire et la libération de neurotransmetteurs. Au laboratoire, nous avons récemment mis en évidence une association entre le trouble bipolaire à début précoce et un variant localisé dans le promoteur du gène *SNAP25*. Par ailleurs, des individus homozygotes pour ce variant présentaient, dans le cortex préfrontal, un niveau plus élevé d'ARNm de l'isoforme majeure de *SNAP25* chez l'adulte. Ainsi, ce variant pourrait prédisposer au trouble bipolaire à début précoce. L'objectif de ma thèse était donc d'explorer les gènes de la région 3p14, dont la fonction pouvaient être directement liée à ce mécanisme moléculaire, afin d'identifier de nouveaux gènes de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce. Nous avons sélectionné 2 gènes candidats au trouble bipolaire à début précoce, localisés dans la région 3p14. Ces deux gènes sont exprimés dans le système nerveux central et codent des protéines impliquées dans la transmission synaptique. Le gène *SYNPR* code la Synaptoporine, qui serait impliquée lors du « Kiss and Run », mécanisme de libération rapide des neurotransmetteurs et *CADPS* codant une protéine dépendante du Ca^{2+} activatrice de l'exocytose de vésicules, entraînant ainsi la libération de neurotransmetteurs. Nous avons séquencé, pour ces deux gènes, l'ensemble des séquences codantes, les régions 5' et 3'UTR ainsi que les régions promotrices situées en amont du site d'initiation de la transcription.

En 2009, une méta-analyse pangénomique a été réalisée, en comparant les fréquences alléliques de variants fréquents entre les patients atteints de trouble bipolaire à début précoce et les individus témoins. Grâce à cette méta-analyse, des variants de vulnérabilité ont été identifiés a proximité de plusieurs gènes. A partir des données génotypiques et d'intensité de fluorescence disponibles pour quelques individus ayant participé à cette étude d'association, nous avons recherché des micro-remaniements chromosomiques sur l'ensemble de leur génome. Certains micro-remaniements modifient la séquence codante d'un ou plusieurs gène

exprimés dans le système nerveux central : *NRXN1, LINGO2, CDH8, ANKS1b, GPHN, PLCXD3, GABARAPL1*, *GRIP1, CDH13* et sont spécifiques de notre population de patients, à l'exception de *NRXN1* associé à l'autisme et la schizophrénie. L'objectif de ma thèse était d'explorer ces micro-remaniements. Tout d'abord, il s'agissait de confirmer ces micro-remaniements, par une technique indépendante et de caractériser leur point de cassure. Parmi ces micro-remaniements, une délétion enlève le promoteur et le premier exon du gène *PLCXD3*. Ce gène code une phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol. Les antidépresseurs tricycliques stimulent la phospholipase C et la production d'inositol, 1,4,5-triphosphate. Deux variants proches de ce gène sont parmi les plus associés dans notre méta-analyse. Les séquences codantes de *PLCXD3* ont été analysées au sein de notre cohorte de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce.

L'ensemble des stratégies utilisées au cours de ma thèse vise à identifier et étudier des gènes candidats au trouble bipolaire à début précoce, afin de trouver des gènes de vulnérabilité. Ces études permettront, à plus long terme, une meilleure compréhension de la physiopathologie du trouble bipolaire et peut-être d'identifier des biomarqueurs de ce trouble. Elles devraient également permettre d'ouvrir de nouvelles voies d'exploration pour les stratégies thérapeutiques.

Chapître II : Matériels et Méthodes

Population étudiée

Patients (n= 452): Les 452 patients bipolaires (203 hommes et 249 femmes) ont été recrutés prospectivement dans quatre services hospitaliers (GH Mondor de Créteil, Hôpital Charles Perrens de Bordeaux, CHU de Nancy, Hôpital St Marguerite de Marseille). Tous les sujets ont été interviewés avec un entretien diagnostique standardisé, la DIGS (*Diagnostic Interview for Genetic Studies* ; (Nurnberger *et al.*, 1994), qui a permis de vérifier les critères de troubles bipolaires de type 1 ou 2, définis par le DSM IV (A.P.A., 1994). L'entretien a également permis de définir rétrospectivement l'âge de début de la maladie. L'âge de début de la maladie correspond à l'âge auquel le patient a répondu pour la première fois aux critères d'épisode dépressif majeur ou de manie. Les études préalablement réalisées au sein de notre équipe de recherche ont permis de définir les seuils diagnostiques des différents sous-groupes pour l'âge de début. En particulier, nous définissons comme formes à début précoce celles pour lesquelles les symptômes sont apparus avant l'âge de 22 ans. Les patients étaient tous normothymiques au moment de l'inclusion ce qui a été évalué avec une échelle de dépression, la Montgomery-Asberg Depression Rating Scale et une échelle de manie, la Young Mania Rating Scale (score inférieur ou égal à 5).

Témoins (n= 149): Les sujets témoins ont passé les mêmes entretiens que les patients. Ce sont tous des donneurs de sang des hôpitaux Henri Mondor et la Pitié-Salpêtrière. Ces sujets ont tous été interviewés avec la DIGS et ont été interrogés sur leur histoire familiale des troubles psychiatriques, grâce au *National Institute for Mental Health Family Interview for Genetic Studies*. Seuls les sujets témoins sans histoire familiale ni personnelle de trouble psychiatrique et en particulier de troubles de l'humeur ont été inclus dans l'étude.

Tous les sujets inclus sont français avec au moins trois grand-parents nés en France. Chaque individu a un code qui lui est propre qui respecte leur anonymat. Conformément à la loi, les personnes intégrées dans l'étude ont signé un consentement écrit et éclairé, donnant leur accord pour participer à une étude génétique. Les études génétiques restent anonymes et l'identité de chaque personne, ainsi que les informations les concernant restent confidentielles.

Les échantillons de cerveaux

Le *Stanley Medical Research Institute* a donné les ARN, les ADNc et les ADN de 34 patients atteints de troubles bipolaires, 35 patients atteints de schizophrénie et 35 témoins. Les patients ont été diagnostiqués d'après le DSM-IV. Les ADN, les ARN et les ADNc portaient des codes différents, permettant ainsi une analyse en double aveugle.

L'ADN génomique des patients et des témoins provient du sang circulant ou de lignées de lymphocytes B, issus du sang périphérique après transformation par le virus d'Epstein Barr. L'ADN a été isolé à l'aide du kit *Nucleon BACC 3* (GE Healthcare). Ces ADN génomiques extraits sont stockés au sein de la plateforme de resources biologiques de l'hôpital Henri Mondor.

Biologie moléculaire

a. Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les séquences génomiques d'intérêt sont amplifiées grâce à des amorces spécifiques (0,5 mM chacune), des dNTP (0,2mM), de la Taq polymérase (Eurobio : 0,0125U/µL), d'un tampon (1X) de $MgCl_2$ (1,5 mM) et d'ADN matrice (40ng). Le volume réactionnel final est adapté à la taille des fragments amplifiés, soit 20µL pour les fragments d'environs 500pb et 50µL pour les fragments plus grands. Des mises aux points ont été réalisées pour chaque exon, afin de déterminer les meilleures conditions d'amplification. Le programme d'amplification, pour les fragments de 500pb, est : une dénaturation à 94°C pendant 2min, 35 cycles d'amplification [dénaturation à 95°C pendant 30 sec, hybridation à la température optimum pendant 30 sec, élongation à 72°C avec une durée d'1 min/kb] et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 min.

Amorces

Les amorces sont choisies afin que

- chaque amorce soit localisée à environ 100pb de la région d'intérêt à séquencer avec environ 40% de bases correspondant à des G et des C,
- les amorces ne doivent pas former de dimère (modélisable grâce au logiciel Amplify 3X)
- la longueur moyenne de chaque amorce est de 21 nucléotides

- la température d'hybridation (Tm) est d'environ 60°C (Tm= (nombre de base G + C) x 4 + (nombre de bases A+T) x 2)

La taille des fragments amplifiés est vérifiée sur un gel d'agarose 1% dans du TBE 1X (0.045M de tris-borat, 0.01mM d'EDTA).

b. Purification du produit de PCR

Les produits de PCR (5µL) sont purifiés grâce à la Phosphatase alcaline de crevette (*Shrimp Alkaline Phosphatase* : 0,5U/µL) qui déphosphoryle les dNTPs et l'Exonucléase I (5U/µL) qui dégrade les ADNs simples brins (amorces). Le volume réactionnel est de 10µL. Les échantillons sont placés à 37°C pendant 40 min (température optimale à laquelle les enzymes sont actives) puis les enzymes sont inactivées à 80°C pendant 20 min.

c. Réaction de séquence

La réaction de séquence utilise la méthode de Sanger. Elle permet d'obtenir, à partir des produits de PCR purifiés, des fragments d'ADN de différentes tailles et marqués spécifiquement en 3' par un ddNTP. Cette réaction de séquence nécessite donc des dNTP, des ddNTP marqués, de la Taq polymérase tous présents dans le Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystem : 1,5 µL), du tampon de séquençage (1X), une seule amorce (0,15mM) et le produit de PCR purifié (5-20ng). Le volume final du mélange réactionnel est de 20µL.

La réaction de séquence correspond à une dénaturation à 96°C pendant 1 min et 25 cycles d'amplification incluant une dénaturation à 96 °C pendant 10sec, une hybridation à 50°C pendant 5 sec et une élongation à 60°C pendant 4 min.

d. Purification du produit de la réaction de séquence

Les produits de la réaction de séquence sont purifiés avec 80 µL d'éthanol 76% et sont laissés pendant 15 min à température ambiante. Puis la plaque est centrifugée pendant 35min à 3220 g à 4°C. Le surnageant est ensuite retiré en renversant la plaque. Ensuite la plaque, placée à l'envers dans les portoirs de la centrifugeuse, est centrifugée pendant 1 min à 210 g. Enfin elle est laissée sur la paillasse quelques minutes afin de laisser évaporer l'éthanol.

e. Séquençage

Les séquences purifiées sont ensuite suspendues dans 20µL d'eau milliQ® et migrent sur un séquenceur 16 capillaires *ABI PRISM 3130*xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Les produits de la réaction de séquence migrent le long des capillaires à une vitesse proportionnelle à leur taille. Lorsque le front de migration de ces fragments marqués est au niveau du laser, celui-ci excite les molécules fluorescentes, qui émettent à une longueur d'onde spécifique de chaque nucléotide. Cette fluorescence est enregistrée par une caméra et les résultats sont ensuite analysés sous forme de chromatogrammes. Les chromatogrammes sont analysés avec le logiciel Genalys 2.8.2b, lequel assigne un nucléotide en fonction du pic de fluorescence et permet de comparer les séquences avec une séquence de référence.

f. Génotypage individuel

Il s'agit de déterminer le génotype des allèles identifiés en séquence pour chaque individu de notre cohorte.

Le génotypage est fait par la technique de Taqman®, selon le protocole du fabricant. Chaque sonde possède un inhibiteur de fluorochrome et un fluorochrome spécifique d'un allèle particulier. Lorsque la réaction de polymérisation commence, l'enzyme possédant une activité exonucléase, dégrade la sonde. Le fluorochrome est alors libéré de son inhibiteur et émet une fluorescence à une longueur d'onde donnée, après excitation. Ainsi, 20ng d'ADN sont mélangés à un mix ABgene (contenant une polymérase, des dNTPs et du tampon), ainsi qu'aux sondes marquées et aux amorces spécifiques du polymorphisme d'intérêt (volume final : 5µL). L'amplification se fait après activation de l'enzyme (15 min à 95°C), puis un nombre variable (entre 40 et 70) de cycles d'amplification : dénaturation de l'ADN : 15sec à 95°C, hybridation des amorces et de la sonde et élongation et lecture pour les mise aux points: 1min à 60°C. La lecture se fait soit en fin de chaque cycle pour la quantification, soit en point final pour le génotypage. L'appareil utilisé était le *7900HT Fast Real-time PCRSystem* d'Applied Biosystems.

Choix des sondes pour le génotypage

La Fréquence de l'Allèle Minoritaire (FAM) de chaque SNP est calculée à l'aide du logiciel Haploview v3.32, ainsi que le déséquilibre de liaison (DL) entre 2 SNP, afin de sélectionner les SNP qui sont informatifs (FAM>0,05). Seuls les SNP avec une FAM ≥0.05 et un DL <0,8 (estimé par r^2= $[P(MX)-P(M)P(X)]^2/[P(M)P(m)P(X)P(x)]$) sont retenus comme '*haplotype*

tagging SNP'. Les sondes spécifiques des SNP sélectionnés sont ensuite commandées auprès d'Applied Biosystem.

Analyse de la discrimination allélique.

Les analyses d'association allélique, génotypique et haplotypique ont été réalisées grâce au logiciel PLINK v0.99r (Shaun Purcell et al, the Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/index.shtml).

g. Recherche de polymorphisme par HRM

La technique de HRM pour *High Resolution Melting*, permet la détection de polymorphismes à partir d'une matrice d'ADN amplifée par PCR, grâce à l'analyse de la courbe de fusion de l'échantillon amplifié. Les amorces sont désignées à l'aide du logiciel Navigator (Transgenomic). Un mélange réactionnel est réalisé avec 5L de Master MIX LC480HRM, 1,2L $MgCL_2$, 0,4L d'amorce sens à 5pmol/L, 0,4 L d'amorce antisens à 5pmol/uL, 2L d'H2O, 1L d'ADN à 10ng/L, tel que le volume final soit de 10L. Préalablement, l'ADN a été dosé au Nanodrop, Thermo Scientic, et amplifié pour une PCR sensible afin de tester sa qualité. Le mélange est placé dans l'appareil de mesure qui est le *LightCycler 480 Instrument II*, Roche Applied Science. Le mélange est amplifié, avec une étape de préincubation de 10 min à 95°C, puis 45 cycles d'amplification comprenant 15 sec à 95°C, 15 sec à différentes températures d'hybridation des amorces : 62°C pour l'exon 1 et 60°C pour l'exon 2 et une étape d'élongation à 72°C pendant 25 sec. Une élongation finale à 72°C pendant 10 min achève cette étape d'amplification. Ensuite l'échantillon est dénaturé à 95°C pendant 1 min, puis sa température est abaissée, pendant 1min à 40°C, permettant la formation d'hétéroduplex et d'homoduplex. Ensuite, la température est augmentée progressivement de 55°C à 95°C d'1°C/sec. Au cours de cette étape, l'ADN se dénature et l'appareil mesure la libération de fluorescence, qui sera modifiée en présence d'un polymorphisme. Enfin l'échantillon est placé à 40°C pendant 30 sec. Un fragment d'ADN, d'une taille maximum de 300pb est amplifié en utilisant un mix de PCR contenant un intercalant fluorescent spécifique de l'ADN double brin. Cette méthode nécessite des petites tailles de PCR afin d'avoir une meilleure sensibilité et de limiter le risque de présence de plusieurs polymorphismes. Cette technique a l'avantage d'être qualitative et quantitative. Elle est aussi plus rapide et moins coûteuse que celle du séquençage réalisé au cours de cette thèse. Elle nécessite, toutefois, une étape de séquençage pour les échantillons ayant un profil atypique, qui pourrait sous-tendre un polymorphisme.

h. Etude transcriptionnelle

- **Extraction de l'ARN**

Pour extraire les ARN présents dans les cellules des lignées lymphoblastoïdes, nous avons utilisé le kit *RNeasy Mini Kit* (Quiagen Gmgh, Hilden, Allemagne), conformément au protocole du fabricant. Les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon adapté puis homogénéisées. Afin d'assurer de meilleures conditions de fixation de l'ARN, de l'éthanol est ajouté. Le lysat est ensuite chargé sur une colonne avec membrane de silice. L'ARN est lié à la membrane, tandis que les autres molécules sont évacuées. Enfin l'ARN est élué avec de l'eau distillées stérile dépourvu de RNase.

- **Rétrotranscription**

Cette technique permet la synthèse d'ADNc à partir d'ARN. Un premier mélange réactionnel et réalisé, contenant 1L d'ARN (1ug/uL), 1L d'hexamères randomisés (50ng/uL), 1L de dNTP (10mM) et 7L d'eau traitée au DEPC, tel que le volume final soit de 10L. Ce premier mélange est mis à 65°C pendant 5 min afin de dénaturer l'ARN (structures secondaires), puis à 4°C pour le maintenir dénaturé. Un deuxième mélange réactionnel est réalisé, avec 2µL de tampon RT à 10x, 4µL de $MgCl_2$ à 25mM, 2µL de DTT à 0,1M, 1µL de RNAse out à 40U/µL et 1µL de Superscript III Invitrogen à 100U/µL, tel que le volume final soit de 10µL. Ce dernier mélange réactionnel est ajouté au premier et est incubé 10 min à 25°C, afin de fixer les hexamères, puis 50 min à 50°C, qui est la température optimale d'activité de la Superscript III, puis 5 min à 85°C, pour dénaturer la RNAse out et la conservation se fait à 4°C. Ensuite 1µL de RNAse H est ajouté, cette enzyme est spécifique des hétéroduplexes et les dégrade. L'échantillon est alors à 37°C pendant 20 min. Enfin 30µL d'eau sont ajoutés. Si la RT-PCR a une efficacité de 1, la concentration finale attendue d'ADNc est de 20ng/L.

- **Quantification par PCR**

La quantification des ADNc a été réalisée par SYBR Green, qui est un agent intercalant de l'ADN double brin. Le mélange réactionnel contient 10 µL de MESA GREEN qPCR MasterMix (Eurogentec), 0,4µL d'amorce sens et antisens, de telle sorte que leur concentration finale soit de 0,2µM, 1µL de ADNc et de l'eau distillée telle que le volume final soit de 20µL. La Taq polymérase est activée pendant l'incubation à 95°C pendant 5min, puis 40 cycles d'amplifications sont réalisés avec une dénaturation à 95°C pendant 15 sec,

une hybridation à 60°C pendant 30 sec, et une élongation de 50 sec à 72°C. A chaque fin de cycle la fluorescence est mesurée par l'appareil qui est le Mastercycler ep realplex^2 S, Eppendorf. Le gène endogène de référence est *ACTB* et le calibrateur est l'ADNc de cerveau total. Chaque échantillon est tripliqué. L'analyse des résultats est faite par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

i. Recherche de CNV

- **Détection de variations du nombre de copies**

Les CNV ont été détectés, à l'aide du logiciel Snipeep (R. Toro, Institu Pasteur, France) par la comparaison du niveau de fluorescence sur l'ensemble du chromosome et par perte d'hétérozygotie. La taille des variations a été estimée. La *Database of Genomic Variants* (DGV http://projects.tcag.ca) a permis de savoir si le variant est unique. Le site de l'Université de Santa Cruz (*UCSC Genome Browser* ; http://genome.ucsc.edu) précise dans quelles régions chromosomiques se situent les CNV. D'autres sites tels que *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim), *Ensembl* (http://www.ensembl.org), *GeneCards* (http://www.genecards.org), *Allen Brain Atlas* (http://www.brain-map.org), *Pubmed* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) ont aidé à compléter nos recherches.

- **Sélection des variants**

Les critères retenus sont :

-Modification possible de l'expression génique ou le fonctionnement d'une protéine;

-CNV spécifiques des patients, c'est-à-dire non référencés dans les bases de données internationales

-les gènes touchés par leCNV sont exprimés dans le cerveau

- **Validation des CNV par PCR quantitative**

Nous avons pris un couple d'amorces dans chaque région possiblement remaniée et dans deux régions de référence et nous avons amplifié ces régions chez les patients ainsi que deux témoins afin de valider la présence de délétion ou duplication. Ces PCR quantitatives sont réalisées avec le kit MESA GREEN qPCR selon les instructions du fabricant (Eurogentec, Liège, Belgique), qui a été lue sur le thermocycleur « Mastercycler ep Realplex2S »

(Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Le SYBR Green est un intercalant de l'ADN qui fluoresce, après excitation, lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Nous avons utilisé pour chaque réaction 0,3 µM de chaque amorce afin d'amplifier 20ng d'ADN dans un mélange réactionnel de 25 µl. Chaque échantillon est réalisé en triplicat et est comparé avec deux échantillons de référence ne portant pas de modification du nombre de copies ni dans les régions d'intérêt, ni dans les séquences de références. Après une pré-dénaturation de 5 minutes à 95°C, 40 cycles d'amplification ont été réalisés selon les conditions suivantes : 15 secondes de dénaturation à 95°C, hybridation des amorces à 60°C pendant 20 secondes et 50 secondes d'élongation à 68°C. A chaque fin de cycle, le thermocycleur excitait les molécules du SYBR Green liées à l'ADN double brin et enregistrait leur émission de fluorescence. La méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a permis de quantifier le nombre de copie de la région testée. Si la région est délétée, elle est présente au maximum une copie, soit, soit $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,5$. Si la région possède le bon nombre de copie, alors $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$. Enfin si la région est dupliquée, alors le $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,5$.

- **Caractérisation des points de cassure**

L'objectif de cette méthode était d'amplifier les régions flanquant les points de cassure des délétions. Nous avons utilisé 0,4 µM d'amorce sens et antisens afin d'amplifier 250ng d'ADN dans un mélange réactionnel de 25 µl comprenant 0,8 mM de dNTP, du tampon à 1X, 5 mM de $MgCl_2$ et 0,5U de Taq polymérase Takara LA spécifique des grands fragments (>1kb), fournie par le kit TaKaRa LA Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japon). Après une pré-dénaturation d'une minute à 94°C, 30 cycles d'amplification ont été réalisés selon les conditions suivantes : 30 secondes de dénaturation à 94°C, une hybridation des amorces à 58°C pendant 30 secondes et une élongation à 68°C, dont la durée dépendait de la taille du produit à amplifier, nous avons compté 1 min/kb à synthétiser. L'ADN d'un individu témoin ne portant pas la délétion est aussi amplifié. Les amplicons sont ensuite déposés sur gel d'agarose et leur séquence est analysée.

Clonage

Le cDNA de l'isoforme majeure de *CADPS,* KIA1121 est inséré dans le plasmide pBluescript SK+ (2958 pb). Des bactéries compétentes DH5 (Invitrogen) ont été transformées avec ce

plasmide, pour l'amplifier. L'ADN du cDNA a été séquencé. Une mutation synonyme a été trouvée et répliquée dans le dernier exon du gène. Cette mutation a été corrigée, à l'aide d'amorces adéquates et du kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagen).

Le plasmide corrigé pBluescript-CADPS (10 g) et le vecteur pCDNA3.1 sont digérés par l'enzyme KpnI, 3h à 37°C. Le vecteur pCDNA3.1 est déphosphorilé par la CIP, 1h à 37°C. Le plasmide corrigé est déposé sur gel. L'insert, migrant à la taille de 5,4 kb est extrait du gel, à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction. Une ligation est réalisée entre le plasmide pCDNA3.1 digéré et déphosphorylé et l'insert extrait, de telle sorte que le ratio 1:3 soit respecté, soit 50 ng de plasmide pour 150ng d'insert. Les bactéries DH5 sont ensuite transformées et étalées sur boîtes de Pétri contenant de l'Ampicilline. Différents clones sont ensuite réalisés à l'aide du kit de mutagénèse, chacun portant une ou des mutations identifiées lors du séquençage de *CADPS*. L'intégralité des séquences de ces clones est vérifiée.

Pour insérer le cDNA de *CADPS* dans pF(syn)W-RBN (8425 bp), un site de digestion par NheI est créé, à l'aide du kit de mutagénèse, en amont du promoteur T7, dans le plasmide contenant le cDNA sauvage de *CADPS*. Les amplicons et le plasmide pF(syn)W-RBN sont ensuite digérés par NheI-HF et EcoRI-HF. Les amplicons et le plasmide digérés sont ensuite purifiés grâce au kit QIAquick Gel Extraction. Puis une ligation est réalisée en respectant le ratio 1:3, suivie d'une transformation. Puis les mutations identifiées lors du séquençage de CADPS, sont à nouveau insérées dans le cDNA, à l'aide du kit de mutagénèse précédemment cité, avec les différentes amorces, spécifiques de chaque mutation. La totalité de la séquence codante de chaque clone est vérifiée par séquençage.

Culture cellulaire

a. Protocole de transfection, plaque 6 puits, cellules COS, Lipofectamine 2000

Les cellules à transfecter sont mises en culture dans une plaque à 6 puits. Pour ce faire, les cellules sont trypsinées et reprises dans 8mL de milieu sans antibiotique. Elles sont ensuite étalée telles que 4.10^5 cellules soient dans 2mL de milieu complet (DMEM+ XX mM Glutamine + 10% de SVF) par puits. Le premier jour, les cellules sont transfectées. L'ADN plasmidique (1,6µg) est dilué dans du milieu Opti-MEM ou DMEM + XX mM Glutamine

sans sérum et sans antibiotique pour un volume final de 100 µL. Le mélange est agité doucement. La Lipofectamine 2000 est mélangée doucement avant utilisation, puis 4µL de Lipofectamine 2000 sont dilués dans le milieu Opti-MEM ou DMEM + XX mM Glutamine sans serum et sans antibiotique pour un volume final de 100 µL. Le mélange est incubé 5min à température ambiante. Les 100µL d'ADN plasmidique sont mis dans les 100µL de Lipofectamine 2000 (ce sens permet d'éviter de casser les complexes lipidiques). Le mélange est agité doucement pendant le versement et incubé pendant 20 min à température ambiante. Les 200µL sont déposés au goutte-à-goutte en répartissant bien dans chaque puits. La plaque est ensuite agitée doucement afin d'homogénéiser les complexes. Puis elle est placée dans l'incubateur à 37°C, 5% de CO_2, pendant 24h.

Les cellules sont ensuite lysées, si elles sont à moins de 95% de confluence. Pour cela, le milieu de chaque puits est retiré. Les cellules sont lavées doucement avec 2mL de PBS. Les cellules sont ensuite raclées du fond des puits avec une raclette et transférées dans un tube de 2 mL, puis centrifugées à 1500g pendant 5-10 min. Le culot est ensuite resuspendu dans 200µL de RIPA + inhibiteur de protéases et vortexé. Les cellules sont incubées pendant 20 min dans de la glace, puis centrifugées pendant 20 min à 4°C à la vitesse maximum (15000g). L'ADN, à l'interface culot-surnageant, sous forme gélatineuse est retiré. Le surnageant est récupéré et congelé à -80°C. Les protéines sont ensuite dosées. Une gamme de concentration est réalisée à partir d'une ampoule de BSA, reprise dans de l'eau. Le réactif *Coomassie (Bradford) Protein Assay* commercialisé par Pierce est un environnement acide qui contient du bleu de Coomassie auquel les protéines vont se lier. Le réactif bleu va alors changer de couleur pour le marron. Les échantillons sont dilués au $5^{ème}$ dans de l'eau. Cinq µL d'échantillon sont mis dans 150 µL de réactif pour protéine par puits d'une plaque, pour une plaque de cellules de 24 puits transparente Bradford 96. L'absorbance est alors mesurée à 595nm, qui est la longeur d'onde moyenne entre les deux extrêmes du réactif.

b. Western Blot

Préparation des gels

Le gel est coulé à l'aide de cassettes commercialisées par Invitrogen.

	Running gel = gel de migration (**7%** pour 140 kD)	Stacking gel = Gel de concentration (toujours à 5%)
Tris 1,5M (pH 8.8 GDM et pH6.8 GDC)	2,1 mL	250 µL
Acrylamide 40% (toxique)	1,4 mL	250 µL
SDS 10%	80 µL	20 µL
Persulfate d'Ammonium	80 µL	20 µL
H2O	4,34 mL	1,48 mL
Temed	6 µL	2 µL
Volume final	8 mL	2,5 mL

Dénaturation et Migration

Trois µL de bleu de Laemmli contenant du -Mercaptoéthanol sont ajoutés au 27 µL de protéines. Les échantillons sont dénaturés 5 min à 95°C. Entre 20-30µg de protéines est déposé par puits. Les échantillons sont mis à migrer pendant 1h45 à 90V.

Transfert

La membrane est incubée dans du méthanol pur pendant 2-3 min, puis rincée. La membrane est déposée dans du tampon de transfert, ainsi que les composants utilisés pour le transfert. La membrane est ensuite montée dans la cellule entre un papier whatman et plusieurs éponges. De l'eau froide est placée dans la cuve et du tampon de migration dans la cellule. Le transfert se fait pendant 2h à 4°C à 170 mA.

Coloration au rouge ponceau

Afin de vérifier la qualité du transfert, une coloration au rouge ponceau est effectuée. La membrane est incubée dans du rouge ponceau 5-10 min sur table agitante, puis rincée 2-3 fois avec de l'eau distillée. La membrane humide est ensuite celée dans du papier transparent, pour être photocopiée.

Immunodétection

La membrane est placée dans un milieu contenant du lait (PBS tween 0.005%, 5% de lait en poudre écrémé régilait), pendant 1h sur table agitante. La membrane est ensuite celée et incubée dans 3mL de milieu contenant l'anticorps I^{aire}, à 4°C toute la nuit, sur table agitante. Puis trois lavages de 10 min au PBS sont effectués, à température ambiante, sur table agitante. La membrane est alors incubée avec l'anticorps II^{aire} dans les 47mL restants, pendant 1-2h sur table agitante à température ambiante. A nouveau, la membrane est lavée 3 fois 10 min au PBS, à température ambiante, sur table agitante. Puis la membrane est révélée avec les réactifs Amersham ECL Plus™.

c. Immunocytochimie avec anticorps secondaire fluorescent

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de 12 puits contenant dans leur fond, une lamelle. Le premier jour, le milieu de culture est retiré après 24h de culture, les cellules sont rincées avec 500 µL de Tampon Phosphate (S), puis elles sont fixées avec 500 µL de Paraformaldéhyde à 4%, faite dans du Tampon Phosphate pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont à nouveau rincées dans du Tampon Phosphate, puis les milieux sont bloqués avec 500µL de solution de bloquage soit du tampon Tris-Phosphate contenant de la *Bovine Serum Albumine*, pendant 1h à température ambiante et sur table agitante. Le deuxième jour, 200 µL d'Anticorps I^{aire} dilué dans la solution de bloquage sont mis par puits sur la nuit à 4°C sous agitation douce. Le troisième jour, 3 lavages de 10 min sont faits avec du tampon phosphate à température ambiante. Puis 500µL d'Anticorps II^{aire} dilué dans la solution de bloquage sont mis par puits, puis laissés 1h à l'abri de la lumière à température ambiante sous agitation. A nouveau, les cellules sont rincées 3 fois dans du tampon phosphate à température ambiante. Une microgoutte de solution fixation à base de DAPI est mise sur une lame à l'emplacement des lamelles. Les lamelles sont déposées sur la lame, de telle sorte que les cellules soient en contact avec la solution de fixation. Après 5 min d'attente, les lamelles sont fixées à la lame, puis observées au microscope.

Composition des Tampons

-Tampon Phosphate : 0,2M pH 7,4 (durée de vie : 1 semaine) pour 100mL

Solution A : NaH2PO4 (0.2M) 19 mL + Solution B : Na2HPO4 (0.2M) 81mL

-Solution de bloquage

Phosphate buffer + Triton (100X) 0,1% + BSA 1% ou Goat serum 5% (0,1% de gélatine)

Chapître III : Etude de la région 3p14

La région 3p14

a. La liaison de la région 3p14 aux troubles bipolaires

Le trouble bipolaire est une pathologie complexe pour laquelle une composante génétique a été mise en évidence. Depuis plusieurs décennies, les études génétiques peinent à identifier des gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaires. L'hétérogénéité clinique et génétique du trouble, ainsi que la composante environnementale et son interaction probable avec la composante génétique rendent ces recherches d'identification difficiles. Les recherches actuelles menées par notre laboratoire et d'autres équipes internationales ont montré que le trouble bipolaire à âge de début précoce était plus homogène cliniquement avec davantage de symptômes psychotiques durant les épisodes thymiques, davantage d'épisodes mixtes, de conduites suicidaires, de cycles rapides, de comorbidités avec le trouble panique, le trouble de l'hyperactivité avec déficit attentionnel et le mésusage de toxiques. Les patients atteints de trouble bipolaire à début précoce montrent une plus grande agrégation familiale (Baron *et al.*, 1981, Strober *et al.*, 1988, Pauls *et al.*, 1992, Strober, 1992), avec un risque multiplié par 4 pour les apparentés de développer un trouble bipolaire comparé à des apparentés de patients ayant un âge tardif d'apparition des symptômes (Strober, 1992). Les études de ségrégation ont montré que la transmission des troubles bipolaires à début précoce était plus simple et impliquerait un gène majeur associé à un fond génétique polygénique (Grigoroiu-Serbanescu *et al.*, 2001).

En 2006, notre équipe publiait une étude de liaison sur l'ensemble du génome de 87 paires de germains atteints de troubles bipolaires à début précoce. L'analyse en multipoint du LOD score non paramétrique a suggéré 8 régions de liaison avec des valeurs de $p<0,01$: les régions 2p21, 2q14.3, 3p14, 5q33, 7q36, 10q23, 16q23 et 20p12. La région 3p14, présente, pour une analyse de liaison multipoint non paramétrique, le LOD score non paramétrique (NPL) le plus élevé de l'étude avec une valeur de 1,65 ($p=0,004$) pour le phénotype étroit (BPI avec un âge d'apparition des premiers symptômes≤21 ans) et 3,51 ($p=0,0002$) pour le phénotype large (UP si l'âge d'apparition est ≤21 ans, BPI&II, SCA). Seulement 29 paires de germains sont inclues

dans l'analyse de liaison du phénotype étroit et pourraient expliquer une diminution de puissance entre les deux analyses. Une nouvelle analyse a été réalisée en densifiant en marqueurs les régions ayant un contenu informatif inférieur à 75%, soit les régions 3p14, 10q23, 16q23 et 20p12. Les valeurs des NPL des régions 3p14 et 20p12, augmentent avec l'analyse de liaison des marqueurs additionnels : pour la région 3p14, NPL_{large} =3,83 (p=0,00005), $NPL_{étroit}$ =1,7 (p=0,003), pour la région 20p12, NPL_{large} initialement de 2,25 augmente jusqu'à 2,5. Les scores de NPL des autres régions testées diminuent. L'étude de simulation sur génome entier a montré que la liaison de région 3p14 avec les troubles bipolaires était significative avec un risque de premier degré de 0,05. Peu d'études de liaison font état de valeur de NPL supérieure à 3,83. Un excès d'allèles maternels partagés ont été reportés dans cette région ($OR_{maternel}$=9,3 ; p=0,008).

En 2011, notre équipe a élargi cette étude princeps en incluant 51 proposants supplémentaires, pour un total de 138 paires de germains, avec 53 paires concordantes pour l'âge de début des symptômes et en ajoutant des marqueurs si bien que l'informativité a été augmentée à 90%. L'analyse multipoint de liaison de la région 3p14 avec les troubles bipolaires a été confirmée avec un MLS_{large}=1,70 (p=0,005) et un $MLS_{étroit}$ =1,65 (p=0,004) pour *Maximum Likelihood Score*. Le test d'hétérogénéité génétique n'a pas mis en évidence d'hétérogénéité génétique dans la région (Mathieu *et al.*, 2010). A ce jour, la région 3p14 est détectée dans plusieurs autres études de liaison avec une valeur de p<0,01 (McInnes *et al.*, 1996, Cichon *et al.*, 2001, Kelsoe *et al.*, 2001, Radhakrishna *et al.*, 2001, Fallin *et al.*, 2004, Lopez de Lara *et al.*, 2010). Ces données écartent la possibilité que la liaison suggestive trouvée en 3p14 soit un résultat faux-positif.

Le gène *SNAP25*, situé en 20p12, code une protéine de 25kDa associée aux synaptosomes. Cette protéine est localisée à la membrane plasmique et est essentielle à la fusion vésiculaire et la libération de neurotransmetteurs. Au laboratoire, nous avons récemment mis en évidence une association entre le trouble bipolaire à début précoce et un variant localisé dans le promoteur du gène *SNAP25*. Par ailleurs, des individus homozygotes pour ce variant présentent, dans le cortex préfrontal, un niveau plus élevé d'ARNm de l'isoforme majeure du gène chez l'adulte (Etain *et al.*, 2010). Ainsi, ce variant pourrait prédisposer au trouble bipolaire à début précoce. L'objectif de ma thèse était donc d'explorer les gènes de la région 3p14, dont les fonctions pouvaient être directement liées à ce mécanisme moléculaire, afin d'identifier de nouveaux gènes de vulnérabilité au trouble bipolaire.

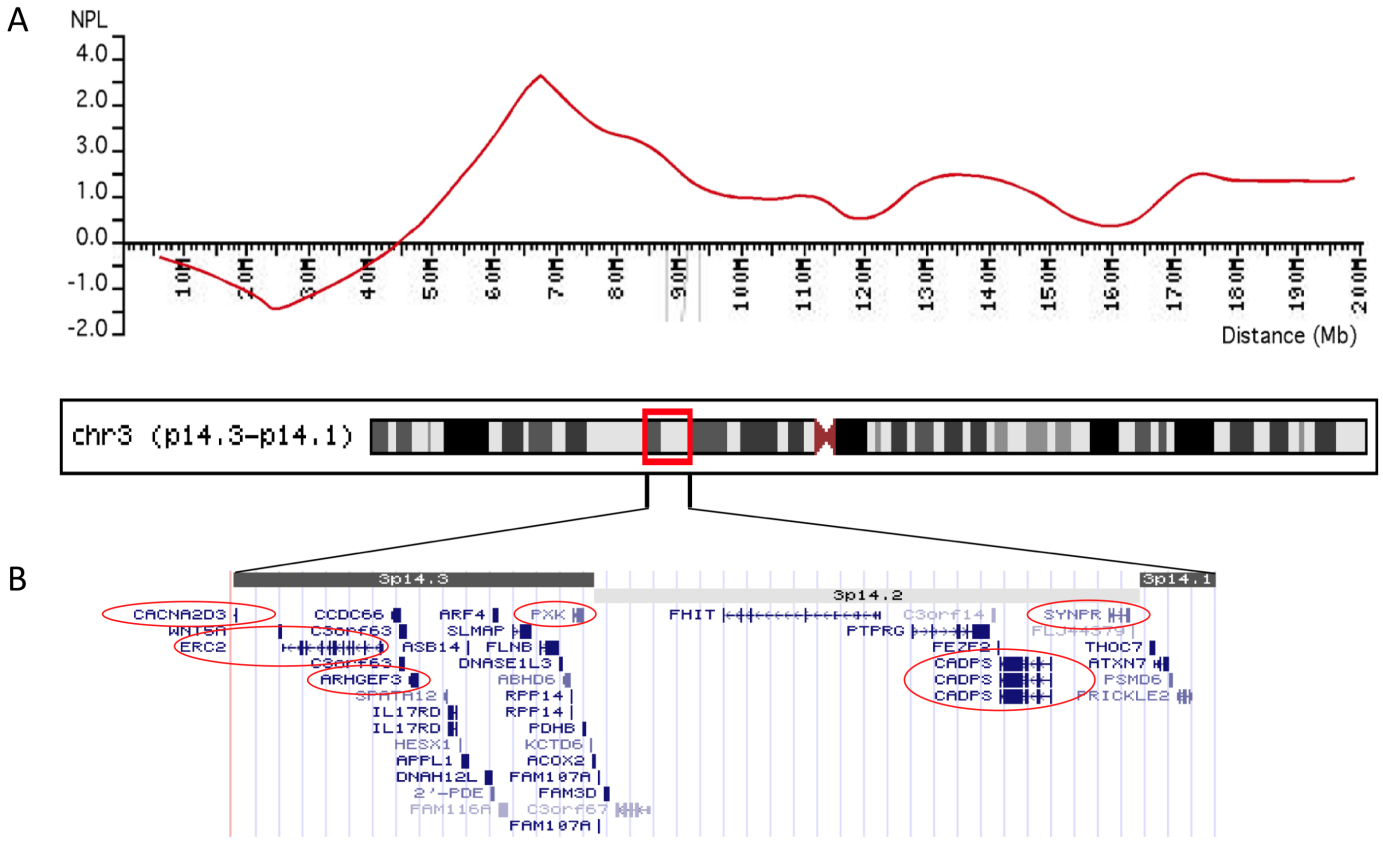

Figure III.1 : La région de liaison 3p14 aux troubles bipolaires. En A) L'analyse de liaison multipoint non paramétrique révèle un pic de liaison dans la région 3p14 avec le trouble bipolaire. En B) Composition génétique de la région 3p14. Les gènes candidats à la vulnérabilité aux troubles bipolaires sont entourés.

La région 3p14 s'étend sur environ 10cM (D3S3717-D3S3635) et montre un pic de liaison pour le marqueur D3S1300. Elle contient 39 gènes référencés et 16 gènes sont exprimés dans le système nerveux central. Parmi ces gènes, six sont de très bons candidats à la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Ces gènes sont *CACNA2D3*, *CAST* ou *ERC2*, *ARHGEF3*, *PXK*, *CADPS* et *SYNPR* (figure III.1). Ils ont été retenus du fait de leur fonction directe ou indirecte dans la libération de neurotransmetteurs à la synapse, mécanisme mis en cause par les résultats obtenus lors de l'étude du gène *SNAP25*. La membrane plasmique des neurones est polarisée, grâce à différentes pompes, notamment la Na/K ATPase, modulée par la protéine PXK (*PX domain containing serin/thréonin kinase*). Lors d'un potentiel d'action, la membrane plasmique se dépolarise, entraînant une augmentation d'ions calciques cytoplasmiques, grâce entre autre à des canaux calciques voltages-dépendants dont CACNA2D3 est une sous-unité. Les vésicules synaptiques, migrent grâce à des protéines d'échafaudage synaptique, telle que BASSOON avec laquelle CAST (*cytomatricix protein p110*) interagit et régulerait la libération de neurotransmetteurs. Ces vésicules, suite à l'influx calcique, apprêtées, vont libérer, lors de la fusion synaptique, leur contenant dans la fente synaptique grâce à l'interaction de protéines clés telles que SNAP25, CADPS (*Ca^{2+}-dependant secretion activator isoform1*) et la Synaptoporin. La protéine ARHGEF3 (*Rho Guanine nucleotide exchange factor 3*) forme un complexe avec les protéines G couplées aux récepteurs et stimule les signaux Rho-dépendants impliqué dans la transmission du signal en post-synaptique (figure III.2). Ces différentes protéines agissent à différents niveaux dans la transmission nerveuse. Il est remarquable qu'autant de gènes impliqués dans la neurotransmission soient localisés dans un si proche environnement génétique.

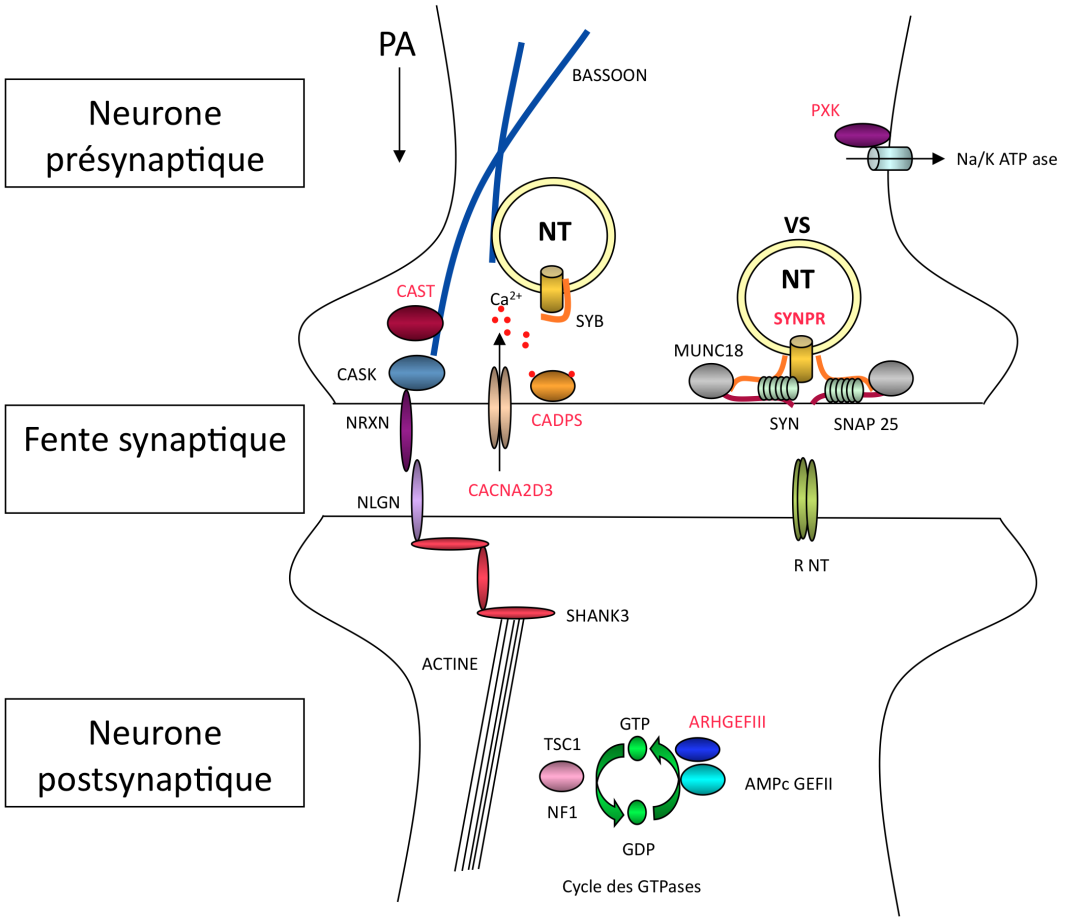

Figure III.2 : Représentation simplifiée de la synapse et des protéines en rouge, dont les gènes sont localisés en 3p14. NT=neurotransmetteur, RNT=récepteur aux neurotransmetteurs.

b. Recherche de rares micro-remaniements chromosomiques dans la région 3p14

La région chromosomique 3p14 contient le site fragile FRA3B situé dans le gène *FHIT* pour *Fragile Histidine Triad gene*. Ce gène est un suppresseur de tumeur. De nombreux variants du nombre de copies sont effectivement recensés dans ce gène, de taille plutôt grande (733kb), comme le montre la figure III.3. D'autres nombreux CNV sont trouvés dans le gène *PTPRG* (*Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type G*) et en amont de *MAGI1* (*membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing*). PTPRG est une protéine de signalisation intervenant dans différents processus cellulaires tels que la division cellulaire, la croissance cellulaire, la différenciation et la tumorigenèse. MAGI1 est une protéine d'échafaudage présente à la membrane plasmique et jouerait un rôle dans les jonctions cellule-à-cellule. Grâce à une étude d'association pangénomique réalisée au laboratoire, nous disposions de données de génotypage et d'intensité de fluorescence pour les 287 288 variants passant le contrôle qualité, testés chez 163 patients atteints de troubles bipolaires à début précoce et 69 cas familiaux, soit un total de 232 patients. Ces données ont été analysées grâce au logiciel SniPeep, qui aide à l'identification des micro-remaniements chromosomiques. Afin d'identifier des variants de vulnérabilité au trouble bipolaire, nous avons recherché des rares CNV exoniques dans la région 3p14 pour l'ensemble de ces patients. Ce passage au crible ne nous a pas permis d'identifier de rare CNV exonique dans la région.

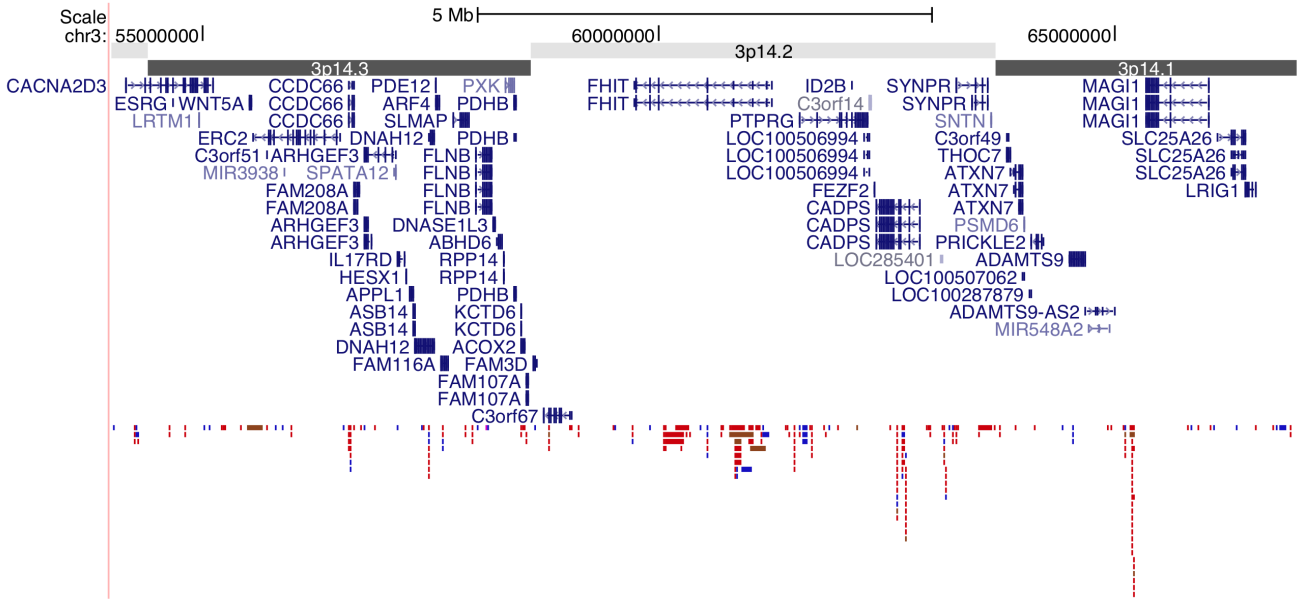

Figure III.3 : Les micro-remaniements chromosomiques de la région 3p14, d'après la *Database of Genomic Variants*. En bleu, les délétions, en rouge, les duplications et en marron les deux types de remaniements.

c. Recherche de variants fréquents associés aux troubles bipolaires dans la région 3p14

Les données de génotypage pangénomique des 484 patients bipolaires (dont 210 à début précoce) et des 1823 témoins ont été extraites, pour réaliser des études d'association allélique et génotypique. Au total, 1863 SNP couvrent les 13,9 Mb comprenant la région et son environnement génétique (53026714pb-66906996pb). L'homogénéité génétique de l'échantillon a été testée par une analyse d'échelonnement multi-dimensionnel. Après le contrôle qualité, l'estimation du coefficient d'inflation montre une bonne homogénéité génétique dans notre échantillon ($\lambda = 1,03$). La figure III.4 présente les résultats de ces études d'association. Aucune association allélique ne dépasse le seuil de significativité pour tests multiples. Par contre, une association génotypique spécifique du trouble bipolaire à début précoce dépasse ce seuil pour le variant rs1505587. Ce variant est localisé dans l'intron 3 entre les exons 3 et 4 du gène *SYNPR*. Ce variant montre une association génotypique non significative aux troubles bipolaires ($p=1,9.10^{-4}$; $\chi^2=17,03$; $OR_{CC/TT}=5,83$) et significative aux troubles bipolaires à début précoce ($p=8,3.10^{-9}$; $\chi^2=37,21$; $OR_{CC/TT}=11,1$) à l'échelle de la région. Puisqu'il était surprenant qu'aucune association allélique ne soit avérée pour ce variant, une erreur de génotypage a en premier lieu été suspectée. C'est pourquoi un génotypage des patients pour ce variant, a été réalisé par Taqman, chez 376 sujets bipolaires et a révélé 99,7% de concordance avec les données de génotypage pangénomique. De même, 287 témoins hypernormaux ont été génotypés et présentent les mêmes fréquences alléliques et génotypiques que les témoins génotypés du Centre National de Génotypage. Ces résultats confirment par une technique indépendante les données de génotypage du variant rs1505587. La répartition des 3 classes génotypiques montre que la population des individus testés est à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (p=1), par contre les différentes populations prises séparément ne le sont pas. Un déficit en hétérozygotes est observé chez les patients (p=0,002) alors qu'un excès d'hétérozygotes est observé chez les témoins (p=0,04). Ainsi le SNP rs1505587 n'est pas à l'équilibre d'Hardy-Weinberg, ni chez les patients, ni chez les témoins et ce qui rend les résultats difficiles à interpréter.

Afin de compléter l'étude de la région 3p14 et d'investir l'hypothèse de 'multiple rare variants for common diseases', nous avons concentré nos recherches sur l'étude de deux gènes candidats de la région 3p14 : *SYNPR* et *CADPS*.

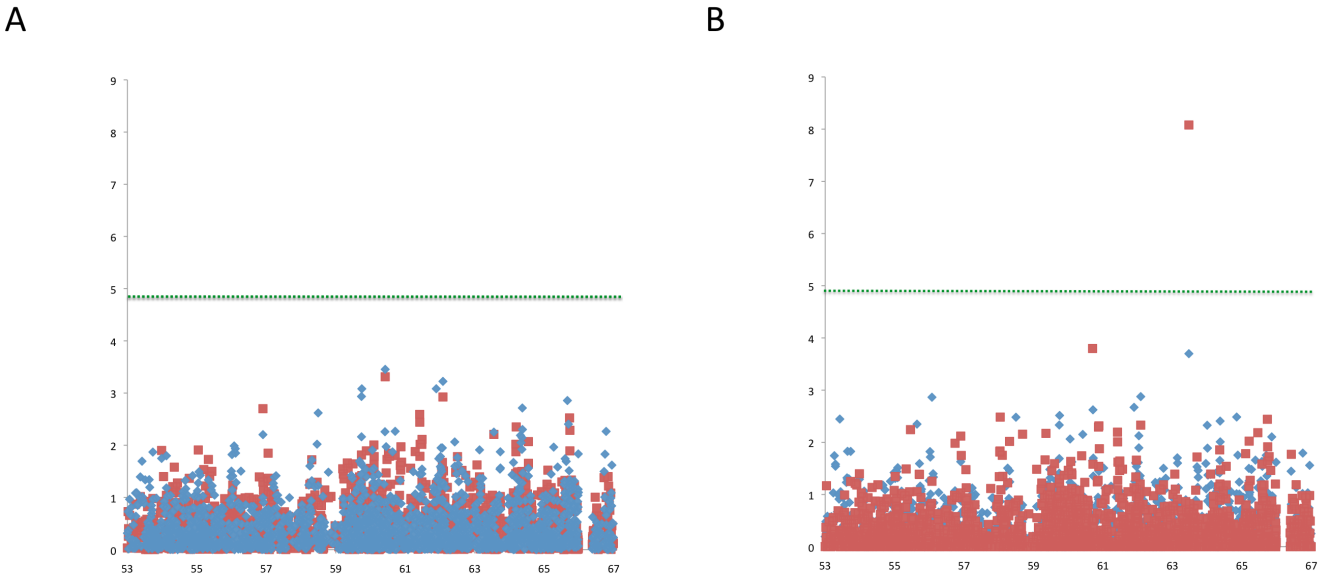

Figure III.4 : Etudes d'association allélique en A) et génotypique en B) dans la région 3p14. En rouge, les fréquences considérées des patients atteints de troubles bipolaires à début précoce sont comparées avec celles des témoins. En bleu, les fréquences considérées de tous les patients atteints de troubles bipolaires sont comparées à celles des témoins. En vert, la valeur seuil de significativité pour tests multiples. Des tests de Chi^2 sont réalisés pour chaque variant, les valeurs de p correspondantes sont représentées pour une meilleure visibilité en $-\log_{10}$, en fonction de la localisation du variant sur le chromosome 3 (en Mb).

SYNPR

Le gène *SYNPR* code la Synaptoporine. Il est spécifiquement exprimé, chez les rat, dans les surrénales et le cerveau, avec une distribution restreinte notamment aux structures télencéphalique, à l'amygdale, à l'hippocampe, au bulbe olfactif et à la rétine. La Synaptoporine est une abondante protéine membranaire, N-glycosylée, constitutive d'un complexe hétéromultimérique des membranes des vésicules synaptiques. Cette protéine de 37kDa, est composée d'un domaine MARVEL (*Myelin And Lymphocytes and Related proteins for VEsicule trafficking and membrane Link*) et d'une longue extrémité Cterminale cytoplasmique riche en sérines. Sa fonction est inconnue, mais elle appartient à la superfamille des Synaptophysines. Elle partage 58% d'homologie de séquence avec la Synaptophysine. Les deux protéines partagent 4 domaines transmembranaires et deux boucles hydrophiles intravésiculaires, alors que leur extrémités N et Cterminales exposées au milieu cytoplasmique sont divergentes. La Synaptophysine est impliquée dans de nombreux aspects de l'exocytose et de l'endocytose des vésicules synaptiques, notamment la régulation de l'assemblage du complexe SNARE (*pour Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*), la formation du pore de fusion, l'activation de l'endocytose et la biogenèse des vésicules synaptiques (Sun *et al.*, 2006). La fonction de la Synaptoporine est inconnue, cependant, du fait de sa localisation cellulaire, de sa structure primaire et de sa famille de protéines, il semblerait qu'elle soit impliquée dans les mécanismes d'exocytose et d'endocytose des vésicules synaptique. De plus, une augmentation de la quantité de transcrits du gène a été reportée dans les aires 8 et 9 de cortex dorsolatéral et dans l'aire 46 de cortex préfrontal de patients atteints de troubles bipolaires (Lopez de Lara *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que *SYNPR* pourrait être un gène de vulnérabilité au trouble bipolaire. C'est pourquoi une étude approfondie du gène a été réalisée à partir des données biologiques de patients atteints de troubles bipolaires et de témoins. Des variants de vulnérabilité ont été recherchés dans le gène et le niveau d'expression du gène a été comparé entre les patients atteints de troubles bipolaires et les témoins.

a. Recherche de variants dans SYNPR

- **Recherche de microremaniements chromosomiques dans SYNPR**

Plusieurs CNV sont référencés dans la *Database of Genomic Variants*, mais un seul enlève une séquence codante, plus précisément, il délète les trois derniers exons du gène de l'ADN issu de lignée lymphoblastoïde d'une personne âgée sans désordre neurologique (Simon-Sanchez *et al.*, 2007). Aucun micro-remaniement du gène n'a été identifié dans l'ADN des 232 sujets ayant participé à l'étude de recherche pangénomique de micro-remaniements chromosomiques.

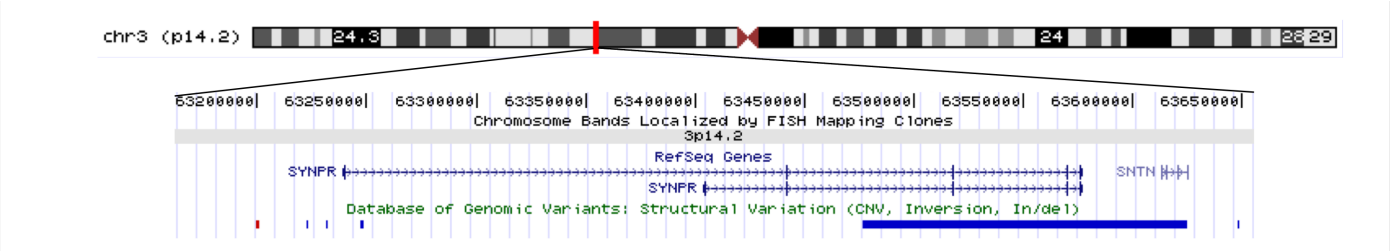

Figure III.5 : les différents CNV référencés dans ou à proximité du gène *SYNPR*. Les délétions sont représentées en bleu et les duplications en rouge.

- **Recherche de mutations dans SYNPR**

Le gène *SYNPR* s'étend sur 338 604 pb et est transcrit, selon deux isoformes qui partagent les exons 3 à 6. Du fait d'un promoteur alternatif, ces isoformes diffèrent au niveau de leur extrémité 5'. La première isoforme contient les exons E1A et E2A, le transcrit fait une taille de 2516 pb et code une protéine de 285 aa. La deuxième isoforme est composée des exons E1B, E2B et le transcrit fait 2355 pb, pour une protéine de 265 aa. Afin de trouver des mutations qui pourraient affecter la fonction de la protéine encodée, nous avons séquencé 500pb en amont de l'exon E1A et 1kb en amont de l'exon E1B, l'intégralité des séquences codantes, ainsi que les jonctions intron/exon et les séquences 5' et 3' UTR. Au total, l'ADN de 189 patients atteint de TBDP a été analysé. Nous avons identifié 23 variations nucléotidiques composées de 22 substitutions et d'une délétion d'un nucléotide (tableau III.1). Ces variations sont principalement localisées dans des séquences non codantes. En effet, 9

sont localisés dans les séquences 5' et 3'UTR, 4 dans les promoteurs et 8 dans les introns à proximité des exons. Seuls 2 variations sont trouvées dans les séquences codantes du gène : F193F et L20F (Figures III.5&6). La mutation L20F n'est pas référencée dans les bases de données internationales. Elle modifierait un acide aminé conservé au cours de l'évolution. En effet, il est présent chez les vertébrés où l'isoforme 1 de la Synaptoporine a été trouvée et il est également présent dans la Synaptophysine. L20 est un acide aminé hydrophobe localisé dans le premier domaine transmembranaire de la protéine (Figure III.7). La modification de cette leucine par une phénylalanine, bien que hydrophobe aussi, aurait un effet délétère sur la fonction de la protéine d'après les logiciels de modélisation Polyphen et SIFT. Malheureusement, nous n'avons pas l'ADN d'apparentés pour étudier la ségrégation du variant. La mutation L20F a été recherchée chez 163 patients supplémentaires et chez 263 sujets témoins. La mutation a été retrouvée dans l'ADN d'un patient et de deux témoins de cette nouvelle population. L'étude des 163 patients supplémentaires n'a pas permis de mettre en évidence de nouvelles mutations non synonymes dans le gène. Le Projet 1000 génomes a publié une seule mutation non-synonyme (rs74725596=Q273H) présente dans l'ADN d'individus caucasiens. Cette mutation, localisée dans le dernier exon du gène, d'après les logiciels Polyphen et SIFT aurait un effet bénin. Elle est présente sur 2 chromosomes sur 72 chromosomes étudiés. Le projet 1000 génomes a identifié 10 fois plus de mutations non-synonymes dans *SYNPR* chez des sujets témoins, que dans notre étude chez des sujets atteints de troubles bipolaires. Ces résultats suggèrent que les variants rares ne semblent pas surnuméraires dans l'ADN de patients bipolaires.

SNP	Identifiant	Position	HETObs	$FAM_{patients}$	Allèles	Analyse de ségrégation
1	rs6767876	63264201	0,12	0,06	G:A	Exclu
2	rs13317513	63264316	0,12	0,065	C:T	-
3	-	63264336	0,005	0,003	G:A	-
4	-	63264392	0,005	0,003	C:T	-
5	rs34988753 or rs11361811	63264786	0,438	0,381	G:_	-
6	-	63428574	0,01	0,005	A:T	Exclu
7	rs73110892	63428587	0,246	0,144	C:T	-
8	-	63428908	0,005	0,003	G:A	-
9	-	63429056	0,005	0,003	T:G	-
10	-	63429077	0,015	0,008	A:G	-
11	rs1451308	63466333	0,469	0,436	C:T	-
12	rs6772726	63466382	0,443	0,392	G:T	-
13	-	63466413	0,015	0,008	T:C	-
14	-	63542453	0,005	0,003	T:C	-
15	rs79425913	63595096	0,067	0,034	A:T	-
16	-	63600904	0,011	0,005	T:C	Exclu
17	rs34834899	63601462	0,195	0,118	G:A	-
18	rs35949509	63601523	0,444	0,312	G:T	-
19	-	63601559	0,005	0,003	T:A	-
20	-	63601732	0,011	0,005	T:C	-
21	-	63601951	0,026	0,013	A:G	-
22	rs3210560	63601962	0,508	0,416	T:C	-
23	rs79124557	63602093	0,01	0,005	C:T	-

Tableau III.1 : Récapitulatif des variations identifiées lors du séquençage de *SYNPR* et des résultats des analyses de ségrégation faites pour certains de ces variants.

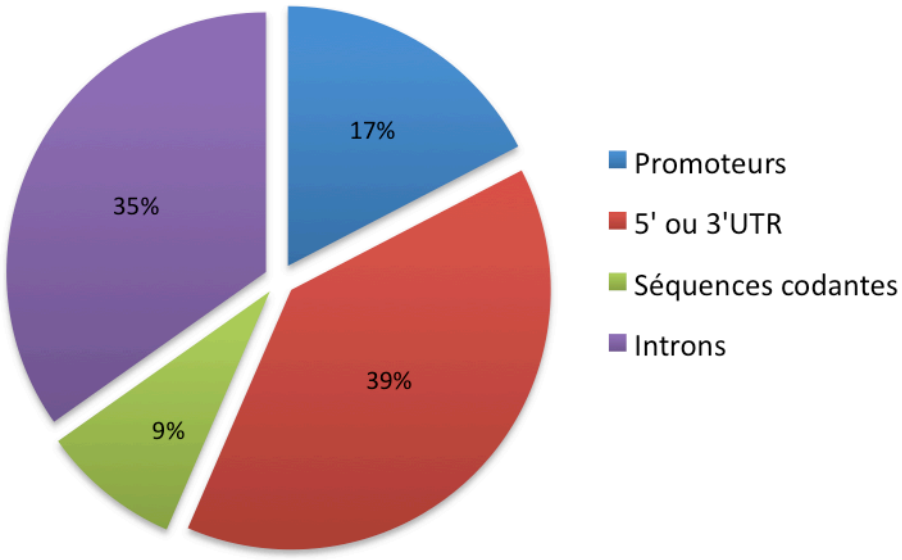

Figure III.5 : Proportion des localisations des variants identifiés lors du séquençage de *SYNPR*.

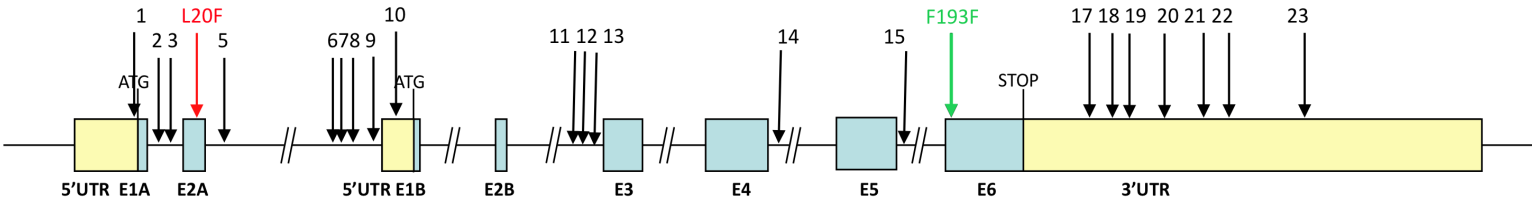

Figure III.6 : Représentation du gène *SYNPR* et localisation des variants identifiés lors du séquençage du gène.

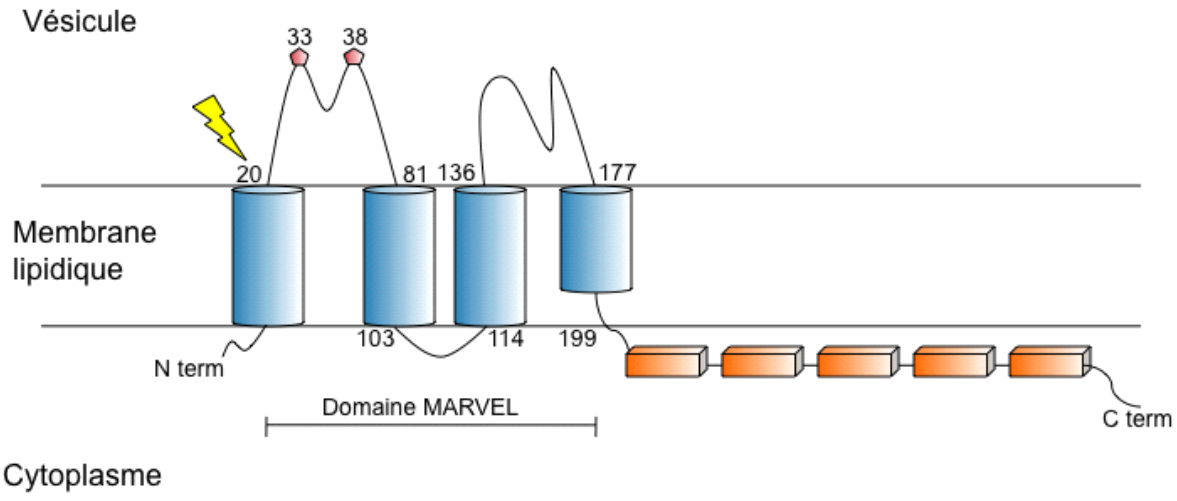

Figure III.7 : Modèle schématique de la structure tertiaire de la Synaptoporine. Les hélices α sont représentées par les cylindres bleus et constituent le domaine MARVEL, les parallélépipèdes symbolisent les deux sites de glycosylation de la protéine et en Cterm, on observe une queue de cinq répétitions riches en sérines.

- **Analyse succinte de la ségrégation de variants rares identifiés lors du séquençage**

Parmi les variants identifiés, 14 ont une fréquence de l'allèle minoritaire inférieure à 5%. Nous n'avons d'autres moyens pour étudier ces variants que d'étudier leur ségrégation au sein des familles lorsque nous avions l'ADN d'apparentés atteints de troubles bipolaires. Dans l'hypothèse d'un variant rare de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce ayant un effet majeur, l'hypothèse la plus parcimonieuse est que le germain atteint doit être porteur de la même mutation rare. Les variants 1, 6 et 16 sont absents de l'ADN du germain atteint. Ainsi, l'hypothèse la plus parcimonieuse est que ces variants ne semblent pas avoir de rôle dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, dans l'hypothèse d'un gène majeur de vulnérabilité.

b. Etude d'association avec les SNP identifies lors du séquençage

Parmi les 23 variants identifiés lors du séquençage du gène, 9 ont une fréquence de l'allèle minoritaire supérieure à 0,05 (Tableau III.1). Parmi ces 9 variants, 5 (11, 12, 17, 18, 22) avaient été identifiés lors d'un séquençage préliminaire et avaient un $r^2>0$,8 (Figure III.8). Ces 5 SNP ont été génotypés chez 452 patients (comprenant 192 patients atteints de trouble bipolaire à début précoce, 199 patients atteints de trouble bipolaire à début tardif et 66 patients atteints de troubles bipolaires avec un âge de début des troubles indéterminé) et 149 sujets témoins hypernormaux. Nous avons trouvé une association spécifique des patients atteints de trouble bipolaire à début précoce pour le variant 22 (χ^2 = 4,409, p=0,03575, OR=1,437). Ce variant est localisé en 3'UTR. Cette association ne résiste pas à la correction pour tests multiples. Différents modèles de transmission ont été testés en comparant les fréquences génotypiques des patients atteints de trouble bipolaire à début précoce avec les témoins. Les résultats suggèrent que la transmission serait dominante (χ^2=4,28 ; p=0,039). Les fréquences haplotypiques des patients atteints de trouble bipolaire à début précoce et des témoins ont été comparées, grâce à une fenêtre coulissante du 3' vers le 5'UTR du gène. L'haplotype 'TGGGT' est associé le plus significativement avec le trouble bipolaire à début précoce (χ^2=6,68 ; p=0,01). Cet haplotype englobe la presque totalité du gène et est plus fréquent chez les sujets témoins. Ainsi, il pourrait avoir un effet protecteur du trouble bipolaire à début précoce.

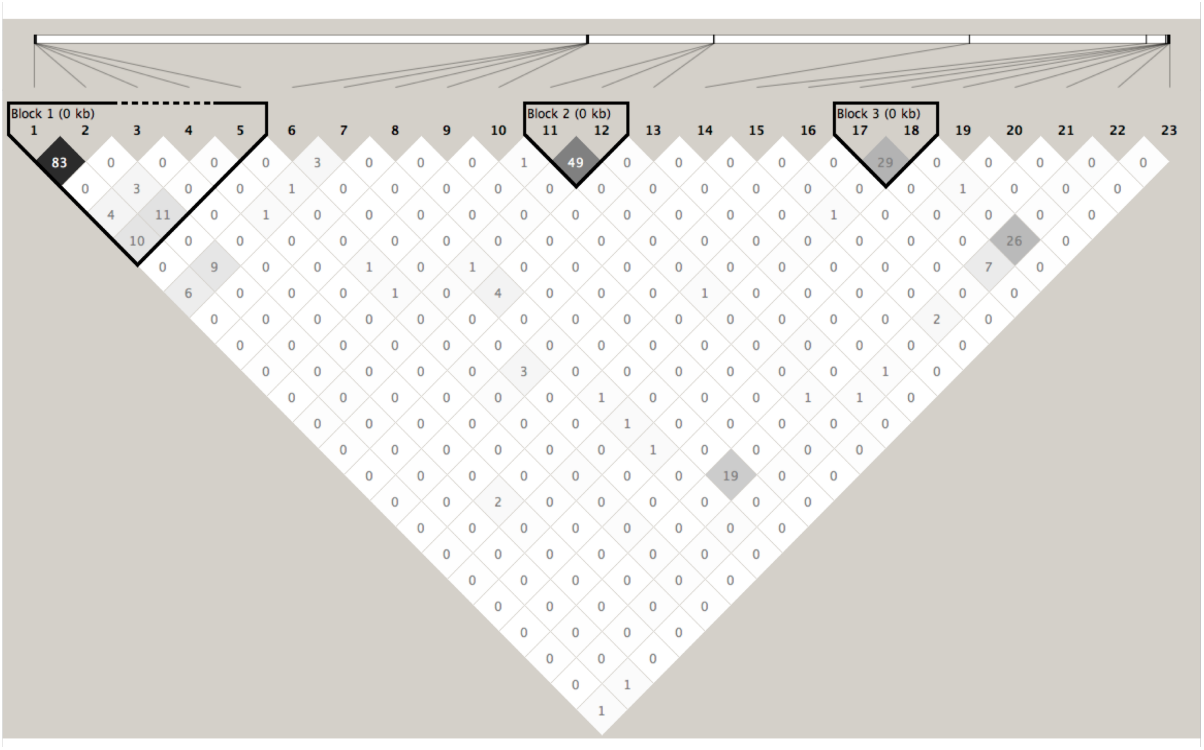

Figure III.8 : Carte de déséquilibre de liaison des variants identifiés lors du séquençage de *SYNPR*. Trois blocs de variants en déséquilibre de liaison ont été identifiés grâce au logiciel Haploview v3.32. Seuls, les variants 1 et 2 sont en déséquilibre de liaison avec un r^2>0,8 et pourraient être utilisés comme *tagging* SNP.

SNP11	SNP12	SNP17	SNP18	SNP22	Fréquence chez les patients TBDP	Fréquence chez les témoins	Chi^2	valeur de p
				T	0,58	0,66	4,41	0,03
			G	T	0,29	0,35	2,97	0,085
		G	G	T	0,29	0,35	3,01	0,08
	G	G	G	T	0,15	0,22	5,26	0,02
T	G	G	G	T	0,09	0,16	6,68	0,01

Tableau III.2 : Résultats de l'étude d'association haplotypique des variants identifiés lors du séquençage, entre les patients atteints de trouble bipolaire à début précoce et les sujets contrôles. FAM =Fréquence de l'allèle minoritaire, OR = Odd Ratio.

					Patients atteints de trouble bipolaire à début précoce			Patients atteints de troubles bipolaires à début tardif		
SNP	**Allèle minoritaire**	**$FAM_{patients\ TBDP}$**	**$FAM_{patients\ TBDT}$**	**$FAM_{témoins}$**	**Chi^2**	**valeur de p**	**OR**	**Chi^2**	**valeur de p**	**OR**
11	T	0,4298	0,4358	0,4835	1,677	0,1953	0,8052	1,326	0,2496	0,8251
12	T	0,4129	0,4218	0,3719	1,013	0,3141	1,188	1,495	0,2214	1,232
17	A	0,1152	0,09218	0,1116	0,081	0,8918	1,036	0,6033	0,4373	0,8085
18	T	0,2949	0,3212	0,3099	0,1535	0,6952	0,9315	0,08538	0,7701	1,054
22	C	0,4242	0,3994	0,3388	4,409	0,03575	1,437	2,262	0,1326	1,298

Tableau III.3 : Résultats de l'étude d'association des variants identifiés lors du séquençage, entre les différentes populations de sujets considérés. FAM =Fréquence de l'allèle minoritaire, OR = Odd Ratio. TBDP = trouble bipolaire à début précoce, TBDT = trouble bipolaire à début tardif.

Notre population de sujets contrôles a été choisie pour être de même origine ethnique que les individus atteints. Cependant, pour évaluer le risque de résultats faux-positifs dus à la stratification de notre population, 15 marqueurs distribués aléatoirement le long du génome ont été génotypés au laboratoire. La valeur moyenne du χ^2 (μ) de ces 15 marqueurs, est de 1,17 (p=0,28), suggérant que nos deux populations sont génétiquement identiques. Le χ^2corrigé pour le SNP22 est de 3,77 et la valeur de p associée est de 0,052 ; légèrement au-dessus du seuil de significativité. Ainsi, après l'ensemble des corrections, la seule association qui reste significative, au seuil de 5%, est celle obtenue entre l'haplotype 'TGGGT' et le trouble bipolaire à début précoce.

c. Etude d'expression

Afin d'investiguer le lien entre *SYNPR* et le trouble bipolaire à début précoce, nous avons étudié, en fonction de différents paramètres, la quantité de transcrits de l'ensemble des isoformes du gène dans l'aire de Brodmann n°46, localisée dans le cortex préfrontal dorsolatéral. Nous avons comparé le niveau d'expression chez les patients bipolaires vs les témoins par un test de Wilcoxon (non significatif, p=0,64) présenté dans la Figure III.9, puis chez les patients bipolaires à début précoce vs témoins (non significatif, p=0,874). Ensuite, nous avons comparé les quantités de transcrit en fonction du génotype du variant 22, par un test de Kruskal Wallis (non significatif, p=0,45). Ainsi, nous n'avons pas trouvé de différences significatives de quantité de transcrits de *SYNPR*, quelques soient les paramètres testés.

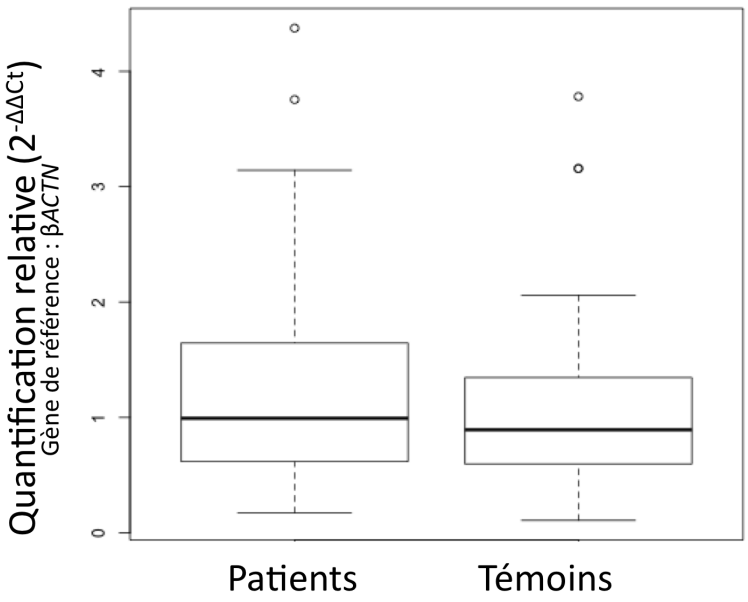

Figure III.9 : Niveau moyen de transcrits de *SYNPR* dans l'aire de Brodmann n°46, de cortex préfrontal post-mortem de sujets atteints de troubles bipolaires et de témoins. Aucune différence significative n'a été trouvée (test de Wilcoxon).

La recherche de variant dans *SYNPR* par séquençage ou analyse de données de génotypage pangénomique pour identifier des micro-remaniements chromosomiques, n'a pas révélé de rare variant à fort effet impliqué dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Les études d'associations ont révélé un variant associé spécifiquement au trouble bipolaire à début précoce, en 3'UTR, mais cette association ne résiste pas aux corrections pour tests multiples. Une association significative a été observée entre un haplotype couvrant la quasi totalité du gène et le trouble bipolaire à début précoce. Cet haplotype étant plus fréquent chez les témoins qui sont hypernormaux, serait un haplotype protecteur du trouble bipolaire à début précoce. Une association génotypique a été identifiée dans l'intron 3 et serait caractérisée par un déficit en hétérozygotes chez les patients bipolaires à début précoce et au contraire à un excès d'hétérozygotes chez les témoins. Les deux populations ne sont pas à l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Ces résultats sont difficiles à interpréter et nécessiteraient d'être répliqués dans une population indépendante de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce. Pour complèter l'ensemble de ces résultats, une étude quantitative des transcrits totaux du gène a été réalisée dans l'aire de Brodmann 46 issue de cortex préfrontaux post-mortem de

patients bipolaires et de témoins, mais n'a révélé aucune différence significative, quelque soit les paramètres étudiés. **L'ensemble de ces résultats suggère que *SYNPR* ne semble pas être un gène majeur de vulnérabilité aux troubles bipolaires.** Nous nous sommes donc intéressés à un autre gène candidat de la région 3p14 : le gène *CADPS*.

CADPS

Le gène *CADPS* code la Protéine Ca^{2+} dépendante, activatrice de la sécrétion. Cette protéine cytosolique de 65kDa est impliquée dans l'apprêtage des vésicules synaptiques et des vésicules à corps dense, mais aussi dans la régulation de la capture et/ou du stoquage des monoamines vésiculaires.

a. Recherche de micro-remaniements chromosomiques dans *CADPS*

Plusieurs CNV dans ou à proximité du gène sont référencés dans les bases de données internationales (Figure III.10). Dans le gène 28 CNV sont répertoriés, comprenant 3 duplications et 25 délétions. La quasi totalité de ces CNV sont localisés dans les introns et pourraient avoir un effet minime sur la qualité de la protéine. Seule une délétion enlève une séquence codante du gène : l'exon 11. Nous avons identifié, chez un patient, une délétion localisée dans l'intron 6 du gène, de 2,4 kb de 62585700 pb à 62587100 pb. A l'emplacement de ce CNV, 8 délétions et une duplication sont répertoriées. Il s'agit donc d'un polymorphisme du nombre de copies.

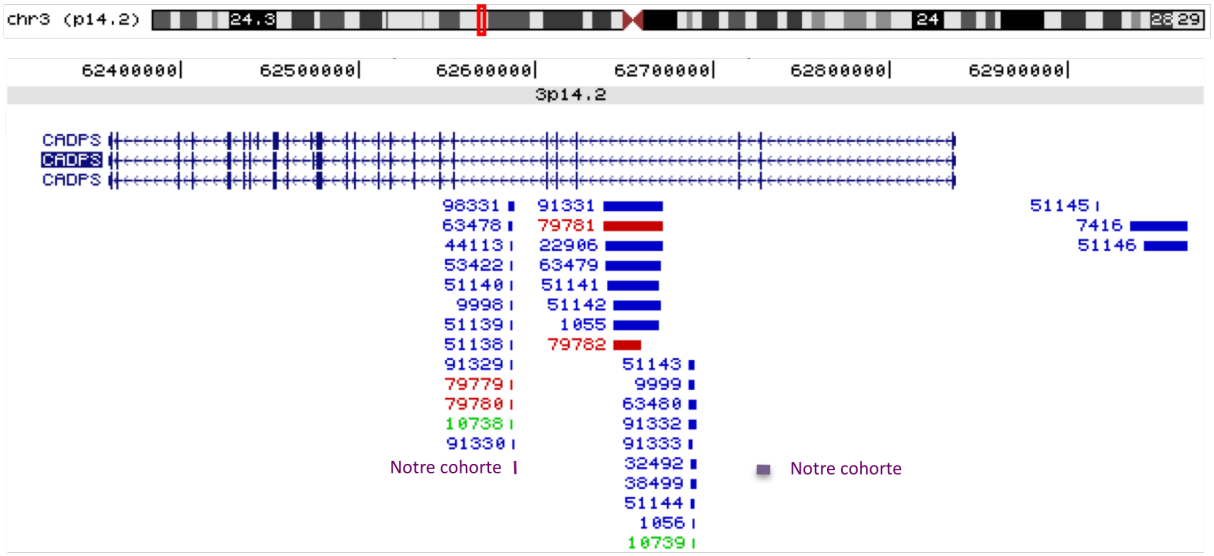

Figure III.10 : Résultats de la recherche de CNV dans *CADPS* dans DGV. Les délétions sont en bleu, les duplications en rouge et en vert, les délétions présentes chez nos patients sont en violet.

Nous avons identifié, chez un autre patient, une délétion de l'exon 2 du gène, par PCR semi-quantitative. Cette délétion a été confirmée par d'autres PCR semi-quantitatives réalisées à proximité de l'exon 2. Ce patient a présenté une manie délirante à 28 ans et possède des apparentés atteints de schizophrénie et de troubles bipolaires. La présence d'une duplication en amont de la délétion, a rendu la tâche de caractérisation des points de cassure difficile. Cependant, il semble qu'il s'agisse d'une petite délétion d'environ 9 kb. Cette délétion n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture. Elle enlève 38 acides aminés (I148-E185) conservés au cours de l'évolution. Ces 38 acides aminés ne sont pas constitutifs de domaine protéique fonctionnel connu, mais pourraient avoir un effet sur la structure de la protéine.

b. Recherche de mutations dans *CADPS*

Nous avons séquencé l'ADN de 132 patients atteints de TBDP pour l'intégralité des séquences codantes et les séquences 5' et 3' UTR, les jonctions intron/exon et 500pb en amont du site d'initiation de la transcription, ce qui représente 13,2kb d'ADN séquencés/patient. Nous avons également séquencé l'ADN de 142 témoins pour certains exons. Grâce à ce travail de séquençage nous avons identifié 67 variants. Ces variants sont

soit des substitutions, soit des délétions de 1 à 4 pb (n=3). Les bases de données internationales référencent 18 de ces variants qui correspondent à des polymorphismes et comptent parmi les variants les plus fréquents identifiés dans notre étude. Nous avons trouvé que 75% des variants ont une fréquence de l'allèle minoritaire inférieure à 0,05 et 37% sont uniques (Tableau III.4).

SNP	Acide aminé impliqué*	Position	Identifiant	FAM**	Allèles
1		62836615		0,035	C:T
2		62836473	rs982366	0,076	T:C
3		62836425		0,034	T:G
4		62836393		0,004	G:T
5		62836232	rs96888	0,45	G:A
6		62836082		0,019	A:C
7		62835875		0,034	G:A
8		62835246		0,034	T:C
9		62835214		0,004	G:C
10		62834916		0,031	G:T
11		62834732		0,004	T:G
12		62834598		0,004	C:T
13		62726739		0,023	G:A
14		62714517		0,015	C:T
15	ARG195LEU	62714460		0,004	G:T
16	ASN205LYS	62714429		0,004	C:G
17		62623229		0,012	T:_
18		62623182		0,198	A:G
19		62622982		0,092	A:T
20		62622968		0,318	C:T
21		62622944		0,295	A:G
22		62611817		0,015	T:C
23	SER345SER	62611730		0	A:A
24	SER377SER	62611634		0,004	C:A
25	GLY382GLY	62611619		0	C:C
26	SER399LEU	62611569		0,004	T:C
27		62611533		0,004	C:T
28		62606593	rs4588354	0,242	A:C
29	THR445THR	62553454		0,004	C:T
30	ALA474ALA	62553376	rs1766673	0,042	G:A
31		62553249		0,008	G:AGAG
32		62553228		0,012	C:T
33		62546077	rs2659467	0,176	C:T
34	LEU482ILE	62546033		0,004	C:A
35	ASP505ASP	62546019		0,004	G:A
36		62531769		0,004	G:C
37		62531662	rs833663	0,031	C:T
38	LEU571LEU	62518163	rs4396888	0,065	A:G
39		62518041	rs982353	0,065	C:A
40		62510859	rs9813819	0,038	G:C
41		62496981	rs28579412	0,076	G:A
42		62493555	rs1766532	0,015	T:A
43		62479076	rs833678	0,053	C:T
44		62474610		0,015	C:T
45		62473630		0,004	C:T
46		62473455		0,004	T:C
47		62473418	rs1376917	0,103	T:C
48		62454239		0,008	C:A
49		62453287		0,019	A:G
50		62453234	rs13325751	0,107	G:A
51		62453214		0,004	G:A
52	ARG959LEU	62453013		0,004	G:T
53		62452973	rs9834224	0,084	T:C
54		62452871		0,011	C:G
55		62442694		0,004	T:C
56		62442652		0,004	G:A
57	ASN1017ILE	62442561		0,008	A:T
58		62426975	rs6445273	0,05	A:G
59		62426234		0,004	A:G
60		62425971		0,015	A:T
61		62406518		0,015	C:T
62		62360320		0,027	C:_
63		62359771	rs1762	0,05	G:A
64		62359708		0,004	C:A
65		62359356	rs6762164	0,034	C:T
66		62359355		0,004	A:C
67		62359008		0,004	C:G

* : la position fait référence à l'isoforme majeure du gène

** : la fréquence de l'allèle minoritaire chez les patients

Tableau III.4 : Bilan des différentes caractéristiques des variants trouvés à l'issue du séquençage de *CADPS* chez 132 patients atteints de troubles bipolaires à début précoce.

La Figure III.11 montre que 64% des variants sont localisés dans les introns, à proximité des exons. Environ 18% sont présents dans les séquences codantes et la moitié correspond à des variations non synonymes. Les autres variants, soit 18%, sont dans le promoteur et les séquences 5', 3' UTR et en aval du site de terminaison de la transcription. Lorsque ce graphe est comparé avec celui de l'étude de *SYNPR*, davantage de variants sont observés dans les introns et les séquences codantes dans *CADPS*. *CADPS* est un gène qui contient près de 4,7 fois plus de séquences codantes que *SYNPR*. Ainsi la proportion des séquences codant le promoteur et les séquences 5'UTR et 3'UTR n'est évidemment pas la même.

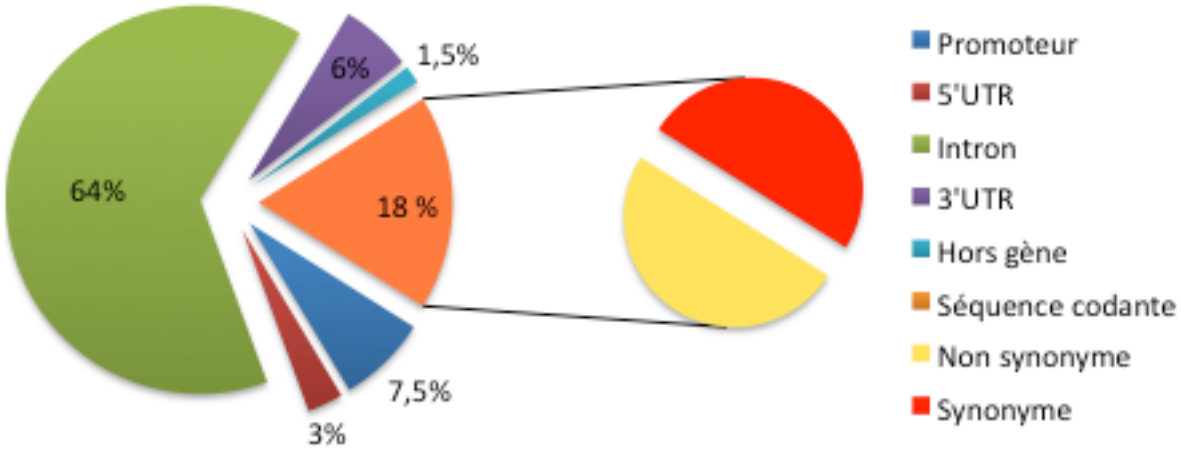

Figure III.11 : Répartition des différentes localisations des variants identifiés lors du séquençage de *CADPS*.

Afin de trouver des variants de vulnérabilité au trouble bipolaire, nous nous sommes intéressés aux variations faux-sens identifiées dans le gène. Nous en avons dénombré 6 différentes: R195L, N205K, S399L, L482I, R959L et N1017I. Ces mutations sont à l'état hétérozygote et sont uniques sauf N1017I qui est présente dans l'ADN de deux proposants indépendants. Sachant que chaque individu possède en moyenne 400 variations codantes non synonymes, puisque CADPS compte 4217 pb, d'après la formule suivante, on attend dans *CADPS* :

nombre de mutations attendues = nombre d'individus séquencés x nombre moyen de variants codants non synonymes dans le génome x nombre de bases codantes dans CADPS/nombre total de bases codantes dans l'ensemble du génome

= 132 x 400 x 4341 / (22546796+523843) = 9,56 mutations,

d'après les données publiées d'O'Roak *et al* (O'Roak *et al.*, 2011).

Or nous observons 7 mutations. Ainsi malgré notre hypothèse de gène de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce, nous n'avons pas un taux plus élevé de mutations dans le gène chez nos patients. Cependant chaque gène a un taux de mutation qui lui est propre. Il semblerait donc que *CADPS* soit un gène relativement bien conservé. Nous avons quantifié le taux de variations non-synonymes du gène dans une population contrôle. Le projet 1000 génomes a référencé 1 seule mutation non synonyme : N1017I (rs77008736) validée par deux techniques indépendantes et présente dans notre population caucasienne (Tableau III.5). Le taux de mutation de référence de CADPS est $1/(2*60) = 8{,}3.10^{-3}$ et le taux de mutation du gène dans notre population de patients est de $7/(2*132) = 2{,}6.10^{-2}$, soit 3 fois supérieur au taux de mutation de référence de *CADPS*. Cependant il faut noter que le nombre d'individus étudiés lors du pré-screen du projet 1000 génomes est faible et les techniques utilisées entre ce projet et notre étude sont différentes. Pour s'affranchir des variations liées aux techniques utilisées, nous avons comparé les ratios mutations silencieuses/mutations non silencieuses entre notre population de patients et la population de référence européenne du projet 1000 génomes. Pour ce faire, nous nous sommes restreints aux variations validées pour lesquelles nous disposions de la fréquence. Il en résulte que notre population a un ratio de 4 :1 et la population de référence 11 :1. En d'autres termes, notre population de patients possède 3x plus de mutations non synonymes que de mutations silencieuses comparé aux individus contrôles du projet 1000 génomes. Lorsqu'on s'intéresse aux événements mutationnels, on observe que un ratio de 2 mutations synonymes pour 1 mutation non-synonyme chez les témoins et de 5 mutations synonymes pour 6 mutations non synonymes chez les patients. Bien que les mutations soient peu nombreuses, une tendance suggère une augmentation d'événements mutationnels non-synonymes chez les patients comparé aux témoins. **Ces résultats corroborent l'implication probable de *CADPS* dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires à début précoce.**

Données	Type	Identifiant	Chr: bp	Allèles	Classe de variant	Acide Aminé	Coordonnées de l'Acide Aminé	SIFT	PolyPhen	Validation	Population	Fréquence	nb total de chromosomes étudiés	Nb de chromosomes portant l'allèle
Internationales	Synonyme	rs114293014	3:62459848	C/T	SNP	E	1159 (3)	-	-	validé	YRI	-	-	-
		rs62243467	3:62451042	G/A	SNP	T	1212 (3)	-	-	pas validé	-	-	-	-
		rs1056539	3:62385135	T/C	SNP	G	1336 (3)	-	-	pas validé	-	-	-	-
		rs62243467	3:62451042	G/A	SNP	T	1212 (3)	-	-	pas validé	-	-	-	-
		rs112585082	3:62459911	A/G	SNP	F	1138 (3)	-	-	pas validé	-	-	-	-
		rs111506583	3:62503877	T/C	SNP	E	780 (3)	-	-	pas validé	-	-	-	-
		rs76254845	3:62543096	G/A	SNP	Y	579 (3)	-	-	pas validé	-	-	-	-
		rs4396888	3:62543123	T/C	SNP	L	570 (3)	-	-	validé	CEU	0,025	120	3
		rs17066673	3:62578336	C/T	SNP	A	471 (3)	-	-	validé	CEU	0,067	120	8
		rs74991517	3:62636579	G/A	SNP	G	382 (3)	-	-	validé	-	-	-	-
		rs72874470	3:62636681	G/A	SNP	N	348 (3)	-	-	validé	-	-	-	-
		rs111821421	3:62739140	A/G	SNP	H	288 (3)	-	-	pas validé	-	-	-	-
		rs35975017	3:62739395	G/A	SNP	S	203 (3)	-	-	validé	-	-	-	-
	TOTAL synonyme													**11**
	Non-Synonyme	rs77008736	3:62467521	T/A	SNP	N/I	1017 (2)	2 deleterious	3 possibly damaging	validé	CEU	0,008	120	1
		rs13082830	3:62501805	A/T	SNP	V/D	837 (2)	2 deleterious	4 probably damaging	validé	-	-	-	-
		rs35912235	3:62503834	T/C	SNP	T/A	795 (1)	2 deleterious	1 benign	validé	-	-	-	-
		rs74790417	3:62516329	C/A	SNP	R/M	162 (1)	2 deleterious	4 probably damaging	validé	YRI	0,025	118	-
		rs10704231	3:62530530-62530529	-/ACA	insertion	-/C	153 (1)	0 -	0 -	non validé	-	-	-	-
	Site d'épissage	rs61586697	3:62459846-62459845	-/TTT	insertion	-	-	-	-	non validé	-	-	-	-
		rs72385277	3:62459841-62459840	-/TTTTTTTTTT	insertion	-	-	-	-	non validé	-	-	-	-
		rs60992373	3:62570854	A/G	SNP	-	-	-	-	non validé	Central South Africa	-	-	-
		rs74790417	3:62516329	C/A	SNP	R/M	162 (1)	deleterious	probably damaging	Validé	YRI	0,025	118	-
	TOTAL Non-Synonyme + Site d'épissage													**1**
	Ratio témoins													**11:1**
Patients bipolaires	Synonyme	rs4396888	62518163	A/G	SNP	L	571	-	-	Validé	CEU	0,065	264	17
		33	62546019	G/A	SNP	D	505	-	-	Validé	CEU	0,004	264	1
		rs1766673	62553376	G/A	SNP	A	474	-	-	Validé	CEU	0,042	264	11
		38	62553454	C/T	SNP	T	445	-	-	Validé	CEU	0,004	264	1
		44	62611634	C/A	SNP	S	377	-	-	Validé	CEU	0,004	264	1
	TOTAL synonyme													**31**
	Non Synonyme	rs77008736	62442561	T/A	SNP	N/I	1017	deleterious	possibly damaging	validé	CEU	0,008	264	2
		16	62453013	T/G	SNP	R/L	959	benign	benign	validé	CEU	0,004	264	1
		34	62546033	A/C	SNP	L/I	482	benign	benign	validé	CEU	0,004	264	1
		42	62611569	C/T	SNP	S/L	399	deleterious	possibly damaging	validé	CEU	0,004	264	1
		52	62714429	G/C	SNP	N/K	205	deleterious	possibly damaging	validé	CEU	0,004	264	1
		53	62714460	T/G	SNP	R/L	195	deleterious	possibly damaging	validé	CEU	0,004	264	1
	TOTAL Non-Synonyme + Site d'épissage													**7**
	Ratio patients bipolaires													**4:1**

Tableau III.11 : Récapitulatif des caractéristiques des variations présentes dans les séquences codantes de *CADP*S référencées dans les bases de données ou trouvées dans l'ADN de notre population de 132 patients bipolaires à début précoce.

Néanmoins, pour conclure sur l'implication de *CADPS* dans la vulnérablité au trouble bipolaire à début précoce, il aurait fallu séquencer l'intégralité du gène chez nos témoins et comparer le taux de mutation non-synonymes des patients avec celui des témoins. Il aurait aussi fallu augmenter les tailles des populations étudiées de patients et de témoins, afin d'avoir une meilleure puissance statistique.

Pour résumer, nos résultats montrent que *CADPS* semble avoir plus de mutations non silencieuses dans notre population de patients comparé aux contrôles européens du projet 1000 génomes. Ainsi, ***CADPS* pourrait être un gène de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce**.

c. Variants dans CADPS = variants de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce?

Afin de savoir si les variants non synonymes sont des variants de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce, nous les avons recherché dans les bases de données internationales (Tableau III.5) et dans l'ADN de 142 témoins. Aucune des mutations uniques n'est recensée dans les bases de données internationales (Human Genome Mutation database et 1000 Genome browser) et n'est retrouvée dans l'ADN des témoins. Seul le variant N1017I, initialement trouvé chez 2 patients, est présent à l'état hétérozygote chez 3 témoins et est référencé dans les bases de données internationales sous l'identifiant rs77008736.

Bien que *CADPS* n'ait jamais été associé aux troubles bipolaires, nous avons voulu savoir si un variant dans le gène pouvait être associé aux troubles bipolaires ou au trouble bipolaire à début précoce. Nous avons réalisé une étude d'association allélique et génotypique avec les polymorphismes : rs13325751 et rs2659467, identifiés dans les exons séquencés, puisque leur MAF≥0,05, mais aucune association ne dépasse le seuil de significativité de 5%. Ainsi, nous n'avons pas trouvé de variant fréquent dans *CADPS* associé au trouble bipolaire.

Seulement 3 autres variations non synonymes validées sont recensées dans ce grand gène et pourraient entraîner des modifications de la séquence de la protéine CADPS : rs13082830, rs35912235, rs117336690. Seuls les variations rs13082830 (V837A), et rs77008736 (N1017I) auraient un effet délétère d'après les logiciels de modélisation Polyphen et SIFT. Ces résultats

sont cohérents avec ceux du projet 1000 génomes et montrent bien que *CADPS* est un gène dont la séquence codante varie peu chez l'homme. Puisque les variations uniques sont absentes de l'ADN des témoins et qu'elles ne sont pas recensées dans les bases de données, ces variations pourraient être des variations de vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce.

- **Etude *in silico* de l'effet des mutation sur CADPS**

La protéine CADPS est constituée de 3 domaines protéiques connus : un domaine C2 (400 aa à 481aa), un domaine PH (522aa à 624aa) et un domaine MHD1 pour *MUNC-13 homologue domain 1* (931aa à 1111aa). De plus, il existe une région capable d'interagir avec le récepteur DRD2 (790aa à 129aa). Les mutations S399L et L482I encadrent le domaine C2 et pourraient être importantes pour sa conformation tri-dimentionnelle. Lorsque le domaine C2 lie le calcium et les lipides il change de conformation. Ce domaine est important dans la sensibilité au Ca^{2+} et semble important dans la fonction de la protéine. La mutation R959L affecte un acide aminé constitutif de la région de liaison au Récepteur D2 à la dopamine et constitutif du domaine MHD1. Ce domaine serait impliqué dans la liaison aux vésicules à corps dense (Figure III.12). Ces variations pourraient avoir un effet délétère sur la fonction protéique. Nous avons utilisé les logiciels de modélisation Polyphen et SIFT afin de prédire les effets de ces mutations grâce aux données relatives à la conservation des acides aminés affectés, au profil d'hydrophobicité de l'acide aminé modifié. Pour chaque occurrence les conclusions de ces logiciels sont les mêmes. Ils prédisent que les mutations L482I, R959L auraient un effet bénin et les mutations R195L, N205K, S399L, N1017I auraient un effet probablement dommageable pour la protéine.

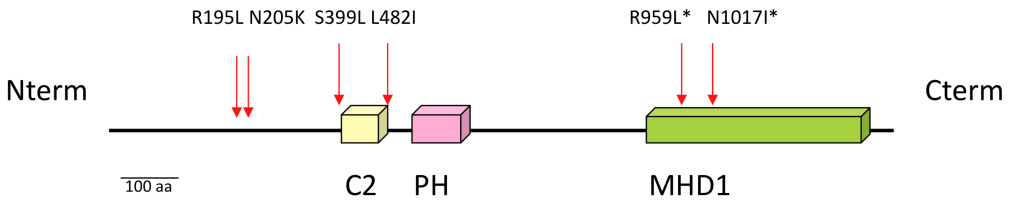

Figure III.12 : localisation sur la structure primaire de CADPS, des différentes variations non-synonymes identifiées lors du séquençage du gène chez 132 patients atteints de troubles bipolaires à début précoce. * : ces variations sont localisées dans des domaines fonctionnels de la protéine.

- **<u>Etude de la ségrégation des variations faux-sens au sein des familles</u>**

Les familles porteuses des mutations sont à l'image des familles de notre cohorte. Elles sont petites et nous ne disposons de l'ADN et de données cliniques que d'un petit nombre de ces membres. De plus certaines de ces familles ont été recrutées il y a plus de 20 ans et ont été perdues de vue. Nous avons recontacté chacune de ces familles lorsque cela était possible, malheureusement nous n'avons eu aucun retour. Ces familles ne sont pas assez informatives pour réaliser une étude de ségrégation. Nous disposons de l'ADN et du statut clinique de 8 apparentés, comptant 4 personnes saines non mutées dans *CADPS*, deux sujets atteints de troubles bipolaires de type I, un patient atteint de trouble bipolaire de type II, un patient hyperthymique, et une personne unipolaire (Tableau IV.1). Les Odd Ratios ont été calculés suivant les différentes atteintes cliniques considérées, chez les apparentés exclusivement. Quelques soit le statut clinique considéré, soit bipolaire de type I, soit bipolaire de type I&II, soit troubles de l'humeur, l'Odd Ratio, vaut toujours ∞. Ces résultats extrêmes sont liés au petit nombre d'individus pris en compte dans l'étude.

Au sein de la famille (1), le germain qui est atteint est lui aussi porteur de la mutation S399L. La mère, unipolaire porte l'allèle sauvage du gène. Il s'agit soit d'une mutation transmise par le père sain dont nous n'avons pas l'ADN, soit d'une *neo-mutation* venant du père ou de la mère. Des individus de la famille (4) sont porteurs de deux mutations faux-sens L482I et N1017I. Ces deux mutations sont sur le même chromosome et sont transmises par le père, hyperthymique, à ses deux filles, atteintes de troubles bipolaires de type 1 et de mère différente. Une autre de ses filles, non atteinte, n'est pas porteuse de ces mutations. Ces

observations attestent d'un rôle possible de *CADPS* dans la vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce.

d. Etudes fonctionnelles

Afin de tester les effets qualitatif et quantitatif des mutations sur la protéine, nous avons réalisé différentes constructions comprenant chacune des mutations ou la double mutation identifiée dans le gène (R195L, N205K, S399L, L482I, R959L, N1017I, L482I-N1017I, WT et le vecteur vide). Tout d'abord, pour vérifier la qualité des protéines, nous avons utilisé dans un premier temps le vecteur d'expression pcDNA3.1. Nous avons transfecté chacune des constructions dans des cellules COS et nous avons vérifié le niveau d'expression et la taille des protéines par western blot. Les protéines sont toutes bien exprimées et font la taille attendue : 65kDa. Nous avons regardé aussi sa localisation subcellulaire par immunocytochimie. Les résultats d'immunocytochimie montrent que les différentes protéines sont fortement exprimées et qu'elles se localisent principalement de manière diffuse dans le cytoplasme. Les cellules COS ne font pas de vésicules, c'est pourquoi la distribution n'est pas ponctuée comme observée dans les cellules chromaffines.

Ensuite, nous avons voulu connaître les conséquences des mutations sur la fonction protéique. Nous avons réalisé de nouvelles constructions (portant les mutations ponctuelles précédemment identifiés et la délétion de l'exon 2) dans le vecteur d'expression pF(SYN)W-RBN. Ce vecteur contient le promoteur de la synapsine, pour une expression fine et non neurotoxique. Ce vecteur contient aussi des séquences lentivirales permettant une infection d'une grande efficacité et une expression stable du transgène. Ces constructions ont été envoyées à nos collaborateurs, afin qu'ils produisent les virus modifiés qui infecteront des neurones hippocampiques issus d'embryons de souris *CAPS1-/- et CAPS2-/-*. Tout d'abord, Nous nous assurerons, pour chacune des constructions, de la localisation de la protéine à la membrane plasmique. Dans ce même modèle cellulaire, nous allons vérifier que les protéines mutantes, en fonction de la localisation des variants en rapport aux domaines fonctionnels de la protéine, sont capables d'interagir avec leurs partenaires cellulaires PI(4,5)P2, la Syntaxine 1 et le Récepteur cytoplasmique à la dopamine. Ensuite nous réaliserons un sauvetage phénotypique que nous mesurerons par l'amplitude des courants excitateurs post-synaptiques. Ces résultats nous permettraient de conclure sur l'effet des mutations sur la fonction de

CADPS. Pour conclure sur l'implication de *CADPS* dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, il faudrait réaliser des études de réplications et des études comportementales à partir des souris *CADPS*+/- (cf Annexe 1).

Des mutations uniques, ont été identifiées dans *CADPS* dans l'ADN de 4,5% des patients. Certaines de ces variations sont localisées dans des domaines fonctionnels de la protéine. Nous avons aussi découvert une délétion du deuxième exon du gène, qui n'a jamais été référencée dans les bases de données internationales. Cet exon est conservé au cours de l'évolution, cette délétion pourrait avoir un effet délétère. L'absence de ces mutations dans l'ADN de sujets témoins, l'augmentation du ratio mutation synonyme/ mutation non-synonyme dans notre population de patients, comparé à la population de sujets contrôles du projet 1000 génomes et des valeurs élevées des Odds Ratios, suggèrent que CADPS serait un gène majeur de vulnérabilité aux troubles bipolaires. Ces résultats nécessitent d'être approfondis et répliqués. Cependant ces résultats ne rendent compte que d'une faible partie des patients atteints de troubles bipolaires. D'autres gènes et/ou d'autres modèles peuvent être impliqués dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

Chapître IV : Recherche de CNV sur l'ensemble du génome

Etude d'association pangénomique

Afin d'identifier des variants fréquents de vulnérabilité aux troubles bipolaires, nous avons réalisé une étude d'association pangénomique entre 484 patients français atteints de troubles bipolaires et 1823 témoins, génotypés pour 287 288 SNP. Notre échantillon a une bonne homogénéité génétique (λ= 1,03). Lorsque nous restreignons cette étude d'association à nos patients atteints de TB à début précoce (soit 210 patients), nous observons un excès de faibles valeurs de p. Ce résultat suggère que nos patients à début précoce ont une signature génétique qui semble différente des patients ayant un début tardif de la maladie et de témoins. Nous avons ensuite réalisé une étude de réplication dans une cohorte de patients allemands atteints de troubles bipolaires à début précoce (n=159) et de témoins allemands (n=998). Cette étude est restreinte aux SNP précédemment associés avec une valeur de p <0,05, soit 14141 SNP. Les sujets allemands ont été génotypés pour 13840 de ces SNP. Les résultats montrent à nouveau une surreprésentation significative (p<0,03) d'associations avec une faible valeur de p. Nous avons réalisé une méta-analyse en combinant les résultats de ces deux cohortes, allemandes et française (Figure IV.1). Les plus fortes associations de cette étude soit une valeur de $p<5.10^{-5}$, sont pour 5 SNP, en 12p12 s'étendant sur deux gènes : *PLEKHA5* et *AEBP2* et pour 2 SNP en 5p13 localisés dans le gène *OXCT1* et en amont de *PLCXD3* (Figure IV.1). Des études de réplication ont été réalisées avec les cohortes du WTCCC (764 patients bipolaires à début précoce et 2938 sujets contrôles) et des projets GAIN-TGen (1524 patients bipolaire à début précoce et 1436 sujets contrôles). La cohorte du WTCCC présente 119 variants en commun ou en déséquilibre de liaison avec la méta-analyse princeps, avec une valeur de p<0,05. Parmi lesquels, des variants à proximité des gènes précédemment associés. Ces résultats ne sont pas répliqués avec la cohorte GAIN-TGen. Grâce à cette étude d'association pangénomique, plusieurs gènes, dont deux relatifs à la voie de signalisation des phospho-inositols : *PLEKHA5* et *PLCXD3* sont associés aux troubles bipolaires à début précoce. Une quantification relative des transcrits de ces deux gènes a été réalisée et n'a pas révélé de différence de niveau d'expression des deux gènes dans les aires de Brodmann 46 de cortex préfrontaux post-mortem de 30 patients atteints de troubles bipolaires et de 30 témoins.

Nous n’avons pas trouvé de corrélation entre le niveau d’expression du gène et ces variants associés ou le statut clinique.

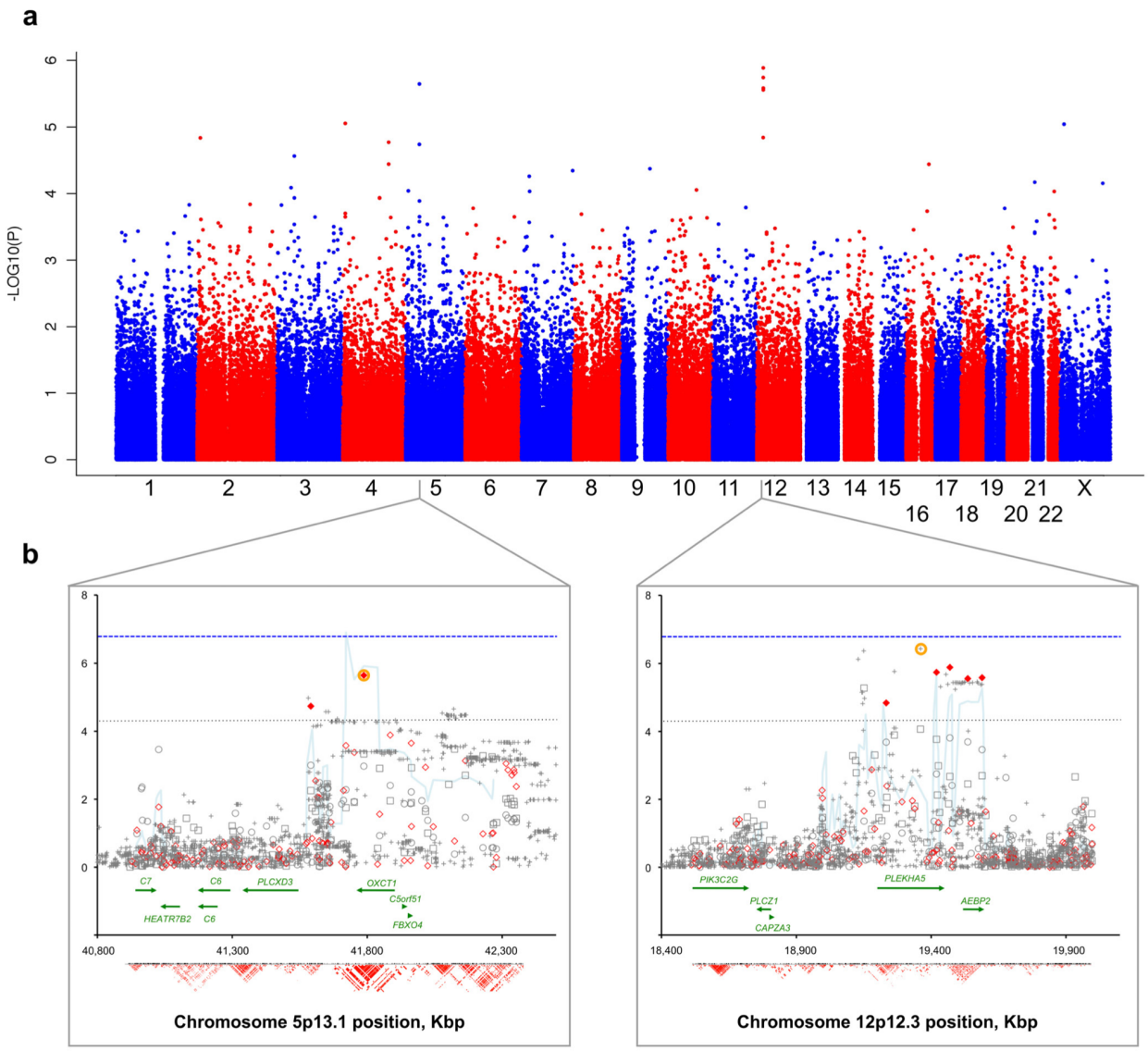

Figure IV.1 : Résultats de l'étude d'association pangénomique. En a) Graphe de Manhattan des valeurs de p, en $-\log_{10}$ en fonction de la localisation des variants testés sur le chromosome considéré, issues de la méta-analyse réalisée à partir des cohortes françaises et allemandes de patients atteints de trouble bipolaire à début précoce et de témoins. En b) Détail des régions chromosomiques 5p13 et 12p12, les plus associées dans cette étude. Les valeurs de p en $-\log_{10}$ sont représentées en cercles ajourés gris pour la cohorte française, en carrés ajourés gris pour la cohorte allemande et en losanges ajourés rouge pour la méta-analyse. Les croix grises représentent les génotypes imputés. Les SNP les plus associés de la région sont représentés par un cercle orange.

Sélection des variants rares à étudier

Grâce à l'étude d'association pangénomique présentée ci-dessus, nous disposions de données de génotypage et d'intensité de fluorescence pour chaque variant testé pour une cohorte de 232 patients atteints de troubles bipolaires comprenant 163 patients à âge de début précoce et 69 cas familiaux. Nous avons détecté 388 *Copy Number Variant* (CNV), comprenant 187 délétions et 201 duplications, dont les tailles variaient de 50kb à 1,136Mb. Afin d'identifier des CNV de vulnérabilité au TBDP, nous les avons sélectionnés sur les critères suivants : i) affectent un ou des gènes exprimés dans le système nerveux central, ii) non référencés dans les bases de données ou gènes déjà impliqués dans un trouble psychiatrique, iii) modifieraient la quantité ou la qualité des transcrits du gène. Nous avons ainsi retenu 9 CNV, de taille supérieure à 50kb, pour réaliser des études génétiques. Seulement 7 CNV (6 délétions et une duplication) ont été validés par quantification relative avec correction de deux gènes de référence. Ces CNV modifient les gènes *NRXN1, LINGO2, CDH8, ANKS1b, GPHN, PLCXD3, GABARAPL1*, ce dernier étant le seul dupliqué (Tableau IV.1). Plusieurs remaniements de *CDH8* sont recensés dans la littérature. Une translocation est reportée chez un patient schizophrène. Des micro-délétions sont trouvées chez trois germains atteints d'autisme et chez un proposant et son père atteints de difficultés d'apprentissage. Priebe *et al* (Priebe *et al.*, 2011), ont reporté des délétions dans les gènes *LINGO2*, *ANKS1B* et *PLCXD1*. Du fait de la rareté des micro-remaniements affectant des gènes, ces résultats renforcent notre hypothèse de gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaires. *NRXN1* a été mis en cause dans l'autisme (Kim *et al.*, 2008, Yan *et al.*, 2008), la schizophrénie (Kirov *et al.*, 2008, Vrijenhoek *et al.*, 2008, Need *et al.*, 2009, Rujescu *et al.*, 2009), et le trouble bipolaire (Zhang *et al.*, 2009).

Ces gènes codent des protéines impliquées dans différents aspects de la fonction synaptique : NRXN1 est impliquée dans les connexions neuronales, LINGO2 et la cadhérine 8 dans l'adhésion cellulaire, ANKS1B et la Gephyrine sont des protéines d'ancrage membranaire, PLCXD3 agit dans la transduction du signal. GABARAPL1 est un acteur de la fusion des vésicules avec la membrane plasmique.

Fonction cellulaire	Gène interrompu	Région chromosomique	Type de variant	Taille	Variant recensé sur *DGV*	Séquences remaniées	Individus disponibles
Connexions neuronales	*NRXN1* (Neurexin 1)	2p16.3	Délétion	133kb	oui	Intron	1,2,3,4,5
	LINGO2 (Leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing nogo receptor-interacting protein 2)	9p21.2	Délétion	150kb	oui	Intron + 1 exon non codant	1,6
Adhésion cellulaire	*CDH8* (Cadherin 8)	16q21	Délétion	1 136kb	non	3 exons codants	1
Ancrage protéines membranaires au cytosquelette	*ANKS1B* (Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B)	12q23	Délétion	72kb	non	6 exons codants	1,3,4
	GPHN (Gephyrin)	14q23.3	Délétion	233kb	non	3 exons codants	1,3
Transduction du signal	*PLCXD3* (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3)	5p13	Délétion	90kb	non	1 exon codant	1
Fusion entre vésicule et membrane	*GABARAPL1* (Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1)	12p13.2	Duplication	112kb	non	gène entier	1, 4, 5

Tableau IV.1 : Récapitulatif des CNV retenus et validés à l'issue de la recherche de micro-remaniements chromosomiques chez des patients bipolaires.

L'ADN des patients est issu de cellules de lignées lymphoblastoïdes. Puisque le gène *GPHN* est exprimé dans ces cellules et que la délétion enlève en théorie plusieurs exons, nous avons extrait les transcrits puis réalisé une RT-PCR puis le cDNA a été amplifié par PCR en utilisant des amorces de part et d'autre de la délétion, dans les exons 1 et 5. Cette PCR nous a permis d'identifier une isoforme plus petite de 150 pb environ, correspondant à l'absence des exons 2, 3 et 4, spécifique du patient porteur de la délétion (Figure IV.2). Cette délétion entraînerait un décalage du cadre de lecture puisque les exons 1 et 5 ne sont pas en phase. Ces résultats ont besoin d'être approfondis par le séquençage du produit de PCR et par une quantification des deux isoformes du gène chez le patient.

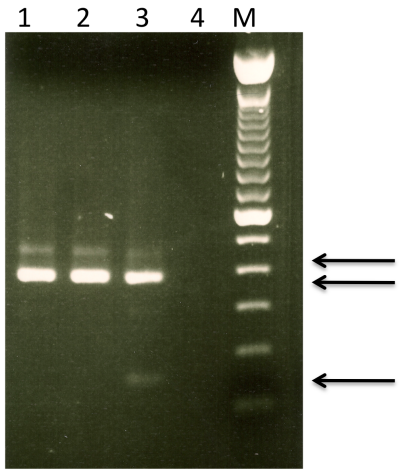

Figure VI.2 : Mise en évidence de la délétion dans GPHN. En 1, le témoin positif, en 2, l'apparenté non atteint, en 3, le proposant porteur de la délétion et en 4 le témoin négatif. Différentes isoformes sont visibles, l'isoforme majoritaire fait 380pb. Une isoforme de 150pb, plus petite est spécifique du proposant.

Pour réaliser nos études, nous avons utilisé de l'ADN issu de lignées lymphoblastoïdes. Ainsi, cet ADN a été modifié. Malheureusement nous ne disposons pas d'ADN natif pour vérifier la présence de ces micro-remaniements. Cependant le cas de *NRXN1* et de *ANKS1B* nous disposons de l'ADN d'apparentés eux aussi porteurs, attestant de l'existence de la délétion. Pour confirmer les gènes possiblement impliqués dans les troubles bipolaires, il faudrait faire des études de réplication au sein d'autres populations de patients atteints de trouble bipolaire à début précoce ou des cas familiaux de troubles bipolaires, sur de l'ADN de cellules modifiées qu'à condition que l'ADN natif soit disponible.

- **<u>Caractérisation des points de cassure</u>**

Lorsque la taille maximale d'incertitude autour des points de cassure de la délétion était inférieure à 13kb, nous avons fait une PCR longs fragments, en utilisant des amorces de part et d'autre de la délétion, afin d'amplifier le segment d'ADN portant le point de cassure. Ce fragment a ensuite été séquencé. Nous avons ainsi caractérisé le point de cassure dans *NRXN1*. Cette délétion enlève 130 kb, soit près de la moitié de l'intron 15 du gène. Cette délétion enlève une séquence relativement bien conservée du Xénope à l'homme. A cette localisation, seule une duplication et de taille bien inférieure est déjà référencée dans DGV. Nous avons étudié la ségrégétion du variant avec la maladie (Tableau IV.2). D'après les résultats d'amplification spécifique des séquences flanquant la délétion, il semblerait que l'individu 5, atteint ne soit pas délété et l'individu 2, sain est porteur de la délétion. Ainsi nous n'observons pas de coségrégation claire entre le variant et la maladie.

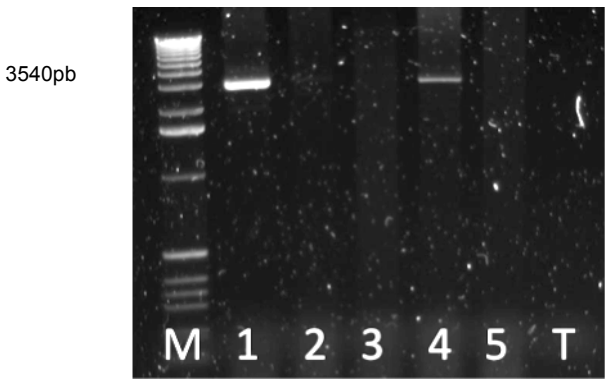

Figure VI.3 : Ségrégation de la délétion dans *NRXN1* au sein de la famille 8. En M, le marqueur de taille, en 1, le proposant, en 2 le père, en 3 la mère, en 4 le frère, en 5 la sœur, en T le témoin négatif.

Nous avons ensuite cherché à caractériser les autres points de cassure de chacune des délétions. Pour cela nous avons fait de la marche sur chromosome par la même technique que celle de validation des CNV, jusqu'à obtenir une région dont la taille maximum d'incertitude est de 13kb. Ensuite nous avons réalisé des grandes PCR à l'aide du Mix Taqara, dont nous avons séquencé le produit. Nous avons rencontré des difficultés à réaliser cette marche sur chromosome par la structure de l'ADN, notamment à cause de la présence de séquences répétées à proximité des sites remaniés. Par exemple dans le cas du gène *LINGO2*, le point de cassure est localisé dans une séquence répétée de plus de 6kb. Pour la caractérisation des points de cassures dans *CADPS*, nous avons identifié une duplication du segment chromosomique en amont du point de cassure. Ainsi avec cette technique, nous n'avons pas pu identifier le point de cassure dans le gène. Cependant, cette technique a été fructueuse dans la caractérisation des points de cassures dans *CDH8*. La caractérisation des points de cassure des autres gènes retenus est en cours.

Recherche de mutations dans PLCXD3

Le variant rs10512793 montre la deuxième association la plus forte de la méta-analyse pangénomique réalisée chez 369 patients atteints de troubles bipolaires à début précoce et 2717 témoins ($p=2,3.10^{-6}$, OR=1,62). Une analyse haplotypique a été réalisée en utilisant une fenêtre coulissante de 3 SNP. La combinaison des trois variants *rs624097-rs316762-rs10512793* montre une forte association avec une valeur de $p=1,27.10^{-7}$. De plus, nous avons validé un CNV enlevant le promoteur et le premier exon du gène chez un patient.

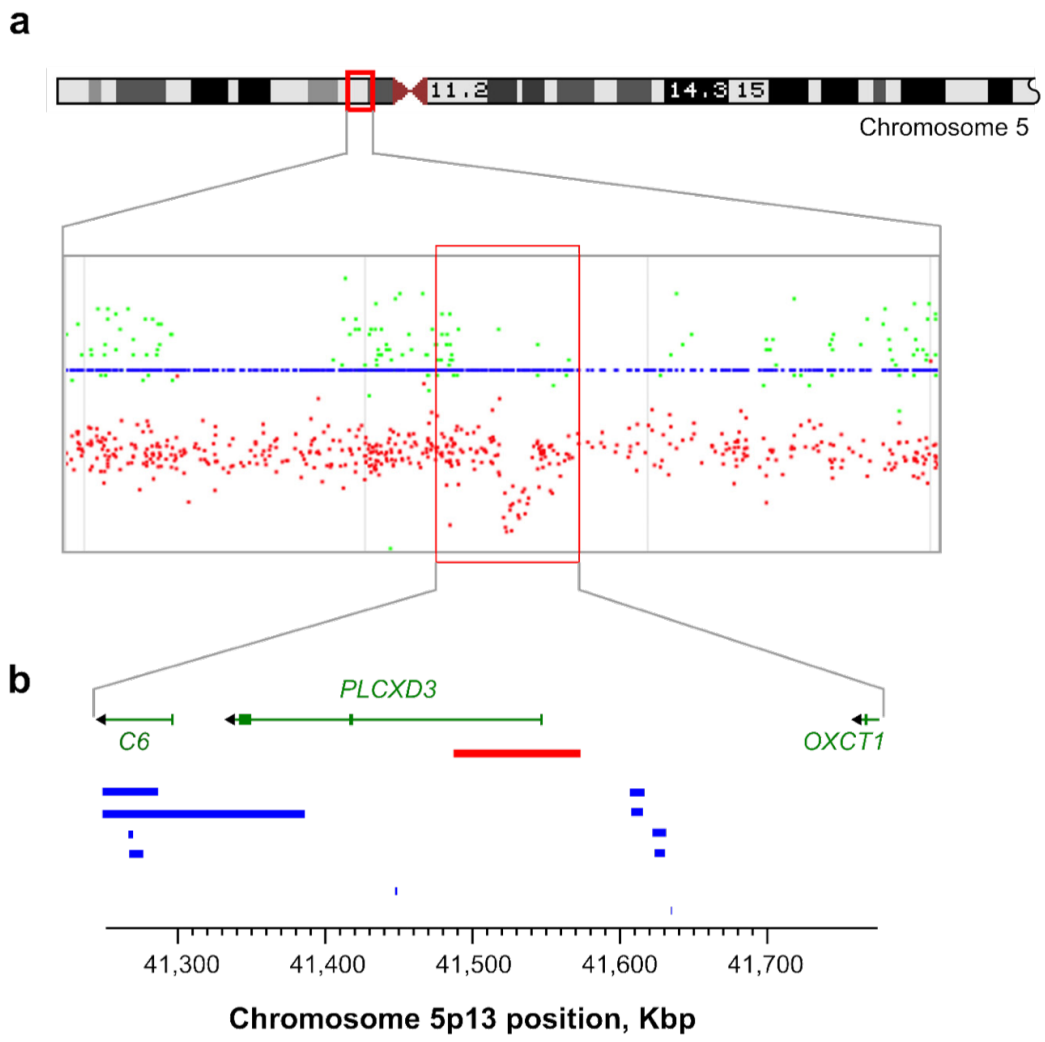

Figure IV.4 : Présentation de la position chromosomique de *PLCXD3*, *C6* et *OXCT1*. a) Impression de la délétion identifiée grâce au logiciel Snipeep dans *PLCXD3* en rouge sur la figure b, en bleu figurent les CNV précédemment référencés.

Comme le montre la Figure IV.4, aucun autre CNV référencé dans *DGV* n'enlève le promoteur et le premier exon du gène. Ce gène code une phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol. Les antidépresseurs tricycliques stimulent la phospholipase C et la production d'inositol, 1,4,5-triphosphate. Pour ces arguments, nous avons choisi d'étudier l'intégralité des séquences codantes du gène chez 256 patients comprenant 132 patients à début précoce et 124 à début tardif. Nous avons ainsi pu constater que l'autre allèle du patient

délété était sauvage. Grâce à cette étude nous avons identifié 2 mutations synonymes localisées dans le deuxième exon : V58 (MAF=1,15%), référencée sous l'identifiant rs113849338 et P251 (MAF=0,19%), la première est un polymorphisme et la deuxième est une mutation unique (Figure IV.5).

Figure IV.5 : Localisation chromosomique, structure du gène *PLCXD3* et localisation des variants identifiés par notre étude.

Il aurait été intéressant d'étudier la ségrégation de ces variants synonymes au sein des familles. Aucune autre mutation présente dans notre population d'origine n'a été répertoriée par le projet 1000 génomes. En théorie, d'après la même formule que précédemment, on s'attend à trouver n = 256 x 400 x 963 / (22546796+523843) = 4,3 mutations non synonymes. Cependant, le pré-screen du projet 1000 génomes n'a référencé aucune mutation non-synonyme. La séquence codante du gène varie peu chez l'homme, sans doute à cause d'une forte pression de sélection.

Si le gène *PLCXD3* est un gène de vulnérabilité illustrant l'hypothèse de 'multiple rare variants for common diseases', comme semble l'être *CADPS*, le nombre de variants non-synonymes attendu est d'au moins 6, puisque le nombre de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce séquencés est le même pour les deux gènes. Or aucune variation non-synonyme n'est observée, chez les patients atteints de trouble bipolaire à début précoce et à début tardif. La région 5p13 n'est pas liée, au moins suggestivement, aux troubles bipolaires, à notre connaissance. D'après ces résultats, *PLCXD3* ne semble pas être un gène majeur impliqué dans la vulnérabilité génétique des troubles bipolaires sous l'hypothèse de 'multiple rare variants for common diseases'.

La difficulté de l'hypothèse de variants rares dans de multiples gènes est qu'elle nécessite de passer au crible des grandes populations de patients et de témoins aussi, si des mutations non-synonymes sont identifiées.

Retour à la clinique

a. Etude du genre

La population de patients étudiés au cours de ces travaux de recherche, compte 42,6% d'hommes et 57,4% de femmes. Dans la population de patients mutés, la proportion est de 35,7% d'hommes contre 64,3% de femmes. La population de patients mutés est conforme à la population originelle (χ^2=0,27, ddl=1).

b. Prévalences

Une famille a été exclue de l'analyse car les deux parents sont atteints de psychoses. Certains individus n'ont pas été évalués par un psychiatre, c'est le cas des individus décédés. La prévalence des troubles bipolaires de type I chez les germains de proposants mutés est de 38,5%. Cette valeur est 5 fois supérieure aux données de la littérature qui l'ont estimé à 7,9% et s'approche de la prévalence de jumeaux monozygotes. Lorsque l'atteinte clinique est élargie aux troubles bipolaires de type I et II, à la schizophrénie et à la dépression majeure, la prévalence chez les germains est de 63,2%. Il faut noter que la dépression majeure n'affecte que des mères de proposants. La prévalence de troubles bipolaires de type I chez les enfants de proposants mutés atteints de troubles bipolaires de type I n'a pas pu être évaluée puisque la population est trop petite. La prévalence de troubles de l'humeur et de schizophrénie chez les enfants d'individus atteints de troubles bipolaires ou de dépression majeure est de 76,2%. Dans l'hypothèse de 'multiple rare variants' à forte pénétrance, ces résultats ne sont pas conformes à un modèle monogénique dominant (χ^2 de conformité = 7,11, ddl=1). Ces données sont cohérentes avec les données de Radhakrishna *et al*, qui, a reporté une famille dont un parent est atteint et a donné naissance à 9 enfants sur 12 atteint (soit 75%) de troubles bipolaires ou de dépression majeure (1 individu), diagnostiqués avec le DSMIV (Radhakrishna *et al.*, 2001). Ces résultats excluent la composante génétique seule (en dehors

d'une origine mitochondriale), sous l'hypothèse de multiple rare variants for common diseases' impliquée dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, dans ces familles. Dans 5 cas sur 7, la mère atteinte soit de troubles bipolaires (3) soit de dépression majeure (2), transmet la maladie à ces enfants. Lichtenstein *et al*, ont montré que le risque d'être atteints de troubles bipolaires lorsque le demi-germain est bipolaire est de 4,5 lorsque la mère est partagée ou 2,4 lorsque le père est partagé (Lichtenstein *et al.*, 2009). Ces résultats sont donc en accord avec les données de Lichtenstein *et al*, qui trouvait une transmission maternelle près de deux fois supérieure. L'Odd ratio a été calculé exclusivement à partir des données des apparentés, en fonction de leur statut clinique et de la présence ou non, de CNV et vaut 1 (8 individus comptabilisés).

c. Caractéristiques cliniques

Individus mutés dans *CADPS* et leurs apparentés

Les mutations uniques identifiées dans *CADPS* affectent 6 familles qui comptent 24 individus, dont 8 sujets non atteints de troubles psychiatriques. Différentes pathologies psychiatriques sont trouvées dans ces familles, notamment, des troubles bipolaires de type I et II (10 ou 11 individus), une hyperthymie (un individu), des sujets atteints de schizophrénie (2 ou 3 individus) et de dépression majeure (deux sujets). Trois germains/3 présentent des troubles bipolaires d'apparition précoce, cependant le type peut-être différent. Les individus atteints de ces pathologies présentent aussi des co-morbidités telles que des troubles anxieux dans 62,5% des cas (5/8), le suicide avec 57,1% des cas (4/7), des abus de drogues et d'alcool dans 57,1% des cas (4/7). Les patients et leurs apparentés présentent des épisodes mixtes et des épisodes psychotiques dans 62,5% des cas (5/8) et des cycles rapides dans 25% des cas (2/8).

Individus porteurs de micro-remaniements et leurs apparentés

Les 7 CNV retenus affectent 7 familles comptabilisant 29 individus recensés, dont 8 individus non atteints de troubles psychiatriques. Plusieurs pathologies psychiatriques co-existent dans les familles des individus porteurs de micro-remaniements chromosomiques à savoir, les troubles bipolaires de type I&II (16 individus), les troubles bipolaires non spécifiés (1 patient), la schizophrénie (2 patients), la dépression majeure (une patiente), la maladie d'Alzheimer (une patiente) et un sujet dépendant à l'alcool. Les troubles anxieux affectent 40% des

individus bipolaires (4/10), 41,7% ont fait des tentatives de suicide (5/12) et 2 apparentés/2 abusent de drogues et/ou alcool. Concernant les caractéristiques cliniques, Cinq germains/6 ont des troubles bipolaires à début précoce. Aucun apparenté, ni aucun proposant n'a présenté d'épisodes mixtes, ni de cycles rapides. Seuls des épisodes psychotiques ont été reportés dans les phases maniaques dans 72% des cas (8/11).

Tableau IV .2 : Bilan des données cliniques des patients mutés dans *CADPS* ou porteurs des CNV retenus et de leurs apparentés. D=épisodes dépressifs, M=épisodes maniaques, EM = épisodes mixtes.

Gène	Mutation	Famille	Famille	individu	ADN	Genre	Lien de parenté avec le proposant	Statut clinique	Age de début des symptômes	Nombre et types d'épisodes	Présence de cycles rapides	Tentatives de suicide	Traitement	Episodes psychotiques	Comorbidités	Troubles anxieux	dépendances	abus	Troubles comporten alimentai
CADPS	S399L	1	BB-050	1	muté	F	proposant	BP1	16	2D + 5M + EM	non	0	-	2D+5M	1	0	cannabis	alcool	
				4	muté	F	germain	BP2	17	3D	non	0	-	1D	1	0	-	alcool et cannabis	
				3	pas muté	F	mère	UP	34	au moins 2D	-	0	-	-	0	0	0	0	
				2	-	H	père	Sain	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	
	R195L	2	BP-460	1	muté	F	proposant	BP1	14	BcpD + 3M+ bc	oui	6	-	0M	2	Phobie sociale (13 ans)	0		boulimie (14
				4	-	M	germain	BP?	15	-	-	oui	-	-			cannabis, alcool		
	N205K	3	BP-400	1	muté	F	proposant	BP1	15	7D+1M+EM	non	3	Répondeur au Tec	5D+1M	2	Trouble panique (45 ans)		alcool (25 ans)	
				4	pas muté	H	germain	sain	-										
	L482I&N1017I	4	BP-303	1	muté	F	proposant	BP1	11	4D+M+EM	oui	?	-	0	2	Phobie sociale		cannabis (16 ans) + alcool	
				2	muté	H	père	Hyperthymique											
				3	non muté	F	mère	saine											
				4	muté	F	1/2 germain	BP1	14	2D+3M+EM	non	0	-	1M	0	0	0		
				5	non muté	F	mère de 4	Saine							0	0	0		
				6	non mutée	F	1/2 germain	saine							0	0	0		
	R959L	5	BP-198	1	muté	H	proposant	BP2	17	5D+0EM	non	3	-	0	1	Trouble anxieux généralisé	0	0	
					-	F	germain	BP1											
					-	H	germain	sain											
					-	H	germain	sain											
					-	H	père	sain											
					-	F	mère	UP (décédée)											
	Délétion Exon 2	6	BB-075	1	muté	F	proposant	BP1 maniaq ur	28	1M	non	0	-	1M	1	Attaques paniques	0		
				2	-	M	père	SCZ ou BP					Li2+						
				3	-	F	mère	SCZ?											
				9	-	M	germain	SCZ (décédé)				1							
SYNPR	L20F	7	BB-185	1	muté	M	proposant	BP1	22	1D+4M+0EM	non	1	-	2M	1	0		alcool, cannabis	
				2	-	M	père	BP1?	47	FM			-		1			alcool (47 ans)	
				3	-	F	mère	BP1	47	1D+2M+EM	non	0	hyperthyroïdie so	1M	1	Attaques paniques	non	0	
				4	-	F	germain	saine à 20 ans											
NRXN1	Délétion	8	BP-319	1	muté	H	proposant	BP1	21	1D+1M		0	-	1M	1	0		cannabis (16 ans)	
				3	pas mutée	F	mère	saine				0							
				2	muté	H	père	sain											
				4	muté	F	germain	BP1 (maniaq u	16	2M+0EM	non	0	réponse aux antic	1M	1	Trouble anxieux généralisé	0		
				5	pas muté	H	germain	BP2(hypomar	19			0			1			cannabis (18 ans)	
GABARAPL1	Duplication	9	BB-062	1	muté	F	proposant	BP1	26	4D+1M+0EM	non	1	-	0	0	0	0		
				5	muté	F	enfant	BP1	17	7D+2M		4		0		Attaques paniques			
				-	-	H	enfant	UP? (Décédé)		D		1							
				4	pas muté	H	enfant	SCZ											
PLCXD3	Délétion	10	BB-080	1	muté	F	proposant	BP1	17	3D+2M+0EM	non	3	-	0D+2M	0	0	0		
					-	F	mère	saine											
					-	H	père	sain											
LINGO2	Délétion	11	BB-071	1	muté	F	proposant	BP1 mani unip	18	M	non	0	Li2+ répondeur	M	0	0	0		
				2	-	M	père	alcool (décédé)											
				3	-	F	mère	BP+alzheimer											
				4	-	F	germain	BP1 manie uni	18	9 épisodes (dysphorie =humeur instable)				M			0		
				6	pas muté	F	germain	BP2	38			0		0			0		
					-	M	germain	sain											
					-	F	germain	BP1 (décédée)											
CDH8	Délétion	12	BB-047	1	muté	F	proposant	BP1	18	2D+4M+0EM	non	1	-	0D+3M	0	0	0		
				2	-	H	père	BP2 (décédé)											
					-	F	mère	- (décédée)											
					-	H	germain	SCZ											
GPHN	Délétion	13	BP-264	1	muté	F	proposant	BP1	17	7M+3D	-	0	-	7M	0	0	0	0	
				3	non muté		mère	saine											
ANKS1B	Délétion	14	BP-257	1	muté	F	proposant	BP1	17	3D+6M+0EM	non	0	réponse partielle	2M	1	Troubles paniques & anxié	non		
				4	muté	F	germain	BP NOS	22	D +hyperthymie					2	Phobie sociale (20ans)			Boulime (20
				3	muté	F	parent	saine											
				-	-	M	germain	sain											

Il est difficile de comparer ces deux populations de patients suivant leurs caractéristiques cliniques et les comorbidités associées, du fait du petit nombre d'individus considérés. Il semblerait néanmoins que les populations ne diffèrent pas pour la fréquence de troubles psychotiques, de suicidalité et de troubles anxieux. Une tendance est observée pour les épisodes mixtes, présents à 62,5% des cas chez les patients mutés dans *CADPS* et leurs apparentés atteints, alors que chez les patients porteurs de CNV candidats et leurs apparentés atteints ne présentent pas d'épisodes mixtes. Il est possible qu'en ayant diminué l'hétérogénéité génétique de ces patients, l'hétérogénéité clinique a elle aussi été diminuée.

Lorsque ces résultats sont comparés avec les données de la littérature, Lin *et al*, recensent que 52,3% des patients atteints de troubles bipolaires à début précoce, présentent des cycles rapides, 37,6% font des tentatives de suicide et 54,4% ont des épisodes psychotiques et 16% des troubles paniques (Lin *et al.*, 2006). La combinaison de nos deux populations ne diffère pas statistiquement des données recensées dans la littérature pour la présence d'épisodes psychotiques (Chi^2=1,5 ; ddl=1), de tentatives de suicide (Chi^2=1,7 ; ddl=1). Par contre, il semblerait que notre population présente statistiquement moins de cycles rapides (Chi^2=8,11, ddl =1). Schurhoff *et al* (Schurhoff *et al.*, 2000), ont montré que 30,2% des patients atteints de troubles bipolaires à début précoce, présentent des épisodes mixtes, ce qui est largement en-dessous du pourcentage trouvé chez les patients mutés dans *CADPS* et leurs apparentés (62,5%). Ces épisodes mixtes sont plus fréquents chez les patients atteints de troubles bipolaires à début précoce et reflèteraient une plus grande sévérité de la pathologie.

Ces résultats sont à confirmer sur de plus grands échantillons. La prévalence de troubles bipolaires de type I chez les germains de proposants présentant des troubles bipolaires à début précoce est aussi élevée que la prévalence des jumeaux monozygotes. Ces études de jumeaux ne prennent pas en compte l'âge d'apparition des symptômes ce qui peut conduire à une sous-évaluation des cas. Il existe aussi un biais de recrutement, avec des apparentés sains moins concernés par ces études et qui n'y participent pas, il est donc possible que la proportion de germains atteints, dans notre cas, soit surévaluée.

Ces résultats seraient en faveur soit d'une composante environnementale forte héritable aux troubles bipolaires à début précoce, nécessaire et suffisante, dans certaines familles, soit d'une

composante génétique, mitochondriale et/ou d'une implication des deux hypothèses 'multiple rare variants for common diseases' et 'common variant for common diseases' dans la vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires, surajoutées à une composante environnementale. D'après les résultats des études d'adoption, il est plus probable que l'effet de l'environnement soit très précoce, pendant la vie fœtale et/ou la petite enfance.

Chapître IV : Discussion générale et perspectives

L'existence d'une pathologie chez un individu est la conséquence de l'intrication de trois variables : la variable génétique, la variable stochastique et la variable environnementale. Suivant les pathologies, ces variables n'ont pas le même poids. Parfois, l'environnement peut avoir un rôle majeur, comme par exemple une maladie infectieuse telle que la grippe. Parfois seule la génétique peut avoir un rôle dans la genèse de la pathologie et son maintien, comme dans le cas de patients mutés dans le gène CFTR, impliqué dans la mucoviscidose. Cette composante est finie et déterminée à la naissance, même si elle peut présenter quelques modifications acquises au cours de la vie de l'individu. Elle est donc plus facile à étudier que l'environnement, variable qu'on maîtrise beaucoup moins. D'après les données de la littérature, les trois composantes ont un rôle dans la physiopathologie des troubles bipolaires. Afin de mieux comprendre cette physiopathologie, nous nous sommes intéressés à sa composante génétique.
Le trouble bipolaire est une pathologie psychiatrique génétiquement complexe. Nous avons donc utilisé plusieurs stratégies différentes et complémentaires pour l'investir, à l'échelle du SNP, du gène ou du génome.

Implication des gènes étudiés dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires

SYNPR

Nous avons étudié le gène *SYNPR* comme gène candidat à la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Le séquençage du gène, nous a permis d'identifier une seule mutation non-synonyme unique L20F, qui aurait un effet probablement dommageable sur la fonction protéique, identifiée chez un seul patient. Cependant cette mutation est présente dans l'ADN de deux témoins, elle n'est donc pas spécifique des patients et pas plus fréquente chez les patients. Ce variant ne semble donc pas être un variant de vulnérabilité aux troubles bipolaires. Une micro-délétion référencée chez une personne saine enlève les trois derniers exons du gène, soit près de la moitié de la séquence codante du gène. Cette micro-délétion affecterait le domaine MARVEL de la protéine et les répétitions riches en sérines. Le domaine MARVEL serait impliqué dans la formation d'un pore de libération rapide de

neurotransmetteurs. Il serait donc fort possible que cette micro-délétion ait aussi un effet délétère sur la fonction de la protéine.

Par génotypage individuel, nous avons identifié deux associations spécifiques du trouble bipolaire à début précoce, une association allélique avec un variant localisé en 3'UTR, qui ne résiste pas à la correction pour tests multiples et une association haplotypique significative avec un haplotype particulier englobant la quasi totalité du gène. L'haplotype associé n'a pas été borné et pourrait-être en déséquilibre de liaison avec un variant fonctionnel dans ou hors gène ou dans un autre gène. Les données de génotypage pangénomique n'ont pas montré d'association allélique significative dans le gène. Les précédentes études d'association pangénomiques ne font pas non plus état de variant, dans le gène, associé significativement aux troubles bipolaires. Par contre, nous avons identifié une association génotypique, localisée dans un intron du gène, spécifique du trouble bipolaire à début précoce. Ces résultats ont été confirmés par une technique indépendante. Ce variant n'est pas à l'équilibre d'Hardy-Weinberg ni chez les témoins, ni chez les patients, par contre, lorsque les deux populations sont prises en compte, le variant est à l'équilibre. Ce déséquilibre, correspond chez les patients atteints de troubles bipolaires à début précoce à un déficit en hétérozygotes. Il est donc possible que l'hétérozygotie pour ce variant soit un facteur protecteur des troubles bipolaires à début précoce. Ces résultats nécessitent d'être répliqués dans des échantillons indépendants de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce et de témoins. Jusqu'à présent, les études d'association pangénomiques se sont particulièrement concentrées sur les études d'associations alléliques, mais aucune aux associations génotypiques.

Le gène n'a pas montré de différence significative d'expression dans l'aire de Brodmann 46 du cortex préfrontal post-mortem de patients bipolaires, de patients schizophrènes et de témoins, en fonction du statut, des allèles et des génotypes du SNP 22, de l'âge d'apparition des symptômes et de la suicidalité. Lopez de Lara *et al* (Lopez de Lara *et al.*, 2010), ont observé une surexpression du gène par étude sur puce (FC=1,94, p=0,013) dans les aires de Brodmann 8 et 9 de cortex dorsolatéraux post-mortem de 8 patients bipolaires et 12 sujets contrôles, provenant de la Quebec Suicide Brain Biobank. L'étude de réplication a montré qu'une tendance à la surexpression est observée en PCRq, dans l'aire de Brodmann 46 de cortex préfrontaux de 23 patients bipolaires et 24 sujets contrôles (FC=1,17, p=0,2). Il serait intéressant de répliquer ces données par l'étude de l'expression du gène dans les aires de Brodmann 8 et 9 de cortex dorsolatéraux post-mortem en fonction du statut : atteint de troubles bipolaires versus sain et en fonction des allèles du

SNP 22 et du génotype du variant intronique associé. Il est possible que ces variants soient en déséquilibre de liaison avec ou soient des variants fonctionnels qui aient un effet régulateur région corticale spécifique. Les autres études d'expression sur puce à partir de cortex préfrontaux de patients bipolaires et de témoins n'ont pas montré de dérégulation répliquée du gène.

Bien que *SYNPR* soit dans une région de liaison aux troubles bipolaires à début précoce, *SYNPR* ne semble pas impliqué dans l'hypothèse de 'multiple rare variants for common diseases'. Les résultats obtenus étayent la possible implication du gène dans l'hypothèse 'common variant for common diseases'. Cependant, les variants fonctionnels n'ont pas été identifiés et ces résultats nécessitent d'être approfondis, par des études de réplication.

CADPS

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont en faveur d'une implication de *CADPS* dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Premièrement, *CADPS* est localisé dans une région répliquée de liaison au trouble bipolaire. Deuxièmement, l'étude génétique du gène a montré plusieurs variants rares qui semblent délétères et à forte pénétrance. Un patient porte une délétion de l'exon 2 du gène, qui est très conservé suivant les espèces considérées. Plusieurs mutations uniques non-synonymes spécifiques de notre population de patients ont été trouvées et affectent 1/22 patients étudiés. La récurrence de ces mutations rares atteste de l'implication du gène dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Le ratio mutation synonyme/mutation non-synonyme identifié à l'issue du séquençage du gène, est environ trois fois plus faible comparé aux données du projet 1000 génomes. Ce résultat suggère que *CADPS* semble plus muté dans notre population de patients comparée à la population de sujets témoins caucasiens du projet 1000 génomes. Ensuite, l'étude de la co-occurrence de mutations avec le statut malade dans les familles a révélé un Odd ratio très élevé. Cependant, le petit nombre d'apparentés sains dont l'ADN est disponible ajoute un biais au calcul. Puis, les proposants mutés dans *CADPS* ont davantage d'épisodes mixtes que les proposants mutés dans les autres gènes et que les patients atteints de troubles bipolaires à début précoce, étudiés dans la littérature. Il semblerait que ces patients ont une atteinte clinique plus sévère que les autres patients étudiés. De plus, Lopez de Lara *et al* (Lopez de Lara *et al.*, 2010), ont montré une surexpression de *CADPS* dans les aires de Brodmann 8 et 9 de cortex dorsolatéral de

patients bipolaires comparé aux témoins. Toutes ces données suggèrent l'implication de *CADPS* dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

La pathophysiologie des troubles bipolaires est à ce jour méconnue. Une neurotransmission dérégulée du glutamate, de la sérotonine et de la dopamine a été reportée dans les troubles bipolaires. Cependant, les mécanismes sous-tendant ces dérégulations ne sont pas clairs. Des données pharmacologiques appuient le rôle de la dopamine dans les troubles bipolaires, avec des produits antimaniaques utilisés couramment qui antagonisent l'activité dopaminergique et de nombreux produits antidépresseurs qui l'agonisent. Les thymorégulateurs, tels que le Li^{2+} ou le valproate de sodium sont connus pour partager des fonctions dans la transmission dopaminergique. De plus, la dextroamphétamine induit des symptômes comme maniaques chez des sujets sains (Jacobs *et al.*, 1986). L'analyse des métabolites de la dopamine indique une suractivité de la dopamine en phase maniaque et le contraire en phase dépressive. Des études ont montré des dérégulations de l'axe adréno-hypothalamo-hypophysaire dans les troubles bipolaires. Les glucocorticoïdes ont de multiples effets sur les neurones dopaminergiques, tels que la recapture, le métabolisme et les patterns d'embrasement (Cousins *et al.*, 2009). L'axe adréno-hypothalamo-hypophysaire régulerait le système dopaminergique. Le modèle suggéré serait une vulnérabilité génétique qui conférerait un phénotype de type maniaque. Ce phénotype se révèlerait avec un environnement déclencheur tel qu'un stress dans la vie précoce de l'individu. Suivant la durée, la quantité, la qualité et le degré de répétition, le stress de privation maternelle chez les rongeurs nouveau-nés peut-être associé à des comportements de type anxiety-like et sont accompagnés d'une augmentation des hormones de stress. Plus d'un patient atteint de troubles bipolaires sur deux a été exposé à des traumatismes dans l'enfance (Hyun *et al.*, 2000). Il a été montré que les traumatismes subis dans l'enfance sont associés à une aggravation de l'atteinte clinique des troubles bipolaires avec un âge d'apparition des symptômes plus précoce (Garno *et al.*, 2005), des cycles rapides, des caractéristiques psychotiques, des conduites suicidaires, des mésusage de toxiques et une comorbidité avec le trouble panique, ces caractéristiques cliniques sont trouvées chez les patients mutés dans *CADPS*. Les conséquences neurobiologiques de ces traumatismes sont une altération de la réponse catécholaminergique au stress et une hyperréactivité de l'axe corticotrope. Cet environnement aurait un effet depressive-like et/ou anxiolytic-like et activerait l'axe adréno-hypothalamo-hypophysaire. Ces traumatismes précoces, pourraient moduler le fonctionnement cérébral et le système limbique cérébral. Les conséquences de

ces traumatismes seraient inscrites dans l'ADN par des mécanismes épigénétiques et seraient hérités s'ils affectent les lignées germinales. Il est fort probable que la physiopathologie des troubles bipolaires soit beaucoup plus complexe que ce que le modèle propose. Cependant, il faut d'abord poser des hypothèses simples, les tester puis les affiner et les compléter.

Les protéines CAPS1 et CAPS2, chez la souris, ont des fonctions très similaires, malgré un pattern d'expression spatio-temporel différent. Ces protéines sont des régulateurs essentiels de l'apprêtage des vésicules synaptiques et des vésicules à corps dense dans les neurones de mammifères et les cellules neuroendocrines. Les deux isoformes CAPS favorisent aussi la recapture ou le stockage des monoamines dans les vésicules (Brunk *et al.*, 2009). De plus, CAPS1 est capable d'interagir directement avec le récepteur cytosolique à la dopamine DRD2. CAPS régule donc la libération de neurotransmetteurs, impliqués dans les troubles bipolaires. Les souris *CAPS2-/-* montrent une hyperactivité, une horloge interne plus longue et une diminution du comportement exploratoire (diminution des interactions avec un étranger, avec un objet) et/ou un comportement de type anxiety-like, suggérant un phénotype mania-like (Sadakata *et al.*, 2007). Les souris *CADPS1-/-* meurent peu de temps après leur naissance. Elles ne présentent pas d'anomalies neurodéveloppementales. Le comportement des souris *CAPS1+/-* n'a pas été étudié. Cependant, les redondances fonctionnelles entre les deux isoformes CAPS1 et CAPS2 suggèrent que les souris CAPS1+/- pourraient avoir un phénotype similaire à celui des souris *CAPS2-/-*. Les souris *CADPS1+/-* pourraient être un des premiers modèles animaux pertinents dans l'étude des troubles bipolaires. En effet, le champ d'étude des modèles animaux souffre d'un manque de mutations à forte pénétrance, répliquées dans des gènes et d'un manque d'une compréhension profonde de la pathophysiologie des troubles. Les rongeurs développés, présentent des symptômes mania-like, mais sont incapables de reproduire spontanément une alternance de comportements mania-like et depressiv-like (Nestler *et al.*, 2010). Les modèles de comportement mania-like les plus utilisés impliquent des rongeurs normaux, traités avec des psychostimulants, tels que la cocaïne ou l'amphétamine (Einat *et al.*, 2006). Plus récemment, un modèle de souris transgénique, surexprimant la *GSK3β* (*Glycogen Synthase Kinase-3β*) présentent une hyperphagie, une hyperlocomotion, une diminution de l'immobilité dans le test de la nage forcée et une diminution du comportement anxiety-like (Prickaerts *et al.*, 2006). Un variant dans la *GSK3β* a été associé dans le trouble bipolaire et le Li^{2+} inhibe cette protéine (Shaldubina *et al.*, 2001, Beaulieu *et al.*, 2008). Un autre modèle animal existe, pour les souris qui ont une

mutation perte de fonction dans le gène *Clock*. Ces souris présentent des comportements de type mania-like qui sont réversés par une administration chronique de Li^{2+} (Roybal *et al.*, 2007). Ces modèles animaux manquent d'arguments génétiques, tels que des variants rares à forte pénétrance dans un gène donné et environnementaux, impliqués dans l'étiologie des troubles bipolaires. Le modèle proposé investit les composantes génétique et environnementale possiblement impliquées dans les troubles bipolaires. Pour étudier la composante environnementale, nous avons choisi le modèle de séparation prolongée mère-nouveau-né, puisqu'il induit des comportements anxiety-like et qu'il active l'axe Adréno-Hypothalamo-Hypophysaire chez le rongeur, impliqué aussi dans les troubles bipolaires.

La région 3p14

La liaison suggestive identifiée dans la région 3p14 lors de l'étude de liaison pangénomique sur paires de germains atteints de troubles bipolaires à début précoce est augmentée lorsque la région est densifiée en marqueurs. Parmi les 4 régions densifiées en marqueurs, la valeur du NPL augmente seulement pour les régions 3p14, pour les deux groupes phénotypiques (étroit : BPI-EO, large : BPI, BPII, SCA, UP-EO) et 20p12 pour le groupe phénotypique large. Cette liaison de la région 3p14 pour les deux groupes phénotypiques révèle une absence de spécificité au trouble bipolaire à début précoce. Malgré le nombre peu élevé de patients ayant participé à l'étude la valeur de NPL obtenue (NPL=3,83, p=0,0005) n'a été trouvée que dans 3 autres études de liaisons. La liaison à cette région dépasse le seuil de significativité pour génome entier, après 10000 simulations, qui s'élève à une valeur de NPL de 3,23, dans cette étude. Ces travaux ont aussi montré qu'un excès d'allèles maternels sont partagés dans la région 3p14 par des germains atteints de troubles bipolaires de type I à début précoce (OR=9,3 ; IC(1,6-54,8) ; p=0,008), mais ces résultats ne sont plus significatifs après correction de Bonferroni (Etain *et al.*, 2006). Nous n'avons pas pu confirmer ce résultat car nous n'avions que rarement l'ADN des parents des proposants mutés dans *CADPS*. Notre équipe a complété ces travaux par une étude ajoutant des marqueurs génétiques et des paires de germains. Cette étude a confirmé la liaison de la région 3p14 avec les troubles bipolaires par la méthode des MLS pour *Maximum Likelihood Score* ($MLS_{étroit}$=1,60, p=0,006 ; MLS_{large}=1,66, p=0,005). Notre équipe a testé si l'hétérogénéité clinique observée chez les patients et leur germains sous-tendait une hétérogénéité génétique. Les différents tests n'ont pas révélé d'hétérogénéité génétique dans la région 3p14 en fonction des différents phénotypes considérés. Les

facteurs de risque dans cette région n'influenceraient pas l'âge d'apparition des premiers symptômes, mais bien la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

La région 3p14 est détectée dans plusieurs autres études de liaison avec une valeur de p<0,01 (Cichon *et al.*, 2001, Kelsoe *et al.*, 2001, Radhakrishna *et al.*, 2001, McInnis *et al.*, 2003, Fallin *et al.*, 2004, Lopez de Lara *et al.*, 2010). Ces données écartent la possibilité que la liaison suggestive trouvée en 3p14 soit un faux-positif. Lopez de Lara *et al* (Lopez de Lara *et al.*, 2010), ont réalisé une analyse de liaison paramétrique à partir de 36 familles multiplex incluant des proposants exclusivement répondeurs au lithium, avec un âge moyen d'apparition des premiers symptômes de 24,5 ±7,9 ans. Une des régions les plus liées de leur étude est la région 3p14 ($LOD_{D3S3697}$=2,04 ; p=0,0012). Ces données suggèrent que la région 3p14 est suggestivement liée à un autre sous-groupe homogène de patients et justifient l'approche catégorielle des études génétiques menées dans les troubles bipolaires. L'étude d'Etain *et al*(Etain *et al.*, 2006), montre des résultats plus significatifs. Il existe un recouvrement entre les patients répondeurs au lithium et les patients atteints de trouble bipolaire à début précoce, puisque l'âge d'apparition moyen des symptômes des patients est de 24,5 ±7,9 ans. Ces résultats ne remettent, donc pas en cause notre choix de sous-groupe de patients, mais l'appuient.

Une étude d'expression sur puce, des gènes de la région, sur un petit nombre de sujets, a montré une surexpression répliquée de *MAGI1* dans différentes régions corticales post-mortem, chez les patients bipolaires. On observe aussi, que parmi les autres gènes de la région, *SYNPR* et *CADPS* sont surexprimés dans les régions corticales dorsolatérales 8 et 9 avec un Fold Change>2 et une valeur de p≤0,05. Plusieurs sondes sont testées dans le gène *CADPS* pour les aires de Brodmann 8 et 9 et montrent le même résultat de surexpression, contrairement aux sondes testées dans l'aire de Brodmann 44 qui révèlent des résultats divergents. Ces données suggèrent que, suivant les régions corticales considérées, les mécanismes de régulations diffèrent et dénotent leurs complexités dans les troubles bipolaires. Ces données démontrent l'intérêt d'étudier en expression, les diverses régions impliquées dans le système limbique.

Ces travaux de thèse ont montré des résultats positifs dans l'étude de *SYNPR* et de *CADPS*. L'ensemble de ces arguments confirme d'une part notre stratégie d'étude et d'autre part l'implication de la région 3p14 dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Cependant, notre approche gène candidat positionnel a un biais méthodologique : l'absence d'exhaustivité dans notre étude de gènes candidats.

PLCXD3

Le gène *PLCXD3* code une phospholipase C spécifique du phospho-inositol. Les antidépresseurs tricycliques tels que la désipramine sont connus pour induire des cycles rapides ou des épisodes maniaques ou hypomaniaques (Fukuda *et al.*, 1994). Ces antidépresseurs stimulent la phospholipase C et la production de second messager inositol 1,4,5-triphosphate. La voie de signalisation des phosphoinositides a déjà été impliquée dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

L'étude d'association pangénomique réalisée au laboratoire entre les patients atteints de troubles bipolaires à début précoce et les sujets témoins a montré que deux variants à proximité du gène font partie des top SNP associés au trouble bipolaire à début précoce. Parmi les SNP répliqués en association, dans l'échantillon de réplication du WTCCC, deux variants sont localisés à 55kb et 165kb de *PLCXD3*. Ces résultats ne sont pas répliqués dans l'échantillon du GAIN-TGen. Afin de comprendre leur implication dans le trouble bipolaire, une étude d'expression préliminaire a été réalisée et n'a pas mis en évidence de corrélation entre le niveau d'expression et un allèle en particulier dans l'aire 46 de Brodmann du cortex préfrontal post-mortem. Ce résultat est en adéquation avec les études d'expressions publiées à ce jour. Cependant, il serait intéressant de vérifier le niveau d'expression du gène dans les autres régions constitutives du système limbique chez les patients atteints de troubles bipolaires.

Grâce aux données de génotypage sur puce, nous avons identifié une délétion qui enlève le promoteur et le premier exon du gène, chez un patient atteint de trouble bipolaire à début précoce. Aucune délétion des séquences codantes du gène n'est référencée dans les bases des données internationales. Le nombre de patients dont l'ADN a été analysé ne nous a pas permis d'identifier de mutation non-synonyme dans le gène. Il est vrai que nous n'avons pas quantifié les différentes séquences codantes du gène chez les patients étudiés. Cependant, la région 5p13 n'est pas liée aux troubles bipolaires, à notre connaissance. Il semblerait que le gène ne soit pas impliqué dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, sous l'hypothèse de 'multiple rare variants for common diseases'.

Pour conclure sur le rôle ou non du gène dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, sous l'hypothèse de 'common variants for common diseases', il faudrait répliquer les associations identifiées et trouver les variants fonctionnels.

Ainsi les résultats positifs de ces travaux ont confirmé le système candidat suspecté dans la vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires : les gènes synaptiques. Grâce à l'étude pangénomique, un autre système mis en jeu est confirmé dans les troubles bipolaires : la voie du phosphatidyl-inositol. Aujourd'hui, il existe plusieurs défis scientifiques, tout d'abord identifier les variants fonctionnels à partir des associations reportées dans la littérature et ensuite comprendre le rôle de l'ensemble des variants fonctionnels : rares et fréquents, avec un environnement donné, dans la physiopathologie des troubles bipolaires.

Considérations expérimentales

L'étude génétique de *CAPDS* a montré qu'un patient atteint de trouble bipolaire à âge de début non précoce porte une délétion de l'exon 2 de *CADPS*. Le frère était atteint de schizophrénie et il est probable que les deux parents soient aussi atteints. Ces résultats suggèrent l'inclusion, dans les futures études génétiques menées au laboratoire, de cas familiaux, quelque soit leur âge d'apparition des symptômes, ajoutés aux patients atteints de troubles bipolaires à début précoce. Ces cas familiaux, pourraient nous aider à expliquer une part non négligeable de la génétique des troubles bipolaires.

La découverte de la délétion de l'exon 2 de *CADPS* chez un patient a souligné la présence de micro-remaniements qui pourraient avoir un rôle essentiel dans l'étiologie de la pathologie. Les conséquences de ces micro-délétions peuvent-être relativement importantes sur la fonction de la protéine encodée. Il serait important d'investir ces micro-remaniements dans les séquences codantes de **manière systématique** lorsqu'on étudie l'ADN de patients pour trouver des variants de vulnérabilité aux troubles bipolaires et de manière générale. Il est vrai qu'aujourd'hui, les études génétiques sur les troubles bipolaires se concentrent surtout sur des micro-remaniements de plus de 100kb du fait de la résolution des puces pré-designées. Cette taille est importante à l'échelle d'un gène par exemple : *CADPS1* fait 455kb et ne permet pas d'identifier des micro-remaniements plus subtiles. En effet, dans les études actuelles il manque des recherches de micro-remaniements de taille inférieure. Ces études seront bientôt rendues possibles avec une densification des variants testés par puce. Il faudrait que ces puces soient dessinées de telle sorte à être densifiées en variants fréquents dans les séquences codantes ou à proximité.

Suite à l'identification de la délétion de l'exon 2 de *CADPS*, nous avons essayé de quantifier l'ADN des patients par la technique du High Resolution Melting, pour les

séquences codantes du gène *PLCXD3*. Cette technique avait l'avantage de donner la possibilité d'étudier de manière quantitative et qualitative, l'ADN des patients. Cependant, l'aspect quantitatif n'a pu être exploité à cause de limite de sensibilité de la PCR quantitative.

Implications cliniques

Continuum clinique entre la schizophrénie et les troubles bipolaires ?

Les CNV modifiant des gènes peuvent avoir des conséquences désastreuses sur les protéines codées. L'étude de CNV dans notre cohorte, nous a permis de cibler de potentiels gènes candidats à la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Notamment *CDH8*, identifié transloqué dans l'ADN d'un patient schizophrène, qui présente des hallucinations auditives et un délire de persécution. La translocation t(1;16)(p31.2;q21) entraîne un changement du cadre de lecture du gène dès le deuxième exon du gène (Millar *et al.*, 2005). De plus, deux rares micro-délétions du gène sont présentes chez 3 germains atteints d'autisme et chez un proposant et son père atteints de difficultés d'apprentissage (Pagnamenta *et al.*, 2011). Aucune micro-délétion du gène n'est présente dans l'ADN de 5023 témoins. Il est intéressant de noter que la patiente bipolaire de notre étude, qui porte une micro-délétion dans le gène, a présenté 3 épisodes maniaques délirants et a un frère schizophrène décédé d'un suicide. Cette micro-délétion pourrait avoir un rôle dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires du patient et/ou dans la présence des épisodes délirants ou bien elle est fortuite. Il est vrai que les cadhérines varient beaucoup du fait de processus évolutifs, au même titre que les récepteurs olfactifs. Cependant, des micro-remaniements dans 3 pathologies psychiatriques différentes, chez 4 proposants indépendants est suffisamment rare pour suggérer que ce n'est pas le fruit du hasard. Une autre famille ayant le proposant portant la délétion de l'exon 2 dans *CADPS* a des apparentés atteints de schizophrénie. Ce proposant a fait un épisode délirant en phase maniaque. L'ADN de ses apparentés n'est malheureusement pas disponible pour étudier la co-occurrence de la délétion et du statut clinique, nous ne pouvons donc pas savoir si *CADPS* pourrait-être impliqué dans les symptômes psychotiques de cette famille. Cependant d'autres patients porteurs de mutations dans *CADPS* présentent des épisodes délirants. Aucune étude ne porte sur *CADPS* et sa possible implication dans les troubles bipolaires ou la schizophrénie. Le gène *CADPS* est localisé dans une région de liaison au trouble bipolaire. Quelques rares études ont reporté cette région comme région de liaison dans d'autres pathologies

psychiatriques telles que la schizophrénie (Paunio *et al.*, 2009, Butler *et al.*, 2010), la dépression (Butler *et al.*, 2010) et le syndrome d'Asperger (Ylisaukko-oja *et al.*, 2004). Cette région contient le site fragile fréquent : FRA3B. Les sites fragiles impliquent de grandes expansions de microsatellites ou de minisatellites riches en CCG ou en AT. Ces sites fragiles sont corrélés avec des points de cassures chromosomiques dans les tumeurs et sont montrés comme jouant un rôle dans l'apparition de délétions, de duplication, de translocations et de l'intégration d'ADN étranger (Zlotorynski *et al.*, 2003). Ce site FRA3B est le site significativement exprimé le plus fréquemment dans des cellules de patients schizophrènes comparés à des sujets témoins (Demirhan *et al.*, 2006). Ces résultats dénotent une instabilité chromosomique chez les patients schizophrènes, cette instabilité a aussi été observée par l'étude de micro-remaniements chromosomiques dans la schizophrénie, mais n'a pas été démontrée dans les troubles bipolaires. *CADPS* est muté chez plusieurs proposants atteints de troubles bipolaires à début précoce, qui pour la plupart n'ont pas d'apparentés atteints de schizophrénie. Le cas de co-occurrence des deux pathologies dans les familles mutées dans CADPS est unique. Les sujets mutés ne présentent pas plus de symptômes délirants, indépendamment de l'effet putativement délétère de la mutation portée, que les autres sujets mutés dans les autres gènes. Les souris *CADPS2-/-* montrent, une hyperactivité, une plus horloge interne plus longue et une diminution du comportement exploratoire (diminution des interactions avec un étranger, avec un objet) et/ou un comportement de type anxiety-like. Ces données suggèrent plutôt un comportement mania-like des souris *CADPS2-/-*. Enfin, le gène n'a pas été décrit dans la schizophrénie comme associé ou portant des mutations ou des variants du nombre de copies. Il est donc plus probable que *CADPS* soit bien un gène impliqué dans les troubles bipolaires et non dans les symptômes communs aux deux pathologies. Ainsi peu d'arguments sont en faveur d'un rôle de *CADPS* dans la composante génétique de la schizophrénie. Lichtenstein *et al*, (Lichtenstein *et al.*, 2009), ont montré que les apparentés, quelque soit leurs relations de parenté avec le proposant atteint de trouble bipolaire, ont un risque augmenté de développer une schizophrénie, incluant même les enfants adoptés de parents biologiques atteints de troubles bipolaires. Le risque est aussi augmenté dans la situation inverse. Les deux pathologies sont des maladies complexes qui ont des héritabilités proches : 64% pour la schizophrénie et 59% pour les troubles bipolaires. Badner *et al* (Badner *et al.*, 2002), ont montré, que des régions liées aux troubles bipolaires 13q et 22q étaient aussi partagées avec la schizophrénie. L'étude menée par l'ISC (International Schizophrenia Consortium, (Purcell *et al.*, 2009) a montré une composante polygénique, impliquant des milliers d'allèles fréquents à très faible effet, au risque de développer une

schizophrénie. Cette étude a montré que cette composante contribue aussi au risque de développer un trouble bipolaire. Les études d'expression ont montré que des dérégulations, principalement dans le cortex préfrontal post-mortem, dans le même sens, affectent des gènes communs à la schizophrénie et aux troubles bipolaires (par exemple : la *MAOA*, *ERBB3*, *SOX10*, *MAG*). Enfin, l'existence d'une pathologie avec une atteinte clinique intermédiaire entre les troubles bipolaires et la schizophrénie, rend difficile le choix du diagnostic entre une schizophrénie ou un trouble bipolaire. En effet, des patients atteints de troubles bipolaires ou de schizophrénie semblent présenter à la fois des changements d'humeur et des symptômes psychotiques. Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ajoutent donc un argument en faveur d'un continuum transnosographique entre ces deux pathologies. Par contre, de très rares cas de troubles bipolaires ou de schizophrénie sont reportés dans des familles de proposants atteints de troubles du spectre autistique. Il est donc possible que suivant les variants dans *CDH8*, les conséquences soient différentes et qu'ils soient spécifiques, dans notre cas, d'une vulnérabilité aux psychoses plutôt qu'aux troubles du spectre autistique.

Les gènes suspectés dans ces deux pathologies sont associés aux troubles ou aux symptômes communs à ces troubles ? Comment expliquer cette composante génétique pour une part commune à ces deux pathologies distinctes ? Dans le cas de *CDH8*, nous manquons d'information pour conclure. Il faudrait étudier la ségrégation du variant au sein des familles en fonction des différents statuts cliniques. Il faudrait aussi rechercher des variants dans le gène, chez des patients bipolaires et schizophrènes. Ces résultats dans *CDH8* sont intéressants parce qu'ils ajoutent des arguments en faveur d'une composante génétique commune aux psychoses, tel qu'un gène majeur, avec des gènes modulateurs et un environnement particulier qui feront pencher la balance tantôt vers un trouble bipolaire tantôt vers une schizophrénie. Dans les autres familles de patients mutés dans *CADPS*, des apparentés présentent des troubles bipolaires de type 1 et 2. Ainsi, suivant les familles et les gènes mutés, il est possible que les gènes incriminés soient spécifiques d'un trouble, alors que d'autres sont communs à la schizophrénie et aux troubles bipolaires.

<u>Démembrement phénotypique</u>

Les troubles bipolaires sont hétérogènes cliniquement, illustrés en partie par les différents types de troubles bipolaires existants : type I, type II, non spécifié, états mixtes. En observant le tableau clinique des différents patients porteurs de mutations et de leurs apparentés eux-mêmes atteints, à leurs troubles bipolaires, s'ajoutent de nombreuses caractéristiques cliniques

(l'âge d'apparition des premiers symptômes, les épisodes mixtes, les cycles rapides, les épisodes délirants…) et de multiples comorbidités associées telles que les troubles anxieux, les abus et dépendances aux toxiques, la suicidalité. Ces données illustrent la complexité de ces troubles et laissent imaginer l'imbroglio sous-tendant les mécanismes physiopathlogiques impliqués. Le démembrement clinique a de ce fait toute sa justification. Bien que l'étude des cas familiaux soit plus pertinente pour identifier une vulnérabilité génétique, cette approche souffre de limites méthodologiques quantitatives et qualitatives liées aux données famillliales. Par exemple, disposer de familles avec plusieurs germains atteints avec un statut clinique clair et l'ADN de chaque individu d'une famille est relativement rare. L'étude génétique de patients en fonction de leur réponse au Li^{2+} peut-être aussi très pertinente. En effet, les patients non-répondeurs pourraient porter des mutations dans des gènes codant des protéines impliquées dans la réponse au Li^{2+} et de ce fait, augmenteraient l'hétérogénéité génétique des populations de patients étudiées. Cependant, cette réponse au Li^{2+} est plus difficile à déterminer qu'un âge d'apparition des symptômes. Elle nécessite une bonne observance du patient sur une longue durée, qui n'est pas toujours vérifiable, elle demande du temps, de définir les doses correspondantes. L'approche menée au laboratoire, basée principalement sur des patients atteints de troubles bipolaires à début précoce a montré que les patients présentaient une association génotypique dans *SYNPR* qui leur est spécifique. L'étude pangénomique a aussi montré un excès de faibles valeurs de p dans l'échantillon de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce, comparé à l'étude d'association comprenant l'ensemble de nos patients. Des variants rares du nombre de copies et des mutations non-synonymes affectent des gènes candidats et sont trouvés dans l'ADN de patients atteints de troubles bipolaires à début précoce. Les résultats positifs obtenus montrent que les études génétiques menées à partir de l'ADN des patients atteints de troubles bipolaires à début précoce sont pertinentes. Des études de réplications sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Toutefois, comment savoir si le gène incriminé est impliqué dans les troubles ou bien dans l'âge d'apparition des troubles ? Pour faire la distinction, il faudrait réaliser des études de réplication sur des échantillons d'ADN de patients atteints de troubles bipolaires, indépendamment de leur âge de début.

L'étude de la génétique des patients ayant un âge d'apparition précoce des premiers symptômes a permis l'identification de gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaires à début précoce. Parmi ces gènes, *CADPS* est muté dans l'ADN de plusieurs sujets indépendants. Les caractéristiques cliniques des patients mutés dans *CADPS*, montrent qu'il s'agit de cas familiaux avec au moins un apparenté atteint, avec davantage d'épisodes mixtes. Cette

caractéristique montre un sous-groupe avec une plus grande homogénéité clinique expliquée par des mutations dans le même gène qui pourrait-être causal. Cette caractéristique est partagée avec le trouble bipolaire à début précoce. Ainsi, à partir de mutation dans un même gène, un sous-groupe de patients plus homogène cliniquement a été identifié.

Ces études génétiques ont apporté des arguments en faveur d'un continuum entre les troubles bipolaires et la schizophrénie, du fait d'une composante génétique partagée, avec un gène commun : *CDH8* portant des micro-remaniements dans différentes pathologies psychiatriques. Les résultats positifs ont validé le démembrement clinique basé sur l'âge d'apparition des premiers symptômes réalisé pour mener à bien les études génétiques. Les résultats suggèrent néanmoins de privilégier l'étude de cas familiaux.

Implication des modèles génétiques des troubles bipolaires

Hypothèse 'multiple rare variants for common diseases'

Les résultats obtenus lors de l'étude de *CADPS* confirment l'hypothèse de 'multiples variants rares qui agiraient dans la vulnérabilité génétique aux troubles bipolaires. Ces variants rares concernent 4,5% des patients et suggèrent que d'autres variants rares, qui pourraient-être délétères pour la protéine codée, n'ont pas été détectés dans le gène (aspect quantitatif peu étudié), et/ou d'autres gènes agiraient dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Nous avons privilégié l'approfondissement de l'étude de *CADPS*, mais il existe quatre autres gènes synaptiques candidats dans la région 3p14, *CACNA2D3*, *PXK*, *ARHGEF3* et *CAST*. La région 7q31 est liée suggestivement aux troubles bipolaires dans deux études indépendantes (Detera-Wadleigh *et al.*, 1999, Palo *et al.*, 2010) et contient le gène *CADPS2*, qui est, aux vues de ces résultats, un autre gène candidat à la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

Les rares micro-remaniements chromosomiques identifiés dans notre étude, retenus et validés affectent différents gènes candidats à la vulnérabilité aux troubles bipolaires. Les protéines encodées sont impliquées dans les connexions neuronales (*NRXN1*), l'adhésion cellulaire (*LINGO2*, *CDH8*), l'ancrage des protéines membranaires au cytosquelette (*ANKS1b*, *GPHN*), la transduction du signal (*PLCXD3*) et la fusion synaptique

(*GABARAPL1*). Les gènes *ANKS1b*, *LINGO2* et *PLCXD1* ont déjà été reportés dans la littérature, comme porteurs de micro-remaniements spécifiques des patients atteints de troubles bipolaires. Ainsi, les gènes *ANKS1b*, *LINGO2* et *PLCXD3* sont d'autant plus de bons candidats à la vulnérabilité aux troubles bipolaires. De plus des micro-remaniements sont reportés dans *CDH8*, ces micro-remaniements étant spécifiques de patients atteints de schizophrénie, d'autisme ou de difficultés d'apprentissage. Nos résultats n'ont pas montré de coségrégation entre les troubles bipolaires et la micro-délétion dans *NRXN1*. Soit ce micro-remaniement n'est pas impliqué dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, soit d'autres facteurs, génétiques et environnementaux sont impliqués, soit l'environnement a un effet suffisamment fort pour être seul responsable du phénotype. Si d'autres facteurs génétiques sont impliqués, l'hypothèse la plus parcimonieuse est qu'il s'agisse de variants fréquents. Dans la littérature, les gènes *CACNA1C* et *ANK3* ont été associés aux troubles bipolaires et plusieurs fois répliqués et des micro-remaniements patients spécifiques ont été trouvés dans ces mêmes gènes dans les troubles bipolaires (Priebe *et al.*, 2011). Ainsi, il est possible que les deux hypothèses soient vérifiées au sein d'une famille et même au sein d'un individu. Les séquences codantes du gène *PLCXD3* ont été étudiées chez 256 patients et n'ont pas montré de variations délétères pour la protéine. Ces résultats suggèrent de focaliser les prochaines études d'implication de gènes candidats sur *ANKS1B*, *GPHN*, *LINGO2*, *CDH8* et *GABARAPL1*. L'ensemble de ces résultats demande des études de réplications et d'approfondissements, par exemple en étudiant la séquence génétique des gènes remaniés sur l'ensemble de notre cohorte. Cette hypothèse ne rend pas compte de la fréquence élevée de la maladie par le simple fait de nombreuses mutations rares dans plusieurs gènes et de la rareté de grandes familles.

- L'hypothèse 'common variants for common diseases'

La principale limite de cette hypothèse est la faible pénétrance des variants associés et la pauvreté des réplications des variants associés dans ces études.

L'hypothèse de l'implication de variants fréquents dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires à début précoce a été étayée par les associations alléliques, génotypiques et haplotypiques identifiées dans *SYNPR.* Ces associations nécessitent d'être répliquées et approfondies par l'identification du ou des variants fonctionnels. L'étude d'association pangénomique a montré que les variants les plus associés au trouble bipolaire à début précoce, sont à proximité des gènes *PLEKHA5* et *PLCXD3*. Cependant les études de réplications montrent des résultats controversés pour ces deux gènes et

leurs régions. En effet, les variants associés à proximité des deux gènes, dans l'échantillon du WTCCC ne sont pas les mêmes que ceux identifiés dans la première analyse. L'échantillon GAIN TGen ne trouve aucun variant associé dans les 1,5 Mb constitutives de régions associées : 5p13 et 12p12. De plus les données de la littérature n'ont pas montré de top SNP associés dans ces régions. Ainsi, malgré une hétérogénéité clinique diminuée, cette étude ne nous a pas permis d'identifier de nouveaux variants associés et répliqués, mais de nouveaux gènes associés, partiellement répliqués. Nos résultats répliquent l'association avec la région dans laquelle le gène *CACNA1C* se localise. La réplication non systématique qui a été observée pour le gène, peut s'expliquer par un manque d'expressivité des variants en fonction d'un environnement particulier. En effet, suivant les populations considérées, d'origine ethnique européenne ou africaine, les variants les plus associés sont différents. Ces résultats sont en faveur d'une variabilité génétique et/ou d'une composante environnementale forte qui pourrait annuler la fonction de vulnérabilité de certains variants génétiques. Cette composante environnementale populationnelle peut-être liée par exemple, à des coutumes alimentaires. Lafourcade *et al* (Lafourcade *et al.*, 2011), ont montré qu'une diète induite pauvre en acide gras n3 polyinsaturés, chez des souris, induisait un comportement *depressive-like* au test de la nage forcée.

Les micro-remaniements retenus affectent 7/232 patients, soit 3% des patients. Un total de 7,5% des patients porte des mutations dans *CADPS* ou des micro-remaniements dans des gènes présélectionnés. De plus nous avons démontré au laboratoire, l'implication de *SNAP25* dans la vulnérabilité au trouble bipolaire à début précoce. Ces résultats dénotent que les deux hypothèses sont vérifiées et suggèrent la coexistence de ces deux hypothèses chez certains individus porteurs de mutations rares. Ces résultats mettent en lumière l'hétérogénéité génétique des troubles bipolaires, avec des gènes modifiés impliqués dans la fonction synaptique. Ils révèlent que la fonction synaptique pourrait-être dérégulée chez des patients atteints de troubles bipolaires. Ces résultats nécessitent toutefois d'être approfondis et répliqués.

Chapître V : Conclusion

Les travaux de cette thèse visaient à mieux comprendre la physiopathologie des troubles bipolaires, par l'étude de leur composante génétique. La complexité de cette composante est augmentée par une composante environnementale avec laquelle elle interagit et une hétérogèneité clinique. Nous avons donc travaillé à partir d'un sous-groupe cliniquement homogène de patients et utilisé différentes stratégies d'études génétiques complémentaires : analyse de liaison pangénomique, étude d'association pangénomique, recherche de micro-remaniements chromosomiques. Grâce à l'analyse de liaison nous avons concentré nos recherches sur des régions chromosmiques particulières telles que les régions 3p14 et 20p12. Le gène *SNAP25*, localisé en 20p12 est associé au trouble bipolaire à début précoce, pour un variant fonctionnel présent dans le promoteur du gène. Ce gène code la protéine associée aux synaptosomes de 25 kDa, impliquée dans la libération de neurotransmetteurs. Cette protéine est un partenaire cellulaire de la protéine Ca^{2+} dépendante, activatrice de la sécrétion, codée par le gène *CADPS*. Le gène *CADPS*, localisé dans la région de liaison aux troubles bipolaires 3p14, est présente des mutations rares, non-synonymes, patient spécifiques, chez 4,5% des patients. Ce gène semble aussi être impliqué dans la vulnérabilité génétique aux troubles. Les études fonctionnelles des conséquences de ces mutations non-synonymes sur la fonction de la protéine sont en cours. De plus, des études comportementales du modèle murin *CAPS+/-* sont planifiées. Ainsi, il semblerait que la libération de neurotransmetteurs soit impliquée dans la physiopathologie des troubles bipolaires. Ces résultats montrent aussi une hétérogénéité génétique, dans ce sous-groupe cliniquement plus homogène et vérifient les deux hypothèses 'common variant for common diseases' et 'multiple rare variants for common diseases'. Nous avons aussi montré que ces deux hypothèses ne sont pas exclusives et qu'elles pourraient coexister au sein d'un même individu.

Grâce aux différentes approches génétiques utilisées au cours de cette thèse, de nouveaux gènes candidats ont été identifiés et sont à l'étude, tous codent des protéines impliquées dans le fonctionnement synaptique. Ces résultats confirment que la fonction synaptique pourrait-être dérégulée dans les troubles bipolaires. Les études environnementales suggèrent que les traumas dans la petite enfance pourraient conférer une vulnérabilité environnementale aux troubles bipolaires. Les traumas entraînent des modifications durables

de l'axe adréno-hypothalamo-hypophysaire. Il serait intéressant de savoir comment ces deux vulnérabilités génétiques et environnementales interagissent.

Ces résultats positifs montrent la pertinence de nos approches et permettent d'améliorer la compréhension de la composante génétique, son interaction avec la composante environnementale et leurs contributions dans la physiopathologie des troubles bipolaires. De nouvelles perspectives s'ouvrent dans la prévention, le diagnostic et les stratégies thérapeutiques par la validation et l'utilisation du modèle murin *CAPS*+/-.

Chapître VI : Bibliographie

Bibliographie

(2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature,* 447**,** 661-78.

A.P.A., A. P. A. (1994) Washington DC.

Abdolmaleky, H. M., Cheng, K. H., Faraone, S. V., Wilcox, M., Glatt, S. J., Gao, F., Smith, C. L., Shafa, R., Aeali, B., Carnevale, J., Pan, H., Papageorgis, P., Ponte, J. F., Sivaraman, V., Tsuang, M. T. & Thiagalingam, S. (2006) Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet,* 15**,** 3132-45.

Abdolmaleky, H. M., Smith, C. L., Faraone, S. V., Shafa, R., Stone, W., Glatt, S. J. & Tsuang, M. T. (2004) Methylomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 127B**,** 51-9.

Bacanu, S. A. (2005) Robust estimation of critical values for genome scans to detect linkage. *Genet Epidemiol,* 28**,** 24-32.

Badner, J. A. & Gershon, E. S. (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry,* 7**,** 405-11.

Badner, J. A., Koller, D., Foroud, T., Edenberg, H., Nurnberger, J. I., Jr., Zandi, P. P., Willour, V. L., McMahon, F. J., Potash, J. B., Hamshere, M., Grozeva, D., Green, E., Kirov, G., Jones, I., Jones, L., Craddock, N., Morris, D., Segurado, R., Gill, M., Sadovnick, D., Remick, R., Keck, P., Kelsoe, J., Ayub, M., Maclean, A., Blackwood, D., Liu, C. Y., Gershon, E. S., McMahon, W., Lyon, G. J., Robinson, R., Ross, J. & Byerley, W. (2011) Genome-wide linkage analysis of 972 bipolar pedigrees using single-nucleotide polymorphisms. *Mol Psychiatry*.

Bah, J., Quach, H., Ebstein, R. P., Segman, R. H., Melke, J., Jamain, S., Rietschel, M., Modai, I., Kanas, K., Karni, O., Lerer, B., Gourion, D., Krebs, M. O., Etain, B., Schurhoff, F., Szoke, A., Leboyer, M. & Bourgeron, T. (2004) Maternal transmission disequilibrium of the glutamate receptor GRIK2 in schizophrenia. *Neuroreport,* 15**,** 1987-91.

Baron, M., Mendlewicz, J. & Klotz, J. (1981) Age-of-onset and genetic transmission in affective disorders. *Acta Psychiatr Scand,* 64**,** 373-80.

Baum, A. E., Akula, N., Cabanero, M., Cardona, I., Corona, W., Klemens, B., Schulze, T. G., Cichon, S., Rietschel, M., Nothen, M. M., Georgi, A., Schumacher, J., Schwarz, M.,

Abou Jamra, R., Hofels, S., Propping, P., Satagopan, J., Detera-Wadleigh, S. D., Hardy, J. & McMahon, F. J. (2008) A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol Psychiatry,* 13**,** 197-207.

Beaulieu, J. M., Marion, S., Rodriguiz, R. M., Medvedev, I. O., Sotnikova, T. D., Ghisi, V., Wetsel, W. C., Lefkowitz, R. J., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell,* 132**,** 125-36.

Bellivier, F., Golmard, J. L., Henry, C., Leboyer, M. & Schurhoff, F. (2001) Admixture analysis of age at onset in bipolar I affective disorder. *Arch Gen Psychiatry,* 58**,** 510-2.

Bellivier, F., Golmard, J. L., Rietschel, M., Schulze, T. G., Malafosse, A., Preisig, M., McKeon, P., Mynett-Johnson, L., Henry, C. & Leboyer, M. (2003) Age at onset in bipolar I affective disorder: further evidence for three subgroups. *Am J Psychiatry,* 160**,** 999-1001.

Berkel, S., Marshall, C. R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., Endris, V., Roberts, W., Szatmari, P., Pinto, D., Bonin, M., Riess, A., Engels, H., Sprengel, R., Scherer, S. W. & Rappold, G. A. (2010) Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet,* 42**,** 489-91.

Blangero, J. & Elston, R. C. (1989) Familial analysis of bipolar affective disorder using logistic models. *Genet Epidemiol,* 6**,** 221-7.

Brennand, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., McCarthy, S., Sebat, J. & Gage, F. H. (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*.

Brunk, I., Blex, C., Speidel, D., Brose, N. & Ahnert-Hilger, G. (2009) Ca2+-dependent activator proteins of secretion promote vesicular monoamine uptake. *J Biol Chem,* 284**,** 1050-6.

Butler, A. W., Breen, G., Tozzi, F., Craddock, N., Gill, M., Korszun, A., Maier, W., Middleton, L. T., Mors, O., Owen, M. J., Perry, J., Preisig, M., Rice, J. P., Rietschel, M., Jones, L., Farmer, A. E., Lewis, C. M. & McGuffin, P. (2010) A genomewide linkage study on suicidality in major depressive disorder confirms evidence for linkage to 2p12. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 153B**,** 1465-73.

Chen, P. S., Wang, C. C., Bortner, C. D., Peng, G. S., Wu, X., Pang, H., Lu, R. B., Gean, P. W., Chuang, D. M. & Hong, J. S. (2007) Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience,* 149**,** 203-12.

Cheung, J., Estivill, X., Khaja, R., MacDonald, J. R., Lau, K., Tsui, L. C. & Scherer, S. W. (2003) Genome-wide detection of segmental duplications and potential assembly errors in the human genome sequence. *Genome Biol,* 4**,** R25.

Chu, T. T., Liu, Y. & Kemether, E. (2009) Thalamic transcriptome screening in three psychiatric states. *J Hum Genet,* 54**,** 665-75.

Cichon, S., Muhleisen, T. W., Degenhardt, F. A., Mattheisen, M., Miro, X., Strohmaier, J., Steffens, M., Meesters, C., Herms, S., Weingarten, M., Priebe, L., Haenisch, B., Alexander, M., Vollmer, J., Breuer, R., Schmal, C., Tessmann, P., Moebus, S., Wichmann, H. E., Schreiber, S., Muller-Myhsok, B., Lucae, S., Jamain, S., Leboyer, M., Bellivier, F., Etain, B., Henry, C., Kahn, J. P., Heath, S., Hamshere, M., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Craddock, N., Schwarz, M., Vedder, H., Kammerer-Ciernioch, J., Reif, A., Sasse, J., Bauer, M., Hautzinger, M., Wright, A., Mitchell, P. B., Schofield, P. R., Montgomery, G. W., Medland, S. E., Gordon, S. D., Martin, N. G., Gustafsson, O., Andreassen, O., Djurovic, S., Sigurdsson, E., Steinberg, S., Stefansson, H., Stefansson, K., Kapur-Pojskic, L., Oruc, L., Rivas, F., Mayoral, F., Chuchalin, A., Babadjanova, G., Tiganov, A. S., Pantelejeva, G., Abramova, L. I., Grigoroiu-Serbanescu, M., Diaconu, C. C., Czerski, P. M., Hauser, J., Zimmer, A., Lathrop, M., Schulze, T. G., Wienker, T. F., Schumacher, J., Maier, W., Propping, P., Rietschel, M. & Nothen, M. M. (2011) Genome-wide association study identifies genetic variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder. *Am J Hum Genet,* 88**,** 372-81.

Cichon, S., Schumacher, J., Muller, D. J., Hurter, M., Windemuth, C., Strauch, K., Hemmer, S., Schulze, T. G., Schmidt-Wolf, G., Albus, M., Borrmann-Hassenbach, M., Franzek, E., Lanczik, M., Fritze, J., Kreiner, R., Reuner, U., Weigelt, B., Minges, J., Lichtermann, D., Lerer, B., Kanyas, K., Baur, M. P., Wienker, T. F., Maier, W., Rietschel, M., Propping, P. & Nothen, M. M. (2001) A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. *Hum Mol Genet,* 10**,** 2933-44.

Cooper, G. M., Nickerson, D. A. & Eichler, E. E. (2007) Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet,* 39**,** S22-9.

Cousins, D. A., Butts, K. & Young, A. H. (2009) The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disord,* 11**,** 787-806.

Craddock, N., Hurles, M. E., Cardin, N., Pearson, R. D., Plagnol, V., Robson, S., Vukcevic, D., Barnes, C., Conrad, D. F., Giannoulatou, E., Holmes, C., Marchini, J. L., Stirrups, K., Tobin, M. D., Wain, L. V., Yau, C., Aerts, J., Ahmad, T., Andrews, T. D., Arbury, H., Attwood, A., Auton, A., Ball, S. G., Balmforth, A. J., Barrett, J. C., Barroso, I., Barton, A., Bennett, A. J., Bhaskar, S., Blaszczyk, K., Bowes, J., Brand, O. J., Braund, P. S., Bredin, F., Breen, G., Brown, M. J., Bruce, I. N., Bull, J., Burren, O. S., Burton, J., Byrnes, J., Caesar, S., Clee, C. M., Coffey, A. J., Connell, J. M., Cooper, J. D., Dominiczak, A. F., Downes, K., Drummond, H. E., Dudakia, D., Dunham, A., Ebbs, B., Eccles, D., Edkins, S., Edwards, C., Elliot, A., Emery, P., Evans, D. M., Evans, G., Eyre, S., Farmer, A., Ferrier, I. N., Feuk, L., Fitzgerald, T., Flynn, E., Forbes, A., Forty, L., Franklyn, J. A., Freathy, R. M., Gibbs, P., Gilbert, P., Gokumen, O., Gordon-Smith, K., Gray, E., Green, E., Groves, C. J., Grozeva, D., Gwilliam, R., Hall, A., Hammond, N., Hardy, M., Harrison, P., Hassanali, N., Hebaishi, H., Hines, S., Hinks, A., Hitman, G. A., Hocking, L., Howard, E., Howard, P., Howson, J. M., Hughes, D., Hunt, S., Isaacs, J. D., Jain, M., Jewell, D. P., Johnson, T., Jolley, J. D.,

Jones, I. R., Jones, L. A., et al. (2010) Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature,* 464**,** 713-20.

Demirhan, O., Tastemir, D. & Sertdemir, Y. (2006) Chromosomal fragile sites in schizophrenic patients. *Genetika,* 42**,** 985-92.

Detera-Wadleigh, S. D., Badner, J. A., Berrettini, W. H., Yoshikawa, T., Goldin, L. R., Turner, G., Rollins, D. Y., Moses, T., Sanders, A. R., Karkera, J. D., Esterling, L. E., Zeng, J., Ferraro, T. N., Guroff, J. J., Kazuba, D., Maxwell, M. E., Nurnberger, J. I., Jr. & Gershon, E. S. (1999) A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 96**,** 5604-9.

Einat, H. & Manji, H. K. (2006) Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. *Biol Psychiatry,* 59**,** 1160-71.

Ellicott, A., Hammen, C., Gitlin, M., Brown, G. & Jamison, K. (1990) Life events and the course of bipolar disorder. *Am J Psychiatry,* 147**,** 1194-8.

Ensenauer, R. E., Adeyinka, A., Flynn, H. C., Michels, V. V., Lindor, N. M., Dawson, D. B., Thorland, E. C., Lorentz, C. P., Goldstein, J. L., McDonald, M. T., Smith, W. E., Simon-Fayard, E., Alexander, A. A., Kulharya, A. S., Ketterling, R. P., Clark, R. D. & Jalal, S. M. (2003) Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet,* 73**,** 1027-40.

Etain, B., Dumaine, A., Mathieu, F., Chevalier, F., Henry, C., Kahn, J. P., Deshommes, J., Bellivier, F., Leboyer, M. & Jamain, S. (2010) A SNAP25 promoter variant is associated with early-onset bipolar disorder and a high expression level in brain. *Mol Psychiatry,* 15**,** 748-55.

Etain, B., Henry, C., Bellivier, F., Mathieu, F. & Leboyer, M. (2008) Beyond genetics: childhood affective trauma in bipolar disorder. *Bipolar Disord,* 10**,** 867-76.

Etain, B., Mathieu, F., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M., McKeon, P., Roche, S., Kealey, C., Blackwood, D., Muir, W., Bellivier, F., Henry, C., Dina, C., Gallina, S., Gurling, H., Malafosse, A., Preisig, M., Ferrero, F., Cichon, S., Schumacher, J., Ohlraun, S., Borrmann-Hassenbach, M., Propping, P., Abou Jamra, R., Schulze, T. G., Marusic, A., Dernovsek, Z. M., Giros, B., Bourgeron, T., Lemainque, A., Bacq, D., Betard, C., Charon, C., Nothen, M. M., Lathrop, M. & Leboyer, M. (2006) Genome-wide scan for genes involved in bipolar affective disorder in 70 European families ascertained through a bipolar type I early-onset proband: supportive evidence for linkage at 3p14. *Mol Psychiatry,* 11**,** 685-94.

Ewald, H., Flint, T., Kruse, T. A. & Mors, O. (2002) A genome-wide scan shows significant linkage between bipolar disorder and chromosome 12q24.3 and suggestive linkage to

chromosomes 1p22-21, 4p16, 6q14-22, 10q26 and 16p13.3. *Mol Psychiatry,* 7**,** 734-44.

Fallin, M. D., Lasseter, V. K., Wolyniec, P. S., McGrath, J. A., Nestadt, G., Valle, D., Liang, K. Y. & Pulver, A. E. (2004) Genomewide linkage scan for bipolar-disorder susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families. *Am J Hum Genet,* 75**,** 204-19.

Ferreira, M. A., O'Donovan, M. C., Meng, Y. A., Jones, I. R., Ruderfer, D. M., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R. H., Green, E. K., Smoller, J. W., Grozeva, D., Stone, J., Nikolov, I., Chambert, K., Hamshere, M. L., Nimgaonkar, V. L., Moskvina, V., Thase, M. E., Caesar, S., Sachs, G. S., Franklin, J., Gordon-Smith, K., Ardlie, K. G., Gabriel, S. B., Fraser, C., Blumenstiel, B., Defelice, M., Breen, G., Gill, M., Morris, D. W., Elkin, A., Muir, W. J., McGhee, K. A., Williamson, R., MacIntyre, D. J., MacLean, A. W., St, C. D., Robinson, M., Van Beck, M., Pereira, A. C., Kandaswamy, R., McQuillin, A., Collier, D. A., Bass, N. J., Young, A. H., Lawrence, J., Ferrier, I. N., Anjorin, A., Farmer, A., Curtis, D., Scolnick, E. M., McGuffin, P., Daly, M. J., Corvin, A. P., Holmans, P. A., Blackwood, D. H., Gurling, H. M., Owen, M. J., Purcell, S. M., Sklar, P. & Craddock, N. (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet,* 40**,** 1056-8.

Frank, E., Kupfer, D. J., Thase, M. E., Mallinger, A. G., Swartz, H. A., Fagiolini, A. M., Grochocinski, V., Houck, P., Scott, J., Thompson, W. & Monk, T. (2005) Two-year outcomes for interpersonal and social rhythm therapy in individuals with bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry,* 62**,** 996-1004.

Fukuda, H., Nishida, A., Saito, H., Shimizu, M. & Yamawaki, S. (1994) Imipramine stimulates phospholipase C activity in rat brain. *Neurochem Int,* 25**,** 567-71.

Garno, J. L., Goldberg, J. F., Ramirez, P. M. & Ritzler, B. A. (2005) Impact of childhood abuse on the clinical course of bipolar disorder. *Br J Psychiatry,* 186**,** 121-5.

Grigoroiu-Serbanescu, M., Martinez, M., Nothen, M. M., Grinberg, M., Sima, D., Propping, P., Marinescu, E. & Hrestic, M. (2001) Different familial transmission patterns in bipolar I disorder with onset before and after age 25. *Am J Med Genet,* 105**,** 765-73.

Grozeva, D., Kirov, G., Ivanov, D., Jones, I. R., Jones, L., Green, E. K., St Clair, D. M., Young, A. H., Ferrier, N., Farmer, A. E., McGuffin, P., Holmans, P. A., Owen, M. J., O'Donovan, M. C. & Craddock, N. (2010) Rare copy number variants: a point of rarity in genetic risk for bipolar disorder and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry,* 67**,** 318-27.

Hamshere, M. L., Gordon-Smith, K., Forty, L., Jones, L., Caesar, S., Fraser, C., Hyde, S., Tredget, J., Kirov, G., Jones, I., Craddock, N. & Smith, D. J. (2009) Age-at-onset in bipolar-I disorder: mixture analysis of 1369 cases identifies three distinct clinical sub-groups. *J Affect Disord,* 116**,** 23-9.

Hyun, M., Friedman, S. D. & Dunner, D. L. (2000) Relationship of childhood physical and sexual abuse to adult bipolar disorder. *Bipolar Disord,* 2**,** 131-5.

Jacobs, D. & Silverstone, T. (1986) Dextroamphetamine-induced arousal in human subjects as a model for mania. *Psychol Med,* 16**,** 323-9.

Kelsoe, J. R., Spence, M. A., Loetscher, E., Foguet, M., Sadovnick, A. D., Remick, R. A., Flodman, P., Khristich, J., Mroczkowski-Parker, Z., Brown, J. L., Masser, D., Ungerleider, S., Rapaport, M. H., Wishart, W. L. & Luebbert, H. (2001) A genome survey indicates a possible susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98**,** 585-90.

Kieseppa, T., Partonen, T., Haukka, J., Kaprio, J. & Lonnqvist, J. (2004) High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. *Am J Psychiatry,* 161**,** 1814-21.

Kim, H. G., Kishikawa, S., Higgins, A. W., Seong, I. S., Donovan, D. J., Shen, Y., Lally, E., Weiss, L. A., Najm, J., Kutsche, K., Descartes, M., Holt, L., Braddock, S., Troxell, R., Kaplan, L., Volkmar, F., Klin, A., Tsatsanis, K., Harris, D. J., Noens, I., Pauls, D. L., Daly, M. J., MacDonald, M. E., Morton, C. C., Quade, B. J. & Gusella, J. F. (2008) Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet,* 82**,** 199-207.

Kirov, G., Gumus, D., Chen, W., Norton, N., Georgieva, L., Sari, M., O'Donovan, M. C., Erdogan, F., Owen, M. J., Ropers, H. H. & Ullmann, R. (2008) Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Hum Mol Genet,* 17**,** 458-65.

Konradi, C., Eaton, M., MacDonald, M. L., Walsh, J., Benes, F. M. & Heckers, S. (2004) Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry,* 61**,** 300-8.

Kruglyak, L. & Lander, E. S. (1995) Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet,* 57**,** 439-54.

Lachman, H. M., Pedrosa, E., Petruolo, O. A., Cockerham, M., Papolos, A., Novak, T., Papolos, D. F. & Stopkova, P. (2007) Increase in GSK3beta gene copy number variation in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 144B**,** 259-65.

Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V. F., Bretillon, L., Matute, C., Rodriguez-Puertas, R., Laye, S. & Manzoni, O. J. (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci,* 14**,** 345-50.

Lander, E. & Kruglyak, L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet,* 11**,** 241-7.

Leboyer, M. & Henry, C. (2005) [Pathogenesis of bipolar disorders: genetic vulnerability and environmental factors]. *Rev Prat,* 55**,** 487-92.

Levinson, D. F., Levinson, M. D., Segurado, R. & Lewis, C. M. (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part I: Methods and power analysis. *Am J Hum Genet,* 73**,** 17-33.

Lichtenstein, P., Yip, B. H., Bjork, C., Pawitan, Y., Cannon, T. D., Sullivan, P. F. & Hultman, C. M. (2009) Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet,* 373**,** 234-9.

Lin, C. Y., Sawa, A. & Jaaro-Peled, H. (2011a) Better understanding of mechanisms of schizophrenia and bipolar disorder: From human gene expression profiles to mouse models. *Neurobiol Dis*.

Lin, M., Pedrosa, E., Shah, A., Hrabovsky, A., Maqbool, S., Zheng, D. & Lachman, H. M. (2011b) RNA-Seq of human neurons derived from iPS cells reveals candidate long non-coding RNAs involved in neurogenesis and neuropsychiatric disorders. *PLoS One,* 6**,** e23356.

Lin, P. I., McInnis, M. G., Potash, J. B., Willour, V., MacKinnon, D. F., DePaulo, J. R. & Zandi, P. P. (2006) Clinical correlates and familial aggregation of age at onset in bipolar disorder. *Am J Psychiatry,* 163**,** 240-6.

Lopez de Lara, C., Jaitovich-Groisman, I., Cruceanu, C., Mamdani, F., Lebel, V., Yerko, V., Beck, A., Young, L. T., Rouleau, G., Grof, P., Alda, M. & Turecki, G. (2010) Implication of synapse-related genes in bipolar disorder by linkage and gene expression analyses. *Int J Neuropsychopharmacol,* 13**,** 1397-410.

Manchia, M., Lampus, S., Chillotti, C., Sardu, C., Ardau, R., Severino, G. & Del Zompo, M. (2008) Age at onset in Sardinian bipolar I patients: evidence for three subgroups. *Bipolar Disord,* 10**,** 443-6.

Mathieu, F., Dizier, M. H., Etain, B., Jamain, S., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M., McKeon, P., Roche, S., Blackwood, D., Muir, W. J., Henry, C., Malafosse, A., Preisig, M., Ferrero, F., Cichon, S., Schumacher, J., Ohlraun, S., Propping, P., Abou Jamra, R., Schulze, T. G., Zelenica, D., Charon, C., Marusic, A., Dernovsek, M. C., Gurling, H., Nothen, M., Lathrop, M., Leboyer, M. & Bellivier, F. (2010) European collaborative study of early-onset bipolar disorder: Evidence for genetic heterogeneity on 2q14 according to age at onset. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 153B**,** 1425-33.

McCullumsmith, R. E., Kristiansen, L. V., Beneyto, M., Scarr, E., Dean, B. & Meador-Woodruff, J. H. (2007) Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res,* 1127**,** 108-18.

McGuffin, P. & Katz, R. (1989) The genetics of depression and manic-depressive disorder. *Br J Psychiatry,* 155**,** 294-304.

McGuffin, P., Rijsdijk, F., Andrew, M., Sham, P., Katz, R. & Cardno, A. (2003) The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry,* 60**,** 497-502.

McInnes, L. A., Escamilla, M. A., Service, S. K., Reus, V. I., Leon, P., Silva, S., Rojas, E., Spesny, M., Baharloo, S., Blankenship, K., Peterson, A., Tyler, D., Shimayoshi, N., Tobey, C., Batki, S., Vinogradov, S., Meza, L., Gallegos, A., Fournier, E., Smith, L. B., Barondes, S. H., Sandkuijl, L. A. & Freimer, N. B. (1996) A complete genome screen for genes predisposing to severe bipolar disorder in two Costa Rican pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 93**,** 13060-5.

McInnis, M. G., Dick, D. M., Willour, V. L., Avramopoulos, D., MacKinnon, D. F., Simpson, S. G., Potash, J. B., Edenberg, H. J., Bowman, E. S., McMahon, F. J., Smiley, C., Chellis, J. L., Huo, Y., Diggs, T., Meyer, E. T., Miller, M., Matteini, A. T., Rau, N. L., DePaulo, J. R., Gershon, E. S., Badner, J. A., Rice, J. P., Goate, A. M., Detera-Wadleigh, S. D., Nurnberger, J. I., Reich, T., Zandi, P. P. & Foroud, T. M. (2003) Genome-wide scan and conditional analysis in bipolar disorder: evidence for genomic interaction in the National Institute of Mental Health genetics initiative bipolar pedigrees. *Biol Psychiatry,* 54**,** 1265-73.

McQueen, M. B., Devlin, B., Faraone, S. V., Nimgaonkar, V. L., Sklar, P., Smoller, J. W., Abou Jamra, R., Albus, M., Bacanu, S. A., Baron, M., Barrett, T. B., Berrettini, W., Blacker, D., Byerley, W., Cichon, S., Coryell, W., Craddock, N., Daly, M. J., Depaulo, J. R., Edenberg, H. J., Foroud, T., Gill, M., Gilliam, T. C., Hamshere, M., Jones, I., Jones, L., Juo, S. H., Kelsoe, J. R., Lambert, D., Lange, C., Lerer, B., Liu, J., Maier, W., Mackinnon, J. D., McInnis, M. G., McMahon, F. J., Murphy, D. L., Nothen, M. M., Nurnberger, J. I., Pato, C. N., Pato, M. T., Potash, J. B., Propping, P., Pulver, A. E., Rice, J. P., Rietschel, M., Scheftner, W., Schumacher, J., Segurado, R., Van Steen, K., Xie, W., Zandi, P. P. & Laird, N. M. (2005) Combined analysis from eleven linkage studies of bipolar disorder provides strong evidence of susceptibility loci on chromosomes 6q and 8q. *Am J Hum Genet,* 77**,** 582-95.

McQuillin, A., Bass, N., Anjorin, A., Lawrence, J., Kandaswamy, R., Lydall, G., Moran, J., Sklar, P., Purcell, S. & Gurling, H. (2011) Analysis of genetic deletions and duplications in the University College London bipolar disorder case control sample. *Eur J Hum Genet,* 19**,** 588-92.

Mendlewicz, J., Linkowski, P. & Wilmotte, J. (1980) Relationship between schizoaffective illness and affective disorders or schizophrenia. Morbidity risk and genetic transmission. *J Affect Disord,* 2**,** 289-302.

Mendlewicz, J. & Rainer, J. D. (1977) Adoption study supporting genetic transmission in manic--depressive illness. *Nature,* 268**,** 327-9.

Merikangas, A. K., Corvin, A. P. & Gallagher, L. (2009) Copy-number variants in neurodevelopmental disorders: promises and challenges. *Trends Genet,* 25**,** 536-44.

Mill, J., Tang, T., Kaminsky, Z., Khare, T., Yazdanpanah, S., Bouchard, L., Jia, P., Assadzadeh, A., Flanagan, J., Schumacher, A., Wang, S. C. & Petronis, A. (2008) Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet,* 82**,** 696-711.

Millar, J. K., Pickard, B. S., Mackie, S., James, R., Christie, S., Buchanan, S. R., Malloy, M. P., Chubb, J. E., Huston, E., Baillie, G. S., Thomson, P. A., Hill, E. V., Brandon, N. J., Rain, J. C., Camargo, L. M., Whiting, P. J., Houslay, M. D., Blackwood, D. H., Muir, W. J. & Porteous, D. J. (2005) DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science,* 310**,** 1187-91.

Mortensen, P. B., Pedersen, C. B., Melbye, M., Mors, O. & Ewald, H. (2003) Individual and familial risk factors for bipolar affective disorders in Denmark. *Arch Gen Psychiatry,* 60**,** 1209-15.

Muglia, P., Tozzi, F., Galwey, N. W., Francks, C., Upmanyu, R., Kong, X. Q., Antoniades, A., Domenici, E., Perry, J., Rothen, S., Vandeleur, C. L., Mooser, V., Waeber, G., Vollenweider, P., Preisig, M., Lucae, S., Muller-Myhsok, B., Holsboer, F., Middleton, L. T. & Roses, A. D. (2010) Genome-wide association study of recurrent major depressive disorder in two European case-control cohorts. *Mol Psychiatry,* 15**,** 589-601.

Need, A. C., Ge, D., Weale, M. E., Maia, J., Feng, S., Heinzen, E. L., Shianna, K. V., Yoon, W., Kasperaviciute, D., Gennarelli, M., Strittmatter, W. J., Bonvicini, C., Rossi, G., Jayathilake, K., Cola, P. A., McEvoy, J. P., Keefe, R. S., Fisher, E. M., St Jean, P. L., Giegling, I., Hartmann, A. M., Moller, H. J., Ruppert, A., Fraser, G., Crombie, C., Middleton, L. T., St Clair, D., Roses, A. D., Muglia, P., Francks, C., Rujescu, D., Meltzer, H. Y. & Goldstein, D. B. (2009) A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet,* 5**,** e1000373.

Nestler, E. J. & Hyman, S. E. (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci,* 13**,** 1161-9.

Nurnberger, J. I., Jr., Blehar, M. C., Kaufmann, C. A., York-Cooler, C., Simpson, S. G., Harkavy-Friedman, J., Severe, J. B., Malaspina, D. & Reich, T. (1994) Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Arch Gen Psychiatry,* 51**,** 849-59; discussion 863-4.

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.

Olsen, L., Hansen, T., Djurovic, S., Haastrup, E., Albrecthsen, A., Hoeffding, L. K., Secher, A., Gustafsson, O., Jakobsen, K. D., Nielsen, F. C., Ullum, H., Morken, G., Agartz, I., Melle, I., Gether, U., Andreassen, O. A. & Werge, T. (2011) Copy number variations in affective disorders and meta-analysis. *Psychiatr Genet,* 21**,** 319-322.

Osby, U., Brandt, L., Correia, N., Ekbom, A. & Sparen, P. (2001) Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry,* 58**,** 844-50.

Pagnamenta, A. T., Khan, H., Walker, S., Gerrelli, D., Wing, K., Bonaglia, M. C., Giorda, R., Berney, T., Mani, E., Molteni, M., Pinto, D., Le Couteur, A., Hallmayer, J., Sutcliffe, J. S., Szatmari, P., Paterson, A. D., Scherer, S. W., Vieland, V. J. & Monaco, A. P. (2011) Rare familial 16q21 microdeletions under a linkage peak implicate cadherin 8 (CDH8) in susceptibility to autism and learning disability. *J Med Genet,* 48**,** 48-54.

Palo, O. M., Soronen, P., Silander, K., Varilo, T., Tuononen, K., Kieseppa, T., Partonen, T., Lonnqvist, J., Paunio, T. & Peltonen, L. (2010) Identification of susceptibility loci at 7q31 and 9p13 for bipolar disorder in an isolated population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 153B**,** 723-35.

Papolos, D. F., Faedda, G. L., Veit, S., Goldberg, R., Morrow, B., Kucherlapati, R. & Shprintzen, R. J. (1996) Bipolar spectrum disorders in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome: does a hemizygous deletion of chromosome 22q11 result in bipolar affective disorder? *Am J Psychiatry,* 153**,** 1541-7.

Pauls, D. L., Bailey, J. N., Carter, A. S., Allen, C. R. & Egeland, J. A. (1995) Complex segregation analyses of old order Amish families ascertained through bipolar I individuals. *Am J Med Genet,* 60**,** 290-7.

Pauls, D. L., Morton, L. A. & Egeland, J. A. (1992) Risks of affective illness among first-degree relatives of bipolar I old-order Amish probands. *Arch Gen Psychiatry,* 49**,** 703-8.

Paunio, T., Arajarvi, R., Terwilliger, J. D., Hiekkalinna, T., Haimi, P., Partonen, T., Lonnqvist, J., Peltonen, L. & Varilo, T. (2009) Linkage analysis of schizophrenia controlling for population substructure. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 150B**,** 827-35.

Phillips, D. I. (1993) Twin studies in medical research. *Lancet,* 342**,** 52.

Pinto, D., Marshall, C., Feuk, L. & Scherer, S. W. (2007) Copy-number variation in control population cohorts. *Hum Mol Genet,* 16 Spec No. 2**,** R168-73.

Prickaerts, J., Moechars, D., Cryns, K., Lenaerts, I., van Craenendonck, H., Goris, I., Daneels, G., Bouwknecht, J. A. & Steckler, T. (2006) Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania. *J Neurosci,* 26**,** 9022-9.

Priebe, L., Degenhardt, F. A., Herms, S., Haenisch, B., Mattheisen, M., Nieratschker, V., Weingarten, M., Witt, S., Breuer, R., Paul, T., Alblas, M., Moebus, S., Lathrop, M., Leboyer, M., Schreiber, S., Grigoroiu-Serbanescu, M., Maier, W., Propping, P., Rietschel, M., Nothen, M. M., Cichon, S. & Muhleisen, T. W. (2011) Genome-wide survey implicates the influence of copy number variants (CNVs) in the development of early-onset bipolar disorder. *Mol Psychiatry*.

Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F. & Sklar, P. (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature,* 460**,** 748-52.

Radhakrishna, U., Senol, S., Herken, H., Gucuyener, K., Gehrig, C., Blouin, J. L., Akarsu, N. A. & Antonarakis, S. E. (2001) An apparently dominant bipolar affective disorder (BPAD) locus on chromosome 20p11.2-q11.2 in a large Turkish pedigree. *Eur J Hum Genet,* 9**,** 39-44.

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., Huang, J., Kalaitzopoulos, D., Komura, D., MacDonald, J. R., Marshall, C. R., Mei, R., Montgomery, L., Nishimura, K., Okamura, K., Shen, F., Somerville, M. J., Tchinda, J., Valsesia, A., Woodwark, C., Yang, F., Zhang, J., Zerjal, T., Armengol, L., Conrad, D. F., Estivill, X., Tyler-Smith, C., Carter, N. P., Aburatani, H., Lee, C., Jones, K. W., Scherer, S. W. & Hurles, M. E. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature,* 444**,** 444-54.

Rice, J., Reich, T., Andreasen, N. C., Endicott, J., Van Eerdewegh, M., Fishman, R., Hirschfeld, R. M. & Klerman, G. L. (1987) The familial transmission of bipolar illness. *Arch Gen Psychiatry,* 44**,** 441-7.

Rosa, A., Picchioni, M. M., Kalidindi, S., Loat, C. S., Knight, J., Toulopoulou, T., Vonk, R., van der Schot, A. C., Nolen, W., Kahn, R. S., McGuffin, P., Murray, R. M. & Craig, I. W. (2008) Differential methylation of the X-chromosome is a possible source of discordance for bipolar disorder female monozygotic twins. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 147B**,** 459-62.

Rouillon, F., Dartiguenave, C., Postel-Vinay, N., Basset, B. & Dab, W. (2005) [Bipolar disorders: improvement in their screening and management]. *Rev Prat,* 55**,** 469-70.

Roybal, K., Theobold, D., Graham, A., DiNieri, J. A., Russo, S. J., Krishnan, V., Chakravarty, S., Peevey, J., Oehrlein, N., Birnbaum, S., Vitaterna, M. H., Orsulak, P., Takahashi, J. S., Nestler, E. J., Carlezon, W. A., Jr. & McClung, C. A. (2007) Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104**,** 6406-11.

Rujescu, D., Ingason, A., Cichon, S., Pietilainen, O. P., Barnes, M. R., Toulopoulou, T., Picchioni, M., Vassos, E., Ettinger, U., Bramon, E., Murray, R., Ruggeri, M., Tosato, S., Bonetto, C., Steinberg, S., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Petursson, H., Gylfason, A., Olason, P. I., Hardarsson, G., Jonsdottir, G. A., Gustafsson, O., Fossdal, R., Giegling, I., Moller, H. J., Hartmann, A. M., Hoffmann, P., Crombie, C., Fraser,

G., Walker, N., Lonnqvist, J., Suvisaari, J., Tuulio-Henriksson, A., Djurovic, S., Melle, I., Andreassen, O. A., Hansen, T., Werge, T., Kiemeney, L. A., Franke, B., Veltman, J., Buizer-Voskamp, J. E., Sabatti, C., Ophoff, R. A., Rietschel, M., Nothen, M. M., Stefansson, K., Peltonen, L., St Clair, D., Stefansson, H. & Collier, D. A. (2009) Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet,* 18**,** 988-96.

Sadakata, T., Washida, M., Iwayama, Y., Shoji, S., Sato, Y., Ohkura, T., Katoh-Semba, R., Nakajima, M., Sekine, Y., Tanaka, M., Nakamura, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K. J., Mori, N., Detera-Wadleigh, S. D., Ichikawa, H., Itohara, S., Yoshikawa, T. & Furuichi, T. (2007) Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients. *J Clin Invest,* 117**,** 931-43.

Saus, E., Brunet, A., Armengol, L., Alonso, P., Crespo, J. M., Fernandez-Aranda, F., Guitart, M., Martin-Santos, R., Menchon, J. M., Navines, R., Soria, V., Torrens, M., Urretavizcaya, M., Valles, V., Gratacos, M. & Estivill, X. (2010) Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients. *J Psychiatr Res,* 44**,** 971-8.

Schulze, T. G., Detera-Wadleigh, S. D., Akula, N., Gupta, A., Kassem, L., Steele, J., Pearl, J., Strohmaier, J., Breuer, R., Schwarz, M., Propping, P., Nothen, M. M., Cichon, S., Schumacher, J., Rietschel, M. & McMahon, F. J. (2009) Two variants in Ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry,* 14**,** 487-91.

Schurhoff, F., Bellivier, F., Jouvent, R., Mouren-Simeoni, M. C., Bouvard, M., Allilaire, J. F. & Leboyer, M. (2000) Early and late onset bipolar disorders: two different forms of manic-depressive illness? *J Affect Disord,* 58**,** 215-21.

Scott, L. J., Muglia, P., Kong, X. Q., Guan, W., Flickinger, M., Upmanyu, R., Tozzi, F., Li, J. Z., Burmeister, M., Absher, D., Thompson, R. C., Francks, C., Meng, F., Antoniades, A., Southwick, A. M., Schatzberg, A. F., Bunney, W. E., Barchas, J. D., Jones, E. G., Day, R., Matthews, K., McGuffin, P., Strauss, J. S., Kennedy, J. L., Middleton, L., Roses, A. D., Watson, S. J., Vincent, J. B., Myers, R. M., Farmer, A. E., Akil, H., Burns, D. K. & Boehnke, M. (2009) Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**,** 7501-6.

Segurado, R., Detera-Wadleigh, S. D., Levinson, D. F., Lewis, C. M., Gill, M., Nurnberger, J. I., Jr., Craddock, N., DePaulo, J. R., Baron, M., Gershon, E. S., Ekholm, J., Cichon, S., Turecki, G., Claes, S., Kelsoe, J. R., Schofield, P. R., Badenhop, R. F., Morissette, J., Coon, H., Blackwood, D., McInnes, L. A., Foroud, T., Edenberg, H. J., Reich, T., Rice, J. P., Goate, A., McInnis, M. G., McMahon, F. J., Badner, J. A., Goldin, L. R., Bennett, P., Willour, V. L., Zandi, P. P., Liu, J., Gilliam, C., Juo, S. H., Berrettini, W. H., Yoshikawa, T., Peltonen, L., Lonnqvist, J., Nothen, M. M., Schumacher, J., Windemuth, C., Rietschel, M., Propping, P., Maier, W., Alda, M., Grof, P., Rouleau, G. A., Del-Favero, J., Van Broeckhoven, C., Mendlewicz, J., Adolfsson, R., Spence, M. A., Luebbert, H., Adams, L. J., Donald, J. A., Mitchell, P. B., Barden, N., Shink,

E., Byerley, W., Muir, W., Visscher, P. M., Macgregor, S., Gurling, H., Kalsi, G., McQuillin, A., Escamilla, M. A., Reus, V. I., Leon, P., Freimer, N. B., Ewald, H., Kruse, T. A., Mors, O., Radhakrishna, U., Blouin, J. L., Antonarakis, S. E. & Akarsu, N. (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder. *Am J Hum Genet,* 73**,** 49-62.

Serretti, A. & Mandelli, L. (2008) The genetics of bipolar disorder: genome 'hot regions,' genes, new potential candidates and future directions. *Mol Psychiatry,* 13**,** 742-71.

Severino, G., Manchia, M., Contu, P., Squassina, A., Lampus, S., Ardau, R., Chillotti, C. & Del Zompo, M. (2009) Association study in a Sardinian sample between bipolar disorder and the nuclear receptor REV-ERBalpha gene, a critical component of the circadian clock system. *Bipolar Disord,* 11**,** 215-20.

Shaldubina, A., Agam, G. & Belmaker, R. H. (2001) The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,* 25**,** 855-66.

Simon-Sanchez, J., Scholz, S., Fung, H. C., Matarin, M., Hernandez, D., Gibbs, J. R., Britton, A., de Vrieze, F. W., Peckham, E., Gwinn-Hardy, K., Crawley, A., Keen, J. C., Nash, J., Borgaonkar, D., Hardy, J. & Singleton, A. (2007) Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum Mol Genet,* 16**,** 1-14.

Smith, D. J., Griffiths, E., Kelly, M., Hood, K., Craddock, N. & Simpson, S. A. (2011) Unrecognised bipolar disorder in primary care patients with depression. *Br J Psychiatry,* 199**,** 49-56.

Smith, E. N., Bloss, C. S., Badner, J. A., Barrett, T., Belmonte, P. L., Berrettini, W., Byerley, W., Coryell, W., Craig, D., Edenberg, H. J., Eskin, E., Foroud, T., Gershon, E., Greenwood, T. A., Hipolito, M., Koller, D. L., Lawson, W. B., Liu, C., Lohoff, F., McInnis, M. G., McMahon, F. J., Mirel, D. B., Murray, S. S., Nievergelt, C., Nurnberger, J., Nwulia, E. A., Paschall, J., Potash, J. B., Rice, J., Schulze, T. G., Scheftner, W., Panganiban, C., Zaitlen, N., Zandi, P. P., Zollner, S., Schork, N. J. & Kelsoe, J. R. (2009) Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. *Mol Psychiatry,* 14**,** 755-63.

Spence, M. A., Flodman, P. L., Sadovnick, A. D., Bailey-Wilson, J. E., Ameli, H. & Remick, R. A. (1995) Bipolar disorder: evidence for a major locus. *Am J Med Genet,* 60**,** 370-6.

Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietilainen, O. P., Ingason, A., Steinberg, S., Fossdal, R., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Buizer-Voskamp, J. E., Hansen, T., Jakobsen, K. D., Muglia, P., Francks, C., Matthews, P. M., Gylfason, A., Halldorsson, B. V., Gudbjartsson, D., Thorgeirsson, T. E., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Bjornsson, A., Mattiasdottir, S., Blondal, T., Haraldsson, M., Magnusdottir, B. B., Giegling, I., Moller, H. J., Hartmann, A., Shianna, K. V., Ge, D., Need, A. C., Crombie, C., Fraser, G., Walker, N., Lonnqvist, J., Suvisaari, J., Tuulio-Henriksson, A., Paunio, T., Toulopoulou, T., Bramon, E., Di Forti, M., Murray, R., Ruggeri, M., Vassos, E., Tosato, S., Walshe, M., Li, T., Vasilescu, C., Muhleisen, T. W., Wang, A. G., Ullum,

H., Djurovic, S., Melle, I., Olesen, J., Kiemeney, L. A., Franke, B., Sabatti, C., Freimer, N. B., Gulcher, J. R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Andreassen, O. A., Ophoff, R. A., Georgi, A., Rietschel, M., Werge, T., Petursson, H., Goldstein, D. B., Nothen, M. M., Peltonen, L., Collier, D. A., St Clair, D. & Stefansson, K. (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature,* 455**,** 232-6.

Strober, M. (1992) Relevance of early age-of-onset in genetic studies of bipolar affective disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry,* 31**,** 606-10.

Strober, M., Morrell, W., Burroughs, J., Lampert, C., Danforth, H. & Freeman, R. (1988) A family study of bipolar I disorder in adolescence. Early onset of symptoms linked to increased familial loading and lithium resistance. *J Affect Disord,* 15**,** 255-68.

Sun, T., Xiao, H. S., Zhou, P. B., Lu, Y. J., Bao, L. & Zhang, X. (2006) Differential expression of synaptoporin and synaptophysin in primary sensory neurons and up-regulation of synaptoporin after peripheral nerve injury. *Neuroscience,* 141**,** 1233-45.

Suppes, T., Leverich, G. S., Keck, P. E., Nolen, W. A., Denicoff, K. D., Altshuler, L. L., McElroy, S. L., Rush, A. J., Kupka, R., Frye, M. A., Bickel, M. & Post, R. M. (2001) The Stanley Foundation Bipolar Treatment Outcome Network. II. Demographics and illness characteristics of the first 261 patients. *J Affect Disord,* 67**,** 45-59.

Vrijenhoek, T., Buizer-Voskamp, J. E., van der Stelt, I., Strengman, E., Sabatti, C., Geurts van Kessel, A., Brunner, H. G., Ophoff, R. A. & Veltman, J. A. (2008) Recurrent CNVs disrupt three candidate genes in schizophrenia patients. *Am J Hum Genet,* 83**,** 504-10.

Walsh, T., McClellan, J. M., McCarthy, S. E., Addington, A. M., Pierce, S. B., Cooper, G. M., Nord, A. S., Kusenda, M., Malhotra, D., Bhandari, A., Stray, S. M., Rippey, C. F., Roccanova, P., Makarov, V., Lakshmi, B., Findling, R. L., Sikich, L., Stromberg, T., Merriman, B., Gogtay, N., Butler, P., Eckstrand, K., Noory, L., Gochman, P., Long, R., Chen, Z., Davis, S., Baker, C., Eichler, E. E., Meltzer, P. S., Nelson, S. F., Singleton, A. B., Lee, M. K., Rapoport, J. L., King, M. C. & Sebat, J. (2008) Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science,* 320**,** 539-43.

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.

Wender, P. H., Kety, S. S., Rosenthal, D., Schulsinger, F., Ortmann, J. & Lunde, I. (1986) Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. *Arch Gen Psychiatry,* 43**,** 923-9.

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.

Winokur, G., Tsuang, M. T. & Crowe, R. R. (1982) The Iowa 500: affective disorder in relatives of manic and depressed patients. *Am J Psychiatry,* 139**,** 209-12.

Wise, L. H., Lanchbury, J. S. & Lewis, C. M. (1999) Meta-analysis of genome searches. *Ann Hum Genet,* 63**,** 263-72.

Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, W., Schroer, R., Skinner, C., Zeng, W., Schwartz, C. E. & Sommer, S. S. (2008) Neurexin 1alpha structural variants associated with autism. *Neurosci Lett,* 438**,** 368-70.

Yang, S., Wang, K., Gregory, B., Berrettini, W., Wang, L. S., Hakonarson, H. & Bucan, M. (2009) Genomic landscape of a three-generation pedigree segregating affective disorder. *PLoS One,* 4**,** e4474.

Ylisaukko-oja, T., Nieminen-von Wendt, T., Kempas, E., Sarenius, S., Varilo, T., von Wendt, L., Peltonen, L. & Jarvela, I. (2004) Genome-wide scan for loci of Asperger syndrome. *Mol Psychiatry,* 9**,** 161-8.

Zhang, D., Cheng, L., Qian, Y., Alliey-Rodriguez, N., Kelsoe, J. R., Greenwood, T., Nievergelt, C., Barrett, T. B., McKinney, R., Schork, N., Smith, E. N., Bloss, C., Nurnberger, J., Edenberg, H. J., Foroud, T., Sheftner, W., Lawson, W. B., Nwulia, E. A., Hipolito, M., Coryell, W., Rice, J., Byerley, W., McMahon, F., Schulze, T. G., Berrettini, W., Potash, J. B., Belmonte, P. L., Zandi, P. P., McInnis, M. G., Zollner, S., Craig, D., Szelinger, S., Koller, D., Christian, S. L., Liu, C. & Gershon, E. S. (2009) Singleton deletions throughout the genome increase risk of bipolar disorder. *Mol Psychiatry,* 14**,** 376-80.

Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S. W., Margalit, H. & Kerem, B. (2003) Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol Cell Biol,* 23**,** 7143-51.

Blangero, J. & Elston, R. C. (1989) Familial analysis of bipolar affective disorder using logistic models. *Genet Epidemiol,* 6, 221-7.

Cichon, S., Muhleisen, T. W., Degenhardt, F. A., Mattheisen, M., Miro, X., Strohmaier, J., Steffens, M., Meesters, C., Herms, S., Weingarten, M., Priebe, L., Haenisch, B., Alexander, M., Vollmer, J., Breuer, R., Schmal, C., Tessmann, P., Moebus, S., Wichmann, H. E., Schreiber, S., Muller-Myhsok, B., Lucae, S., Jamain, S., Leboyer, M., Bellivier, F., Etain, B., Henry, C., Kahn, J. P., Heath, S., Hamshere, M., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Craddock, N., Schwarz, M., Vedder, H., Kammerer-Ciernioch, J., Reif, A., Sasse, J., Bauer, M., Hautzinger, M., Wright, A., Mitchell, P. B., Schofield, P. R., Montgomery, G. W., Medland,

S. E., Gordon, S. D., Martin, N. G., Gustafsson, O., Andreassen, O., Djurovic, S., Sigurdsson, E., Steinberg, S., Stefansson, H., Stefansson, K., Kapur-Pojskic, L., Oruc, L., Rivas, F., Mayoral, F., Chuchalin, A., Babadjanova, G., Tiganov, A. S., Pantelejeva, G., Abramova, L. I., Grigoroiu-Serbanescu, M., Diaconu, C. C., Czerski, P. M., Hauser, J., Zimmer, A., Lathrop, M., Schulze, T. G., Wienker, T. F., Schumacher, J., Maier, W., Propping, P., Rietschel, M. & Nothen, M. M. (2011) Genome-wide association study identifies genetic variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder. *Am J Hum Genet,* 88, 372-81.

Ellicott, A., Hammen, C., Gitlin, M., Brown, G. & Jamison, K. (1990) Life events and the course of bipolar disorder. *Am J Psychiatry,* 147, 1194-8.

Etain, B., Henry, C., Bellivier, F., Mathieu, F. & Leboyer, M. (2008) Beyond genetics: childhood affective trauma in bipolar disorder. *Bipolar Disord,* 10, 867-76.

Ewald, H., Flint, T., Kruse, T. A. & Mors, O. (2002) A genome-wide scan shows significant linkage between bipolar disorder and chromosome 12q24.3 and suggestive linkage to chromosomes 1p22-21, 4p16, 6q14-22, 10q26 and 16p13.3. *Mol Psychiatry,* 7, 734-44.

Ferreira, M. A., O'Donovan, M. C., Meng, Y. A., Jones, I. R., Ruderfer, D. M., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R. H., Green, E. K., Smoller, J. W., Grozeva, D., Stone, J., Nikolov, I., Chambert, K., Hamshere, M. L., Nimgaonkar, V. L., Moskvina, V., Thase, M. E., Caesar, S., Sachs, G. S., Franklin, J., Gordon-Smith, K., Ardlie, K. G., Gabriel, S. B., Fraser, C., Blumenstiel, B., Defelice, M., Breen, G., Gill, M., Morris, D. W., Elkin, A., Muir, W. J., McGhee, K. A., Williamson, R., MacIntyre, D. J., MacLean, A. W., St, C. D., Robinson, M., Van Beck, M., Pereira, A. C., Kandaswamy, R., McQuillin, A., Collier, D. A., Bass, N. J., Young, A. H., Lawrence, J., Ferrier, I. N., Anjorin, A., Farmer, A., Curtis, D., Scolnick, E. M., McGuffin, P., Daly, M. J., Corvin, A. P., Holmans, P. A., Blackwood, D. H., Gurling, H. M., Owen, M. J., Purcell, S. M., Sklar, P. & Craddock, N. (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet,* 40, 1056-8.

Frank, E., Kupfer, D. J., Thase, M. E., Mallinger, A. G., Swartz, H. A., Fagiolini, A. M., Grochocinski, V., Houck, P., Scott, J., Thompson, W. & Monk, T. (2005) Two-year outcomes for interpersonal and social rhythm therapy in individuals with bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry,* 62, 996-1004.

Grigoroiu-Serbanescu, M., Martinez, M., Nothen, M. M., Grinberg, M., Sima, D., Propping, P., Marinescu, E. & Hrestic, M. (2001) Different familial transmission patterns in bipolar I disorder with onset before and after age 25. *Am J Med Genet,* 105, 765-73.

Kieseppa, T., Partonen, T., Haukka, J., Kaprio, J. & Lonnqvist, J. (2004) High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. *Am J Psychiatry,* 161, 1814-21.

Kruglyak, L. & Lander, E. S. (1995) Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet,* 57, 439-54.

Lander, E. & Kruglyak, L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet,* 11, 241-7.

Leboyer, M. & Henry, C. (2005) [Pathogenesis of bipolar disorders: genetic vulnerability and environmental factors]. *Rev Prat,* 55, 487-92.

Levinson, D. F., Levinson, M. D., Segurado, R. & Lewis, C. M. (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part I: Methods and power analysis. *Am J Hum Genet,* 73, 17-33.

Lichtenstein, P., Yip, B. H., Bjork, C., Pawitan, Y., Cannon, T. D., Sullivan, P. F. & Hultman, C. M. (2009) Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet,* 373, 234-9.

Mathieu, F., Dizier, M. H., Etain, B., Jamain, S., Rietschel, M., Maier, W., Albus, M., McKeon, P., Roche, S., Blackwood, D., Muir, W. J., Henry, C., Malafosse, A., Preisig, M., Ferrero, F., Cichon, S., Schumacher, J., Ohlraun, S., Propping, P., Abou Jamra, R., Schulze, T. G., Zelenica, D., Charon, C., Marusic, A., Dernovsek, M. C., Gurling, H., Nothen, M., Lathrop, M., Leboyer, M. & Bellivier, F. (2010) European collaborative study of early-onset bipolar disorder: Evidence for genetic heterogeneity on 2q14 according to age at onset. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet,* 153B, 1425-33.

McGuffin, P. & Katz, R. (1989) The genetics of depression and manic-depressive disorder. *Br J Psychiatry,* 155, 294-304.

McGuffin, P., Rijsdijk, F., Andrew, M., Sham, P., Katz, R. & Cardno, A. (2003) The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry,* 60, 497-502.

McQueen, M. B., Devlin, B., Faraone, S. V., Nimgaonkar, V. L., Sklar, P., Smoller, J. W., Abou Jamra, R., Albus, M., Bacanu, S. A., Baron, M., Barrett, T. B., Berrettini, W., Blacker, D., Byerley, W., Cichon, S., Coryell, W., Craddock, N., Daly, M. J., Depaulo, J. R., Edenberg, H. J., Foroud, T., Gill, M., Gilliam, T. C., Hamshere, M., Jones, I., Jones, L., Juo, S. H., Kelsoe, J. R., Lambert, D., Lange, C., Lerer, B., Liu, J., Maier, W., Mackinnon, J. D., McInnis, M. G., McMahon, F. J., Murphy, D. L., Nothen, M. M., Nurnberger, J. I., Pato, C. N., Pato, M. T., Potash, J. B., Propping, P., Pulver, A. E., Rice, J. P., Rietschel, M., Scheftner, W., Schumacher, J., Segurado, R., Van Steen, K., Xie, W., Zandi, P. P. & Laird, N. M. (2005) Combined analysis from eleven linkage studies of bipolar disorder provides strong evidence of susceptibility loci on chromosomes 6q and 8q. *Am J Hum Genet,* 77, 582-95.

Mendlewicz, J., Linkowski, P. & Wilmotte, J. (1980) Relationship between schizoaffective illness and affective disorders or schizophrenia. Morbidity risk and genetic transmission. *J Affect Disord,* 2, 289-302.

Mendlewicz, J. & Rainer, J. D. (1977) Adoption study supporting genetic transmission in manic--depressive illness. *Nature,* 268, 327-9.

Mortensen, P. B., Pedersen, C. B., Melbye, M., Mors, O. & Ewald, H. (2003) Individual and familial risk factors for bipolar affective disorders in Denmark. *Arch Gen Psychiatry,* 60, 1209-15.

Osby, U., Brandt, L., Correia, N., Ekbom, A. & Sparen, P. (2001) Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry,* 58, 844-50.

Pauls, D. L., Bailey, J. N., Carter, A. S., Allen, C. R. & Egeland, J. A. (1995) Complex segregation analyses of old order Amish families ascertained through bipolar I individuals. *Am J Med Genet,* 60, 290-7.

Phillips, D. I. (1993) Twin studies in medical research. *Lancet,* 342, 52.

Rice, J., Reich, T., Andreasen, N. C., Endicott, J., Van Eerdewegh, M., Fishman, R., Hirschfeld, R. M. & Klerman, G. L. (1987) The familial transmission of bipolar illness. *Arch Gen Psychiatry,* 44, 441-7.

Rouillon, F., Dartiguenave, C., Postel-Vinay, N., Basset, B. & Dab, W. (2005) [Bipolar disorders: improvement in their screening and management]. *Rev Prat,* 55, 469-70.

Schulze, T. G., Detera-Wadleigh, S. D., Akula, N., Gupta, A., Kassem, L., Steele, J., Pearl, J., Strohmaier, J., Breuer, R., Schwarz, M., Propping, P., Nothen, M. M., Cichon, S., Schumacher, J., Rietschel, M. & McMahon, F. J. (2009) Two variants in Ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry,* 14, 487-91.

Scott, L. J., Muglia, P., Kong, X. Q., Guan, W., Flickinger, M., Upmanyu, R., Tozzi, F., Li, J. Z., Burmeister, M., Absher, D., Thompson, R. C., Francks, C., Meng, F., Antoniades, A., Southwick, A. M., Schatzberg, A. F., Bunney, W. E., Barchas, J. D., Jones, E. G., Day, R., Matthews, K., McGuffin, P., Strauss, J. S., Kennedy, J. L., Middleton, L., Roses, A. D., Watson, S. J., Vincent, J. B., Myers, R. M., Farmer, A. E., Akil, H., Burns, D. K. & Boehnke, M. (2009) Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106, 7501-6.

Segurado, R., Detera-Wadleigh, S. D., Levinson, D. F., Lewis, C. M., Gill, M., Nurnberger, J. I., Jr., Craddock, N., DePaulo, J. R., Baron, M., Gershon, E. S., Ekholm, J., Cichon, S., Turecki, G., Claes, S., Kelsoe, J. R., Schofield, P. R., Badenhop, R. F., Morissette, J., Coon, H., Blackwood, D., McInnes, L. A., Foroud, T., Edenberg, H. J., Reich, T., Rice, J. P., Goate, A., McInnis, M. G., McMahon, F. J., Badner, J. A., Goldin, L. R., Bennett, P., Willour, V. L., Zandi, P. P., Liu, J., Gilliam, C., Juo, S. H., Berrettini, W. H., Yoshikawa, T., Peltonen, L., Lonnqvist, J., Nothen, M. M., Schumacher, J., Windemuth, C., Rietschel, M., Propping, P., Maier, W., Alda, M., Grof, P., Rouleau, G. A., Del-Favero, J., Van Broeckhoven, C., Mendlewicz, J., Adolfsson, R., Spence, M. A., Luebbert, H., Adams, L. J., Donald, J. A., Mitchell, P. B., Barden, N., Shink, E., Byerley, W., Muir, W., Visscher, P. M., Macgregor, S., Gurling, H., Kalsi, G., McQuillin, A., Escamilla, M. A., Reus, V. I., Leon, P., Freimer, N. B., Ewald, H., Kruse, T. A., Mors, O., Radhakrishna, U., Blouin, J. L., Antonarakis, S. E. & Akarsu, N. (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder. *Am J Hum Genet,* 73, 49-62.

Serretti, A. & Mandelli, L. (2008) The genetics of bipolar disorder: genome 'hot regions,' genes, new potential candidates and future directions. *Mol Psychiatry,* 13, 742-71.

Smith, E. N., Bloss, C. S., Badner, J. A., Barrett, T., Belmonte, P. L., Berrettini, W., Byerley, W., Coryell, W., Craig, D., Edenberg, H. J., Eskin, E., Foroud, T., Gershon, E., Greenwood, T. A., Hipolito, M., Koller, D. L., Lawson, W. B., Liu, C., Lohoff, F., McInnis, M. G., McMahon, F. J., Mirel, D. B., Murray, S. S., Nievergelt, C., Nurnberger, J., Nwulia, E. A., Paschall, J., Potash, J. B., Rice, J., Schulze, T. G., Scheftner, W., Panganiban, C., Zaitlen, N., Zandi, P. P., Zollner, S., Schork, N. J. & Kelsoe, J. R. (2009) Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. *Mol Psychiatry,* 14, 755-63.

Smith, E. N., Koller, D. L., Panganiban, C., Szelinger, S., Zhang, P., Badner, J. A., Barrett, T. B., Berrettini, W. H., Bloss, C. S., Byerley, W., Coryell, W., Edenberg, H. J., Foroud, T., Gershon, E. S., Greenwood, T. A., Guo, Y., Hipolito, M., Keating, B. J., Lawson, W. B., Liu, C., Mahon, P. B., McInnis, M. G., McMahon, F. J., McKinney, R., Murray, S. S., Nievergelt, C. M., Nurnberger, J. I., Jr., Nwulia, E. A., Potash, J. B., Rice, J., Schulze, T. G., Scheftner, W. A., Shilling, P. D., Zandi, P. P., Zollner, S., Craig, D. W., Schork, N. J. & Kelsoe, J. R. (2011) Genome-wide association of bipolar disorder suggests an enrichment of replicable associations in regions near genes. *PLoS Genet,* 7, e1002134.

Spence, M. A., Flodman, P. L., Sadovnick, A. D., Bailey-Wilson, J. E., Ameli, H. & Remick, R. A. (1995) Bipolar disorder: evidence for a major locus. *Am J Med Genet,* 60, 370-6.

Suppes, T., Leverich, G. S., Keck, P. E., Nolen, W. A., Denicoff, K. D., Altshuler, L. L., McElroy, S. L., Rush, A. J., Kupka, R., Frye, M. A., Bickel, M. & Post, R. M. (2001) The

Stanley Foundation Bipolar Treatment Outcome Network. II. Demographics and illness characteristics of the first 261 patients. *J Affect Disord,* 67, 45-59.

Wender, P. H., Kety, S. S., Rosenthal, D., Schulsinger, F., Ortmann, J. & Lunde, I. (1986) Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. *Arch Gen Psychiatry,* 43, 923-9.

Winokur, G., Tsuang, M. T. & Crowe, R. R. (1982) The Iowa 500: affective disorder in relatives of manic and depressed patients. *Am J Psychiatry,* 139, 209-12.

Wise, L. H., Lanchbury, J. S. & Lewis, C. M. (1999) Meta-analysis of genome searches. *Ann Hum Genet,* 63, 263-72.

Chapître VII : Annexe 1

Annexe1 : Projet FRM

Pour valider l'implication de *CADPS1* dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires, nous avions écrit un projet soumis à la FRM pour obtenir un financement pour une quatrième année de thèse. Nous comptions explorer dans quel(s) mécanisme(s) physiologique(s) la protéine est impliquée grâce au modèle murin invalidé pour le gène, disponible au laboratoire du Pr N. Brose. Puisque les mutations trouvées dans le gène sont à l'état hétérozygote et les souris *CAPS1-/-* meurent à la naissance, l'ensemble des études comportementales seront réalisées en comparant les souris *CAPS1+/-* avec les souris sauvages. Ces tests comportementaux seront réalisés en collaboration avec le laboratoire de B. Giros (Institut Jasques Monod, Paris). Avant d'entreprendre les études comportementales, nous nous assurerons que les performances sensori-motrices des deux groupes de souris sont identiques. Les patients atteints de TB lors d'un épisode dépressif sont léthargiques et peu actifs et à contrario, lors d'un épisode maniaque, sont hyperactifs. L'activité locomotrice des différents groupes de souris sera analysée lors des tests d'actimétrie et des tests d'activité dans leur cage. Pour tester le comportement « depressive-like » des souris, nous allons comparer par les tests de suspension par la queue et le test de la nage forcée, les temps mis par les souris avant de renoncer. L'anxiété est une comorbidité aux TB. Nous allons étudier le comportement des souris dans le labyrinthe élevé (EPM) et l'openfield, permettant de mesurer leur anxiété. L'openfield donnant aussi des renseignements sur l'activité des souris. Les troubles bipolaires se caractérisent aussi par une anhédonie (incapacité à ressentir du plaisir) en épisode dépressif et une hédonie (une recherche d'activités procurant du plaisir) en épisode maniaque. Nous allons réaliser un test de préférence du goût sucré. Lors de leurs épisodes, les patients présentent des rythmes biologiques dérégulés. Nous allons étudier les rythmes circadiens des souris au cours de cycles jours/nuit et en complète obscurité. Si nous n'observons aucun phénotype pour l'ensemble de ces tests, nous allons investir l'effet de l'environnement. Par exemple, des séparations, des abus, des négligences dans la petite enfance constituent un facteur de risque au TB. Le test de séparation prolongée mère/nouveau-né est anxiogène et entraîne des comportements « depressive-like » chez la souris. De plus le stress de la femelle gestante induit des comportements anxieux et « depressive-like » chez les nouveaux-né. Nous allons étudier les réactions des souris aux tests comportementaux précédemment cités, dans

ces deux contextes génétiques. Nous testerons ensuite l'effet du lithium et du valproate de sodium, qui sont tous deux des stabilisateurs de l'humeur, sur les comportements des souris, pour les tests de suspension par la queue et d'actimétrie.

Notre stratégie d'étude est originale puisqu'elle investit la génétique et l'environnement qui sont deux composantes indissociables de la pathologie. Ces travaux permettraient d'impliquer un nouveau gène dans le TBDP et de valider le modèle murin *CADPS1+/-*. L'étude du modèle murin permettra de mieux comprendre la physiopathologie, d'identifier des biomarqueurs, de tester de nouveaux traitements. Sept ans en moyenne sont nécessaires avant un diagnostic de la maladie, avant un traitement adapté. Puisque 20% des patients avec un traitement inadapté meurent par suicide, il est urgent de trouver des solutions, comme le diagnostic génétique et un traitement plus adapté.