



HAL
open science

Caractérisation des CNV dans les troubles du spectre autistique : identification de nouveaux gènes et analyses fonctionnelles

Marion Pilorge

► To cite this version:

Marion Pilorge. Caractérisation des CNV dans les troubles du spectre autistique : identification de nouveaux gènes et analyses fonctionnelles . Neurosciences. UPMC, 2013. Français. NNT: . tel-01215951

HAL Id: tel-01215951

<https://theses.hal.science/tel-01215951>

Submitted on 21 Jan 2016

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.

Université Pierre et Marie Curie

THESE DE DOCTORAT

Spécialité
Neurosciences

Présentée par
Marion Pilorge

Caractérisation des CNV dans les troubles du spectre
autistique : identification de nouveaux gènes
et analyses fonctionnelles

Soutenue le 28 Novembre 2013 devant le jury composé de :

Dr Dominique Champion	Rapporteur
Pr Damien Sanlaville	Rapporteur
Pr Jean-Louis Mandel	Examineur
Dr François Tronche	Examineur
Dr Catalina Betancur	Directeur de thèse

Remerciements

A Catalina Betancur, j'adresse en premier mes sincères remerciements. Merci de m'avoir tant appris au cours de ces années de recherche, merci pour toutes ces connaissances scientifiques que tu m'as transmises, pour ta rigueur et ton exigence qui m'ont poussée à en faire plus, il y a une partie de moi qui n'avait pas encore été exploitée. Merci aussi pour tous les bons moments passés ensemble, les conseils humains et médicaux. Ce fût parfois difficile mais je garderai de ma thèse, j'en suis sûre, de très bons souvenirs. J'ai beaucoup appris et grandi, je suis prête pour la suite, merci. J'espère te le rendre bien le jour de ma soutenance de thèse.

Je tiens à remercier Messieurs Dominique Campion, Damien Sanlaville, Jean-Louis Mandel et François Tronche qui me font l'honneur et le privilège de juger ce travail de thèse.

Je remercie également Bruno Giros pour l'accueil dans son laboratoire, Pascal Legendre et Jamilé Hazan pour la collaboration menée entre nos équipes pendant deux ans qui m'a permis d'apprendre des techniques nouvelles et de faire un travail de thèse varié et enrichissant ; merci aussi Jamilé pour ta disponibilité et tous tes conseils précieux. Je remercie Sophie Gautron qui m'a tout appris de la biologie moléculaire et qui a toujours été très disponible.

Un merci tout particulier à Coralie Fassier pour ton aide scientifique et pratique sur le poisson zèbre, ta persévérance et ta force qui sont un exemple pour moi, ainsi que ton soutien précieux ces derniers mois, en tant qu'amie ; et à Hervé Le Corronc pour ta gentillesse et disponibilité, avec qui ce fût un réel plaisir de travailler.

A Elsa, merci du fond du cœur pour ton amitié, ton soutien, ton écoute, tes conseils dans les bons et les moments difficiles ces dernières années, je suis désolée d'avoir été lunatique et insupportable beaucoup trop souvent ! Je te souhaite une bonne route, j'ai confiance en toi, tout ira bien et je serai là, je l'espère sincèrement.

Je remercie également Marika, pour ta bienveillance, tes conseils scientifiques et professionnels ; merci pour les bons moments des pauses déjeuner et pour toutes les expériences culinaires réalisées grâce à toi pendant cette thèse.

Je remercie Hélène, qui a trouvé sa place si facilement au sein de l'équipe et du laboratoire, je suis déçue de t'avoir rencontrée si tard, merci d'avoir partagé facilement ton expérience qui m'a beaucoup aidée ; enfin merci pour tes goûts musicaux et tes chansons de la honte.

Mes remerciements également à Marie-Pascale Martres pour avoir relu mon manuscrit et éliminé les anglicismes, merci pour tes conseils.

Au sein du laboratoire je remercierai tout d'abord les anciens, Alex, Vincent et Antoine avec qui je garde de très bons souvenirs. Et puis les copains du bureau, Thomas mon petit préféré, Kätlin qui nous manque déjà, Diana pour ton sourire et ta douceur, Lauriane pour ton énergie, Lisa parce qu'on va pouvoir se serrer les coudes jusqu'au jour J et Maryem pour les bons moments à la pause déjeuner. Merci aussi aux supers copains du A3, Amélie, Daniel et Nicolas. Je tiens à remercier également les plus grands, Amaïa pour ta gentillesse et ta douceur, Barbara pour tout nos bons moments au labo et trop rarement en dehors, Stéphanie De Gois pour ton aide scientifique et dans la vie du laboratoire ainsi que toutes tes attentions bienveillantes qui réchauffent le cœur, mais aussi Salah, Stéphanie Daumas, Gaël, Franck, Vincent et Odile.

Merci à mes amies, que je n'ai pas assez vues ces derniers temps, mais qui m'ont apporté à chaque fois une immense bouffée d'oxygène, Jeanne, Caro, Elisa, Justine et Lucie.

Je remercie de tout mon cœur celui qui a vécu avec moi et ma thèse et qui a dû me supporter durant cette longue période ; merci à toi Grégoire, d'être là, positif et fort, merci de me faire rire, de me faire avancer et de me tirer vers le haut.

Je voudrais remercier du fond du cœur Cachou, tout simplement, je ne trouve même pas de mots, VOILA. Merci de m'accompagner depuis toujours.

Je remercie chaleureusement et avec tout mon amour ma famille, mes grands parents pour leur soutien, mes petites mamies pour les appels le matin avant d'aller travailler et pour toujours croire en moi.

Je remercie sincèrement ma grande sœur pour m'avoir toujours guidée et accompagnée dans la vie, pour ton empathie débordante et ta générosité, tu me manques au quotidien mais tu es toujours près de moi (et merci aussi à Tutu !).

Merci à mes parents, merci merci, je suis désolée d'avoir été dure par moments, je vous remercie de m'avoir encouragée et de m'avoir portée jusque là, je vous le dois et j'espère que vous serez de fiers parents le jour de ma soutenance.

Je n'oublie pas les patients et leur famille, en espérant que peut-être un jour, ce travail servira à certains d'entre eux.

Enfin, je souhaiterais dédier cette thèse à mon grand père qui avait toujours un petit mot pour savoir « comment vont les souris », qui me manque tellement et qui, j'espère, aurait été fier de moi.

Liste d'abréviations

aCGH	puce d'hybridation génomique comparative (<i>array comparative genomic hybridization</i>)
ADI-R	<i>Autism Diagnostic Interview-Revised</i>
ADOS	<i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i>
AGP	<i>Autism Genome Project</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
CIM-10	Classification Internationale des Maladies
CNV	variation du nombre de copies (<i>copy number variation</i>)
DSM-IV	Manuel Diagnostique et Statistique des Maladies Mentales, quatrième édition
DSM-5	Manuel Diagnostique et Statistique des Maladies Mentales, cinquième édition
E/I	excitation/inhibition
Etude PARIS	<i>Paris Autism Research International Study</i>
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
FoSTeS	<i>Fork Stalling and Template Switching</i>
GABA	acide γ -aminobutyrique
GlyR	récepteur glycinergique
kb	kilobase
Mb	mégabase
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
NAHR	recombinaison homologue non-allélique (<i>non allelic homologous recombination</i>)
QI	quotient intellectuel
SNP	polymorphisme d'un seul nucléotide (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TDAH	trouble de déficit de l'attention/hyperactivité
TED	trouble envahissant du développement
TED-NOS	trouble envahissant du développement non spécifié
TM	transmembranaire
TSA	trouble du spectre autistique
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>

Table des matières

Introduction	1
Partie I - Troubles du spectre autistique (TSA)	3
1. Caractéristiques cliniques.....	3
1.1 Principales caractéristiques comportementales des TSA	3
1.1.1 Troubles de la communication et des relations sociales	4
1.1.2 Intérêts restreints et comportements répétés	4
1.1.3 Autres manifestations.....	5
1.2 Hétérogénéité clinique	5
1.3 Diagnostic et prise en charge	7
2. Epidémiologie.....	8
2.1 Prévalence	8
2.2 Sexe ratio	9
Partie II – Génétique de l'autisme	11
1. Origine génétique de l'autisme	11
1.1 Emergence d'une étiologie génétique.....	11
1.2 Recherche de variants fréquents.....	12
1.3 Causes non génétiques.....	14
2. Contribution des variants rares	15
2.1 Variations du nombre de copies (CNV).....	16
2.1.1 Détection des CNV	19
2.1.2 Interprétation des CNV	20
2.1.3 CNV <i>de novo</i> , CNV hérités.....	21
2.1.4 Expressivité variable et pénétrance incomplète.....	23
2.2 Variations de séquence (SNV)	27
2.2.1 Détection des SNV	27
2.2.2 SNV <i>de novo</i> , SNV hérités	27
3. Causes génétiques connues de TSA.....	31
3.1 Remaniements chromosomiques.....	32
3.2 Syndromes génétiques	32
3.3 CNV rares à expressivité variable et/ou pénétrance incomplète	35
3.4 Autres gènes rares à pénétrance élevée non syndromiques	38
Partie III – Implication de la neurotransmission inhibitrice dans l'autisme	43
1. GABA et glycine	43
1.1 Mode d'action	43
1.2. Récepteurs glycinergiques et GABAergiques.....	44
1.2.1 Récepteurs glycinergiques	44
1.2.2 Récepteurs GABAergiques	48
1.2.3 Localisations synaptique et extra-synaptique.....	49
1.2.4 Implication dans des pathologies génétiques humaines	50
2. Rôle de la neurotransmission glycinergique et GABAergique au cours du développement	52

2.1 Libération paracrine de neurotransmetteurs et activation tonique des récepteurs.....	52
2.2 Rôle physiologique développemental	52
3. Déséquilibre de la balance excitation/inhibition : un nouveau mécanisme physiopathologique impliqué dans les TSA	55
3.1 Hypothèse du déséquilibre de la balance excitation/inhibition	55
3.2 Dysfonctionnement du système inhibiteur <i>in vivo</i>	56
3.2.1 Les molécules d'adhésion cellulaire synaptiques et leurs partenaires	56
3.2.2 MECP2.....	60
3.2.3 La protéine FMRP.....	62
Résultats	65
Article 1 <i>Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders</i>	69
Article 2 <i>Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic neurotransmission in autism</i>	79
Discussion	105
1. Analyse des CNV rares.....	107
2. Identification des CNV pathogènes et recherche de gènes candidats	111
3. Analyses fonctionnelles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	114
3.1 Perte de fonction des mutations de <i>GLRA2</i>	114
3.2 Caractérisation des souris déficientes pour <i>Glr2</i>	115
4. Perspectives thérapeutiques.....	120
Références	123
Annexes	139
Liste des publications	141
Article 3 <i>A large-scale survey of the novel 15q24 microdeletion syndrome in autism spectrum disorders identifies an atypical deletion that narrows the critical region</i>	143
Article 4 <i>Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother</i>	161

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison entre le DSM-IV et le DSM-5.....	4
Tableau 2. Etudes épidémiologiques dans l'autisme et les TSA publiées depuis 2010	9
Tableau 3. Gènes impliqués dans la neurotransmission glycinergique et l'hyperekplexie	51
Tableau 4. Phénotype des souris mutantes pour des molécules d'adhésion cellulaire synaptiques impliquées dans les TSA et présentant des déséquilibres de la balance E/I.....	59

Liste des figures

Figure 1. Fréquence de l'épilepsie parmi les patients avec TSA en fonction du QI.	6
Figure 2. Relation entre le risque relatif associé à chaque variant, la fréquence de chaque variant, la taille des échantillons étudiés et la puissance statistique nécessaire à l'identification des variants.	14
Figure 3. Relation entre la fréquence d'un variant génétique et son effet attendu dans l'apparition des TSA.	15
Figure 4. Variations du nombre de copies (CNV).....	17
Figure 5. CNV récurrents et non récurrents.....	17
Figure 6. Réarrangements par recombinaison homologue non allélique (NAHR).....	18
Figure 7. Mécanismes des réarrangements génomiques.....	18
Figure 8. Évolution des techniques de cytogénétique moléculaire jusqu'aux techniques de séquençage de nouvelle génération.	19
Figure 9. Pénétrance incomplète et expressivité variable.....	24
Figure 10. Carte du bras court du chromosome 16.	25
Figure 11. Analyse des données de micropuces et ordre des priorités pour l'étude des CNV rares.	27
Figure 12. Age du père et nombre de mutation <i>de novo</i>	29
Figure 13. Nombre de gènes impliqués dans les TSA en fonction du temps.	32
Figure 14. Architecture génétique des TSA.....	33
Figure 15. Chromosome 15 isodicentrique.....	34
Figure 16. Carte du bras long du chromosome 15 montrant les anomalies identifiées dans la région 15q11-q13.....	35
Figure 17. CNV rares à expressivité variable et/ou pénétrance incomplète sur les chromosomes 15 et 16.	36
Figure 18. Gènes impliqués dans la déficience intellectuelle liée au chromosome X.....	39
Figure 19. Etiologie génétique des TSA.....	40
Figure 20. Canal ionique chimio-dépendant.....	43
Figure 21. Changement d'action du GABA au cours du développement.	44
Figure 22. Structure d'une sous-unité du récepteur de glycine et organisation du récepteur pentamérique.	45

Figure 23. Récepteur de glycine hétéromérique et liaison avec la géphyrine.....	45
Figure 24. Expression de <i>Gla1</i> , <i>Gla2</i> , <i>Gla3</i> et <i>Gla4</i> dans le cerveau de souris.....	46
Figure 25. Expression de <i>Gla1</i> , <i>Gla2</i> , <i>Gla3</i> et <i>Gla4</i> dans la moelle épinière de souris, par hybridation <i>in situ</i> , à deux mois (P56).....	47
Figure 26. Expression des différentes sous-unités α des récepteurs de glycine dans le néocortex au cours du développement et de la vie adulte chez l'homme.....	47
Figure 27. Les récepteurs GABA _A font partie de la famille des canaux ioniques chimio-dépendants.	49
Figure 28. Action du GABA sur la prolifération neuronale.....	53
Figure 29. Action du GABA sur la différenciation neuronale, dépendante des courants calciques.	54
Figure 30. La glycine module la croissance des neurites des neurones spinaux en développement.	54
Figure 31. La voie des neuroligines-neurexines.....	57
Figure 32. Fonction de <i>Mecp2</i> dans différentes régions du cerveau de souris.	61
Figure 33. Altérations de la neurotransmission inhibitrice dans le cerveau des souris déficientes pour <i>Fmr1</i>	62
Figure 34. Identification et caractérisation des CNV.	109
Figure 35. Du génotype au phénotype : effets modulateurs et boucles de rétroaction.	110
Figure 36. Arbre phylogénétique des sous-unités des récepteurs de glycine chez les mammifères.....	112
Figure 37. Implication de la dopamine dans la communication entre les différentes structures cérébrales.	117
Figure 38. Distribution normale des interneurons positifs à la somatostatine (SST) dans le cortex des souris <i>Gla2</i> ^{Y/-}	119

Partie I - Troubles du spectre autistique (TSA)

1. Caractéristiques cliniques

Les premières descriptions de l'autisme en tant que syndrome ont été faites au début des années 1940. Le psychiatre américain Leo Kanner publie un article en 1943 intitulé *Autistic disturbance of affective contact* (Kanner, 1943) dans lequel il décrit 11 enfants présentant un retrait social, des comportements répétitifs, un désir obsessionnel d'immuabilité et des troubles sévères du langage. Leo Kanner postule alors que ces manifestations cliniques ne forment qu'un seul trouble. Au même moment, le pédiatre autrichien Hans Asperger évoque une « psychopathie autistique de l'enfance » dans une description de quatre jeunes garçons présentant un manque d'empathie marqué, une réserve sociale et des intérêts restreints, avec un développement normal de l'intelligence et du langage (Asperger, 1944). Plus tard, dans une étude épidémiologique, des déficits dans les trois domaines de la réciprocité sociale, du langage et des comportements répétitifs et stéréotypés sont décrits (Wing et Gould, 1979), ce qui amène à un élargissement de la définition des troubles autistiques et à l'utilisation du terme « troubles envahissants du développement » (TED). Ce terme a été employé dans la Classification internationale des maladies (*International statistical classification of diseases and related health problems*, CIM) publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé, ainsi que dans le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, DSM) de l'Association Américaine de Psychiatrie, qui déterminent les critères diagnostiques cliniques des maladies et troubles psychiatriques (ICD-10, 1992 ; American Psychiatric Association, 1994). Depuis plusieurs années, le terme « troubles du spectre autistique » (TSA)¹ est plutôt utilisé, puisqu'il représente mieux l'autisme comme un syndrome au cœur d'un spectre de troubles se distinguant par leur sévérité et leur nature. Les « troubles du spectre autistique » remplacent donc les « troubles envahissants du développement » dans le nouveau DSM publié récemment (DSM-5, American Psychiatric Association, 2013).

1.1 Principales caractéristiques comportementales des TSA

Les caractéristiques comportementales de l'autisme et des troubles apparentés étaient définies dans le **DSM-IV** par un retard ou un fonctionnement anormal du comportement, dans trois domaines : les interactions sociales, la communication et les intérêts et comportements restreints et répétitifs, observés avant l'âge de trois ans (**Tableau 1**). Désormais, les troubles du langage et de la communication sont regroupés en une seule catégorie dans la nouvelle édition (**DSM-5**), réduisant les trois domaines traditionnellement définis à seulement deux domaines, en se basant sur l'observation que les troubles de la communication et les troubles sociaux sont intimement liés (Gotham et coll., 2007 ; Kim et Lord, 2012).

De plus, le **DSM-IV** proposait quatre catégories diagnostiques différentes pour l'autisme, le syndrome d'Asperger, le trouble désintégratif de l'enfance et le trouble envahissant du développement non spécifié (TED-NOS). Les manifestations cliniques de ces troubles sont similaires, bien qu'associées à un degré variable de sévérité. L'autisme, caractérisé par des déficits des interactions sociales, un langage très retardé et parfois absent, ainsi que des intérêts et comportements restreints et répétitifs, est considéré comme le trouble le plus sévère des TSA. Le syndrome d'Asperger diffère de l'autisme par une acquisition non retardée du langage, toutefois atypique, ainsi que par un développement cognitif apparemment normal. Le TED-NOS est diagnostiqué lorsque les troubles de l'individu ressemblent à l'autisme mais ne remplissent pas l'ensemble des critères diagnostiques. Les patients ayant un trouble désintégratif de l'enfance ont un développement

¹ Le terme « troubles du spectre autistique » ou TSA sera utilisé dans tout le manuscrit en référence à l'autisme, le syndrome d'Asperger et le TED-NOS. Cependant, le terme « autisme » sera parfois utilisé comme un synonyme de TSA.

apparemment normal pendant les deux premières années de la vie (au moins) puis une régression avant l'âge de dix ans, dans les domaines des interactions sociales, de la communication et des intérêts restreints, répétitifs et stéréotypés. Cette dernière catégorie est extrêmement rare et les patients portant ce diagnostic ne sont généralement pas inclus dans les cohortes de patients atteints de TSA utilisées en recherche.

La distinction entre ces sous-groupes peut varier selon les différents centres cliniques, malgré l'utilisation d'outils diagnostiques standardisés (Lord et coll., 2012). Ainsi, il a été proposé qu'ils soient regroupés en une seule catégorie dans le **DSM-5**, sous l'appellation de TSA (**Tableau 1**) (American Psychiatric Association, 2013).

Tableau 1. Comparaison entre le DSM-IV et le DSM-5

	DSM-IV	DSM-5
Nom du trouble	Troubles envahissants du développement, TED	Troubles du spectre autistique, TSA
Domaines atteints	Trois domaines : <ul style="list-style-type: none"> • Rapports sociaux • Communication • Intérêts restreints et comportements répétés 	Deux domaines : <ul style="list-style-type: none"> • Communication et relations sociales • Intérêts restreints et comportements répétés
Diagnostics	<ul style="list-style-type: none"> • Autisme • Syndrome d'Asperger • Trouble désintégratif de l'enfance • TED-NOS 	Une seule catégorie, les TSA, qui englobe l'autisme, le syndrome d'Asperger, le trouble désintégratif de l'enfance et le TED-NOS

1.1.1 Troubles de la communication et des relations sociales

Chez environ un tiers des cas, la parole ne se développe pas du tout ou seulement de quelques mots (Snow et coll., 2009). Chez les patients qui acquièrent toutefois des capacités de langage (le plus souvent avec un retard important), des problèmes de la qualité du parlé sont notés, par exemple des altérations du rythme ou de l'intonation, ainsi qu'une tendance spontanée à répéter tout ou une partie des phrases, habituellement celles de l'interlocuteur, en guise de réponse verbale (écholalie). Plusieurs aspects des troubles de la communication associés aux TSA vont au delà de problèmes de langage. En effet, le retard et les problèmes de langage observés chez les patients ne sont pas compensés par d'autres modes de communication comme le contact visuel, la gestuelle ou les expressions faciales.

Les enfants atteints de TSA ont des défauts dans la mise en place de la communication sociale. Au cours des deux premières années de la vie, ils ont souvent des difficultés à suivre le regard d'une personne et à sourire ou vocaliser en réponse à quelqu'un. Plus tard, on note des difficultés dans les capacités à initier et maintenir une conversation. D'autres déficits de rapports sociaux et de la communication peuvent être observés dans les jeux d'imagination et les jeux en groupe.

1.1.2 Intérêts restreints et comportements répétés

Selon les critères diagnostiques des TSA du DSM-5, les intérêts restreints et stéréotypés englobent une très large catégorie de comportements qui peuvent varier en fréquence et en sévérité. On note par exemple des préoccupations et intérêts limités à un objet ou une partie d'un objet (par exemple la machine à laver ou la roue d'un vélo qui tourne) ; un besoin d'instaurer des routines et des rituels (par exemple prendre une route particulière pour aller à l'école) ; et des obsessions pour un sujet particulier (comme les dinosaures ou les jeux vidéos). Ces comportements peuvent être associés à des mouvements répétés, par exemple des stéréotypies des mains ou des doigts.

Certains de ces comportements peuvent parfois être observés chez des enfants ayant un développement normal ou présentant d'autres troubles neurodéveloppementaux, comme une déficience intellectuelle sans TSA (Charman et Baird, 2002 ; Kim et Lord, 2010). Cependant, ils ont été observés de manière significativement

plus fréquente et/ou plus sévère chez les enfants et adolescents atteints de TSA (South et coll., 2005 ; Richler et coll., 2007).

1.1.3 Autres manifestations

Les patients atteints de TSA souffrent d'anomalies de la perception, en particulier auditive. Ces anomalies se manifestent par une indifférence apparente au monde sonore, par exemple les patients ne répondent pas à leur nom. Pourtant, des réactions paradoxales telles que des peurs exagérées à certains bruits peuvent déclencher chez eux une forte anxiété. D'autres manifestations comme une insensibilité à la douleur ou des troubles du sommeil, parfois durables et intenses, peuvent exister. Enfin, des problèmes de la motricité fine et globale sont parfois observés, avec des gestes maladroits, une démarche rigide et des difficultés de coordination.

1.2 Hétérogénéité clinique

Les manifestations comportementales caractéristiques des TSA varient très largement d'un individu à l'autre. Cette extrême hétérogénéité clinique se manifeste par exemple par un âge variable d'apparition des troubles et par différents degrés de sévérité des atteintes comportementales et motrices. En particulier, il y a une énorme variabilité dans le niveau de langage des patients ; certains d'entre eux parlent avec facilité et d'autres ne développent aucun langage fonctionnel, comme c'est le cas chez environ un tiers des enfants atteints (Lord et coll., 2004 ; Snow et coll., 2009).

Par ailleurs, on distingue des formes d'autisme syndromiques et non syndromiques. L'autisme est dit syndromique s'il survient chez un patient présentant des dysmorphies faciales ou d'autres malformations congénitales ou encore des problèmes neuromusculaires ou métaboliques. Comme dans le cas de la déficience intellectuelle (Géczy et coll., 2009), le terme autisme syndromique fait donc référence à la présentation clinique et non pas au fait qu'une maladie ou un syndrome génétique ait été identifié chez le patient.

Les TSA sont souvent associés à une déficience intellectuelle, une épilepsie, ou bien à des troubles neuropsychiatriques comme l'anxiété ou le trouble de déficit de l'attention/hyperactivité, ce qui augmente encore l'hétérogénéité clinique observée.

Comme l'autisme, la **déficience intellectuelle** est une pathologie neurodéveloppementale extrêmement hétérogène qui touche 2 % à 3 % de la population générale (Leonard et Wen, 2002). Elle se définit par un quotient intellectuel (QI) inférieur à 70 ; on distingue la déficience intellectuelle légère, modérée, sévère et profonde en fonction de la valeur du QI. Le niveau de fonctionnement intellectuel global des patients avec TSA est extrêmement variable d'un individu à l'autre, allant d'une atteinte parfois très sévère à des capacités cognitives particulièrement élevées chez certains patients. Parmi les études épidémiologiques réalisées dans les TSA, seule une vingtaine d'entre elles spécifient le niveau de QI des patients ; la prévalence de la déficience intellectuelle dans les TSA varie selon les cohortes et est estimée en moyenne à 50-70 % (pour revues, voir Williams et coll., 2006 ; Fombonne, 2009 ; Fombonne et coll., 2011), jusqu'à 100 % dans une seule étude (Barnevik-Olsson et coll., 2010) (Section 2). En comparaison, la prévalence de la déficience intellectuelle parmi les individus ayant un autisme au sens strict est plus élevée, puisqu'elle va de 40 % à 90 % (pour revues, voir Fombonne, 2003, 2009 ; Fombonne et coll., 2011) (Section 2). Ces résultats reflètent le degré élevé d'association entre la déficience intellectuelle et les formes plus sévères de TSA, comme c'est le cas chez les patients atteints d'autisme syndromique qui ont un risque particulièrement élevé de déficience intellectuelle.

De nombreuses études ont montré une association entre l'autisme et l'**épilepsie** (Tuchman et Rapin, 2002 ; Canitano, 2007 ; Berg et Plioplys, 2012). Les taux de prévalence de l'épilepsie dans les TSA sont variables de 5 % à 40 % (Canitano, 2007), probablement à cause de l'hétérogénéité des échantillons utilisés concernant l'âge des patients, leur sexe, leur niveau de déficience intellectuelle, la proportion d'individus ayant un TSA

syndromique, ainsi que les différents outils utilisés pour diagnostiquer l'épilepsie. Globalement, on estime qu'environ un tiers des patients avec TSA ont une épilepsie, contre ~1,5 % dans la population générale (Mouridsen et coll., 1999, 2011) et inversement, ~30 % des patients épileptiques ont un TSA (Tuchman et Rapin, 2002 ; Canitano, 2007). Comme pour la déficience intellectuelle, le risque d'épilepsie varie en fonction du type de TSA, les plus basses prévalences étant observées parmi les individus ayant un syndrome d'Asperger (4 %) et les plus hautes parmi les patients ayant un trouble désintégratif de l'enfance (77 %) (Mouridsen et coll., 1999) ; de plus, la prévalence de l'épilepsie augmente significativement chez les patients avec TSA et déficience intellectuelle (Tuchman et Rapin, 2002)

Dans la population générale, l'un des risques les plus forts associés à l'épilepsie est la déficience intellectuelle. En effet, la prévalence de l'épilepsie varie entre 16 % et 45 % parmi les patients avec déficience intellectuelle (van Blarikom et coll., 2006, 2009). On peut donc penser que l'association entre l'épilepsie et l'autisme serait liée à la déficience intellectuelle. Dans une méta-analyse de 23 études publiées entre 1963 et 2006, Amiet et coll. (2008) ont observé une prévalence de l'épilepsie parmi les patients avec TSA et déficience intellectuelle de 24 % contre 8 % parmi les individus avec TSA sans déficience intellectuelle ; en outre, plus la déficience intellectuelle est sévère, plus la prévalence de l'épilepsie est forte (Figure 1). L'association entre les trois troubles peut être expliquée selon deux hypothèses : (i) La déficience intellectuelle serait la connexion, au moins en partie, entre l'épilepsie et l'autisme ; (ii) plus probablement, l'autisme, l'épilepsie et la déficience intellectuelle seraient des manifestations différentes d'un processus commun aboutissant à un développement anormal du cerveau et causé à la base par une anomalie génétique.

Dans tous les cas, ces résultats montrent que les TSA, l'épilepsie et la déficience intellectuelle sont intimement liés, indiquant des mécanismes neuroanatomiques et/ou génétiques communs.

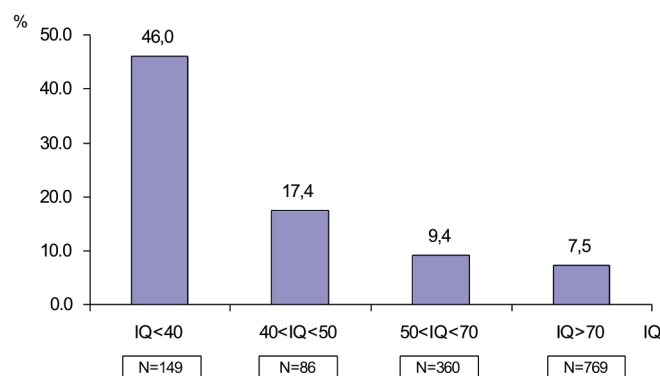


Figure 1. Fréquence de l'épilepsie parmi les patients avec TSA en fonction du QI.

Plus la déficience intellectuelle est sévère, plus la prévalence de l'épilepsie est forte (figure tirée de Amiet et coll., 2008).

Les TSA sont parfois associés à des troubles de déficit de l'attention/hyperactivité (TDAH) (Goldstein et Schwebach, 2004). Selon le DSM-IV, un TSA est un critère exclusif pour faire un diagnostic de TDAH. Cependant, environ un tiers des enfants avec TSA présentent des manifestations d'hyperactivité et des déficits d'attention qui pourraient remplir les critères d'un diagnostic de TDAH décrits dans le DSM-IV (Goldstein et Schwebach, 2004 ; Simonoff et coll., 2008). C'est pourquoi, dorénavant, dans le DSM-5, les patients avec TSA peuvent aussi recevoir un diagnostic de TDAH, s'ils présentent des manifestations de ce trouble psychiatrique. D'autres pathologies psychiatriques, comme les troubles obsessionnels compulsifs et les troubles bipolaires, peuvent aussi être associés aux TSA (Gillott et coll., 2001 ; Simonoff et coll., 2008 ; Kanne et coll., 2009).

1.3 Diagnostic et prise en charge

Diagnostic

Face à un syndrome cliniquement hétérogène et en l'absence de marqueurs biologiques, le diagnostic des TSA doit être basé sur des critères établis par le DSM et la CIM. L'évaluation d'un individu prend en compte son histoire développementale, ses capacités communicatives et cognitives, ainsi que ses caractéristiques comportementales. L'autisme est en général considéré comme le TSA le mieux défini et la plupart du temps, un clinicien expérimenté peut le diagnostiquer de manière fiable chez un enfant âgé de deux ans ou moins.

Bien que non nécessaires pour un diagnostic clinique, des outils diagnostiques standardisés, basés sur les critères du DSM-IV et la CIM-10, sont couramment utilisés en recherche. Parmi eux, l'ADI-R (*Autism Diagnostic Interview-Revised*) (Lord et coll., 1994) et l'ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*) (Lord et coll., 2000), sont les plus utilisés.

L'ADI-R est un entretien standardisé réalisé par un praticien expérimenté avec les parents de l'enfant ou les personnes qui s'occupent de lui. Il comporte 93 questions permettant d'évaluer les facultés de l'enfant dans les domaines de la communication, les interactions sociales et les comportements répétitifs et stéréotypés. Récemment, de nouveaux questionnaires ont été développés pour les enfants âgés de 1 à 4 ans, prenant en compte leur niveau de langage (Kim et Lord, 2012).

L'ADOS est une échelle d'observation pouvant être utilisée chez les enfants et les adultes. Elle inclut une série d'activités de 35-45 minutes qui permettent au clinicien d'évaluer les rapports sociaux, la communication et les comportements de l'enfant. L'ADOS comporte cinq modules différents, choisis en fonction de l'âge du sujet et de son niveau de langage (Lord et coll., 2000). Une version de l'ADOS pour les jeunes enfants ne parlant pas encore (1 à 2 ans et demi) est aussi disponible (Luyster et coll., 2009).

L'utilisation des informations de l'ADI-R en complémentarité de l'ADOS évalue de façon plus fiable et plus précise le diagnostic des TSA que lorsque ces instruments sont utilisés séparément (Risi et coll., 2006 ; Kim et Lord, 2012). L'ADI-R fournit l'histoire développementale, la description du fonctionnement d'un individu dans des contextes variés et une évaluation de son comportement basée sur l'observation des parents ; l'ADOS donne un résumé des observations standardisées d'un clinicien expérimenté sur le comportement d'un individu dans des contextes qui provoquent les rapports sociaux et la communication. Ces outils contribuent donc de manière indépendante et additive à la pose du diagnostic par les cliniciens.

Prise en charge

Le nombre de méthodes de prise en charge des patients atteints de TSA a beaucoup augmenté depuis la publication, en 1987, du modèle de l'analyse du comportement appliquée (*Applied Behavior Analysis, ABA*) (Lovaas, 1987). Depuis, les interventions basées sur le comportement sont utilisées en première intention pour ces patients ; elles sont nombreuses et variées et pour la plupart, relativement efficaces (pour revues, voir Reichow et Wolery, 2009 ; Seida et coll., 2009 ; Warren et coll., 2011).

Des programmes complets, conçus pour améliorer les capacités du patient à travers plusieurs domaines (les rapports sociaux, le langage, etc.) sont beaucoup utilisés, comme le programme ABA et le programme TEACCH (*Treatment and Education of Autistic and related Communication handicapped CHILDren* ; Mesibov et Shea, 2010). Il existe aussi d'autres approches qui ciblent plus spécifiquement certaines compétences, par exemple la méthode PECS (*Picture Exchange Communication System* ; Bondy et Frost, 1998), qui propose des techniques alternatives et facilitatrices de la communication. De plus, des interventions visant à réduire les problèmes de comportement directement liés aux TSA (par exemple les comportements répétés) ou des problèmes pouvant être associés comme l'anxiété ou l'irritabilité, existent aussi. Dans tous les cas, la littérature scientifique insiste sur la nécessité d'une intervention éducative intensive et très précoce (Dawson et coll., 2010 ; Dawson et coll., 2012).

2. Epidémiologie

2.1 Prévalence

L'hétérogénéité clinique et l'absence de marqueurs biologiques rendent difficile la mesure de la prévalence des TSA dans la population générale. Deux facteurs clés des études épidémiologiques sont d'une importance majeure pour déterminer de façon précise la prévalence d'une pathologie : la définition de la pathologie et les outils de recensement des patients.

Définition

La définition de l'autisme a beaucoup évolué au cours du temps, de la définition au sens strict faite par Kanner (Kanner, 1943), vers les définitions élargies de « troubles envahissants de développement » (TED) (ICD-10, 1992 ; American Psychiatric Association, 1994) et de « troubles du spectre autistique » (TSA) (American Psychiatric Association, 2013).

Outils de recensement

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour trouver les individus qui correspondent aux critères définis de la pathologie. Certaines études épidémiologiques reposent sur les informations existantes dans différentes bases de données (Fombonne et coll., 2006) ou registres nationaux (Madsen et coll., 2002) ; elles ont tendance à sous-estimer la prévalence réelle de la pathologie puisqu'elles ne prennent pas en compte les cas n'ayant pas été mis en contact avec les services qui gèrent ces bases de données. D'autres études reposent sur des stratégies incluant plusieurs étapes (Kim et coll., 2011) : la première étape consiste à rechercher des cas potentiellement atteints de TSA dans un groupe très large d'individus (par exemple par des envois de courrier aux professionnels de l'éducation et/ou de la santé), pour poser un diagnostic final au cours des étapes ultérieures, en utilisant différentes stratégies (ADI-R, ADOS, etc.). Cependant, la rigueur des données obtenues varie fortement d'une étude à l'autre puisque les résultats sont influencés par les systèmes d'éducation et de santé, spécifiques à chaque pays et à une période donnée, le taux de participation ou encore les outils de dépistage et de diagnostic utilisés.

Depuis la première étude épidémiologique publiée en 1966, réalisée sur 78 000 individus, qui a donné une estimation de la prévalence de l'autisme au sens strict de $\sim 4/10\ 000$ (0,04 %) (Lotter, 1966), au moins 48 études du même type ont été publiées (pour revues, voir Fombonne, 2009 ; Fombonne et coll., 2011). Les valeurs de prévalence obtenues sont corrélées négativement à la taille des échantillons utilisés, avec des petites études rapportant des taux plus élevés. Aujourd'hui, les dernières estimations concernant l'autisme au sens strict sont de $\sim 40/10\ 000$ ($\sim 0,4\%$), soit dix fois plus qu'en 1966 (**Tableau 2**). La plupart des études publiées depuis 2000 cherchent à estimer la prévalence de l'ensemble des TSA, dont les estimations les plus récentes sont de $\sim 1\%$ (*Centers for Disease Control* CDC, 2012) (pour revues, voir Williams et coll., 2006 ; Fombonne, 2009 ; Fombonne et coll., 2011) (**Tableau 2**).

Au début des années 1990, l'idée d'une « épidémie » d'autisme a émergé quand, dans la plupart des pays où des études avaient été réalisées, la prévalence de la pathologie a augmenté. Plusieurs explications peuvent rendre compte de cette augmentation :

- **L'élargissement des critères de diagnostics**, qui provoque l'augmentation à la fois de la prévalence et de l'incidence.
- Une **meilleure accessibilité aux services de santé et d'éducation**, une **meilleure information** de la population, une **diminution de l'âge de diagnostic** expliquent aussi cette augmentation du nombre d'enfants atteints d'autisme vus par des spécialistes ou bien référencés dans des centres spécialisés.
- Une autre explication à l'augmentation de la prévalence de la pathologie correspond au fait que des enfants présentant un trouble neurodéveloppemental peuvent recevoir des diagnostics qui évoluent au cours du temps. Ces **substitutions de diagnostic** sont liées à une meilleure connaissance des critères diagnostiques

de la pathologie par les professionnels de santé et/ou un meilleur accès aux services. En effet, il a été montré qu'une certaine proportion d'enfants ayant eu un diagnostic de déficience intellectuelle ont ensuite été identifiés comme ayant un diagnostic de TSA (Shattuck, 2006) ; ainsi, l'augmentation de la prévalence des TSA sur la période 1994-2003 est directement associée à la diminution de la prévalence de la déficience intellectuelle au cours de la même période (Shattuck, 2006).

L'augmentation de la prévalence au cours du temps pourrait donc simplement refléter l'augmentation de l'efficacité des méthodes d'identification des cas ainsi que les changements de concept et de critères diagnostiques des TSA.

Tableau 2. Etudes épidémiologiques dans l'autisme et les TSA publiées depuis 2010

Auteurs	Pays	Taille de la population ciblée	Prévalence/10 000	% avec déficience intellectuelle
Autisme				
Lazoff et coll. (2010)	Canada	23 635	25,4	–
Kim et coll. (2011)	Corée du Sud	55 226	97	44,4
Leonard et coll. (2011)	Australie	393 329	30	–
Parner et coll. (2011)	Danemark	404 816	21,8	–
Parner et coll. (2011)	Australie	152 060	39,3	–
Troubles du spectre autistique				
Lazoff et coll. (2010)	Canada	23 635	79,1	–
Barnevik-Olsson et coll. (2010)	Suède	113 391	22	100
Al-Farsi et coll. (2011)	Oman	528 335	190	–
Brugha et coll. (2011)	Angleterre	7 333	98	0
Kim et coll. (2011)	Corée du Sud	55 226	264	68,5
Leonard et coll. (2011)	Australie	393 329	30	61,5
Parner et coll. (2011)	Danemark	404 816	51	–
Parner et coll. (2011)	Australie	152 060	68,5	–
Samadi et coll. (2012)	Iran	1 320 334	6,26	–
CDC (2012)	Etats-Unis	–	113	–

CDC, Centers for Disease Control

2.2 Sexe ratio

Les études épidémiologiques réalisées dans l'autisme et les TSA ont toujours rapporté un nombre de garçons atteints supérieur à celui de filles présentant des troubles. Le sexe ratio habituellement avancé est de quatre garçons atteints pour une fille (CDC, Fombonne, 2009 ; 2012). Ce déséquilibre garçons/filles est proportionnel aux capacités cognitives puisqu'il s'accroît dans des cohortes de niveau d'aptitude normal voire élevé, pouvant aller jusqu'à 10:1 dans certaines cohortes de patients présentant un autisme de haut niveau ou un syndrome d'Asperger (Gillberg et coll., 2006). A l'inverse, dans des cohortes sévèrement atteintes, avec des QI très bas, le sexe ratio tend à s'équilibrer (Rivet et Matson, 2011). Plusieurs hypothèses existent pour expliquer un tel déséquilibre (pour revue, voir Werling et Geschwind, 2013) :

- Les **chromosomes sexuels** ont été proposés comme acteurs clés dans la protection des filles contre les TSA. Bien que de nombreux gènes localisés sur le chromosome X aient été impliqués dans les TSA (par exemple *FMRP*, *MECP2* et *NLGN4X*) (Partie II), la transmission des troubles dans la plupart des familles ne suit pas un modèle lié au chromosome X et l'implication de ces gènes ne peut pas expliquer à elle seule un tel déséquilibre du sexe ratio. En revanche, il n'est pas exclu que les chromosomes sexuels aient un rôle modulateur. En effet, il y a un risque accru de TSA chez les patients ayant des aneuploïdies des chromosomes sexuels, comme dans le cas du syndrome de Turner (45, X), du syndrome de Klinefelter (47,

XXY), du syndrome 47,XYY et du syndrome 48,XXYY (Betancur, 2011 ; Bishop et coll., 2011 ; Ross et coll., 2012 ; Zafeiriou et coll., 2013). Cependant des études épidémiologiques plus importantes sont nécessaires pour réellement déterminer le rôle des chromosomes sexuels dans le déséquilibre du sexe ratio associé aux TSA.

- b. Simon Baron-Cohen propose la théorie d'**empathisation-systématisation** ou dite du **cerveau hypermasculin** (*extreme male brain theory*), selon laquelle l'autisme serait un cas extrême du cerveau masculin (Baron-Cohen, 2002). Sa théorie conçoit l'autisme comme s'inscrivant dans un continuum au sein de la population générale. Le cerveau masculin serait caractérisé par une plus grande compétence à comprendre et interagir avec des systèmes basés sur des règles précises ou des lois (la systématisation) ; en contrepartie, le cerveau masculin serait caractérisé par des capacités moindres à percevoir les pensées et les sentiments de l'autre et à y répondre de façon appropriée (l'empathisation). A l'inverse, le cerveau féminin serait naturellement plus empathique que systématique.

Selon l'hypothèse de Baron-Cohen, les manifestations caractéristiques des TSA correspondraient à une hypermasculinisation du cerveau. Ainsi, l'apparition des troubles serait facilitée chez les garçons par rapport aux filles, ce qui pourrait expliquer en partie le déséquilibre du sexe ratio observé. Baron-Cohen et coll. (2002) ont alors proposé qu'un excès de testostérone fœtale serait responsable du phénomène de masculinisation du cerveau. Par la suite, ils ont mesuré les niveaux de testostérone fœtale à partir d'échantillons de liquide amniotique et ont demandé aux mères (n = 452) de remplir un questionnaire à propos des activités et intérêts de leur enfant (n= 112 garçons et 100 filles normaux). Ils ont pu montrer une corrélation positive entre les niveaux de testostérone fœtale et des comportements typiquement masculins chez les enfants (Auyeung et coll., 2009b). Les auteurs ont également montré une corrélation positive entre les niveaux de testostérone fœtale et les traits autistiques observés chez des enfants âgés de 6 à 10 ans (Auyeung et coll., 2009a) ainsi qu'une corrélation négative avec les mesures d'empathisation (Chapman et coll., 2006) et de qualité des relations sociales (Knickmeyer et coll., 2005). Ainsi, il y aurait un risque spécifique chez les garçons, dû à la production de testostérone, qui les rendrait plus vulnérables aux facteurs étiologiques. Ces résultats doivent néanmoins être confirmés dans des cohortes de patients de plus grande taille pour vérifier cette hypothèse.

- c. Un deuxième modèle complémentaire suggère cette fois l'existence d'**effet(s) protecteur(s) présents spécifiquement chez les filles**, qui auraient donc un seuil de tolérance plus élevé par rapport à la pathologie. Selon cette hypothèse, si les filles sont protégées, elles auraient besoin d'une « charge étiologique » plus forte pour avoir le même niveau de TSA que les garçons. On peut donc penser que la fratrie des filles atteintes serait plus à risque que la fratrie de garçons avec TSA. C'est en effet ce qu'ont observé Robinson et coll. (2013), grâce à leur étude réalisée sur plus de 9000 paires de jumeaux dizygotes. Ils ont montré que le risque de présenter des traits autistiques est plus fort au sein de la fratrie des filles avec TSA par rapport à la fratrie des garçons atteints. Ils ont apporté la preuve la plus concluante à ce jour soutenant ce modèle.
- d. Le déséquilibre du sexe ratio peut aussi simplement être attribué, au moins en partie, à un **biais diagnostique**. L'expression des TSA varie entre les sexes, particulièrement lorsque l'on regarde séparément les différents domaines comportementaux affectés. Les garçons manifestent des problèmes plus visibles comme de l'agressivité, une hyperactivité, des comportements sociaux très réduits et des comportements répétés. A l'inverse, les filles expriment leurs troubles de manière plus subtile et ont une tendance à interioriser les manifestations cliniques (anxiété, dépression). Ainsi, l'expression des TSA chez les garçons invite plus facilement à l'évaluation et à la pose du diagnostic par rapport aux filles, particulièrement dans les cohortes de patients de haut niveau.

Partie II – Génétique de l'autisme

1. Origine génétique de l'autisme

1.1 Emergence d'une étiologie génétique

Il aura fallu attendre plus de vingt ans après les premières descriptions de l'autisme faites par Kanner pour reconnaître le rôle de la génétique dans l'étiologie des TSA. Deux grands types d'études y ont participé : les études familiales et de jumeaux, qui comparent le taux de récurrence chez les apparentés de premier degré d'enfants atteints par rapport à la population générale et le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes et dizygotes ; et la caractérisation des syndromes génétiques rares fréquemment associés à l'autisme et l'identification des remaniements chromosomiques trouvés chez certains patients atteints de TSA.

Etudes familiales et études de jumeaux

Les résultats obtenus à partir des études de familles et de jumeaux ont permis de formuler plusieurs observations apportant des évidences fortes de l'implication de facteurs génétiques dans l'autisme.

- a. Les premières études familiales ont observé une forte agrégation de l'autisme au sens strict, avec des **taux de récurrence** chez les frères et sœurs d'enfants atteints allant de 3 % (August et coll., 1981 ; Tsai et coll., 1981) à 6 % (Baird et August, 1985), c'est-à-dire environ 50 à 100 fois plus que la prévalence dans la population générale calculée à l'époque (Szatmari et coll., 1998). Plus récemment, une étude réalisée sur plus de 600 enfants ayant au moins un frère ou une sœur plus âgé(e) atteint(e) de TSA a estimé un taux de récurrence de 18,7 %, comparé à la prévalence actuelle de ~1 % dans la population générale (Ozonoff et coll., 2011). Ces variations s'expliquent par l'élargissement des critères diagnostiques des TSA et donc par l'augmentation de la prévalence dans la population générale et au sein de la fratrie des enfants atteints. En outre, les différentes tailles d'échantillons de familles étudiés et/ou les biais liés aux outils diagnostiques utilisés peuvent entraîner des variations dans les différents taux calculés. Plus récemment, il a été montré, à partir de l'analyse de plus de 5 000 familles, que le taux de récurrence des TSA chez les frères et sœurs d'enfants atteints (~10 %) est deux fois supérieur à celui calculé chez les demi-frères et demi-sœurs (~5 %) (Constantino et coll., 2013), indiquant ainsi une influence génétique forte.
- b. Dès les premières études de familles et de jumeaux, il a été observé que les apparentés de premier degré d'enfants atteints de TSA ont un risque élevé de présenter des traits autistiques, similaires à ceux présents chez les personnes atteintes mais exprimés à un degré moindre (Bolton et coll., 1994 ; Bailey et coll., 1995), ce qui a alors fait penser à un modèle génétique sous-jacent impliquant plusieurs gènes. Ces phénotypes plus subtils ont été regroupés sous le terme « **phénotype élargi de l'autisme** » (*broader autism phenotype*) et suggèrent un effet familial marqué (Constantino et Todd, 2005 ; Losh et coll., 2008).
- c. Les **taux de concordance** couramment avancés par les études de jumeaux varient entre 80-100 % pour les jumeaux monozygotes et 0-30 % pour les jumeaux dizygotes (pour revue, voir Ronald et Hoekstra, 2011). Quatre premières études de jumeaux ont été publiées entre 1977 et 1995, sur des petits groupes allant de 21 (11 monozygotes et 10 dizygotes) à 45 (25 monozygotes et 20 dizygotes) paires de jumeaux atteints d'autisme au sens strict (Folstein et Rutter, 1977 ; Ritvo et coll., 1985 ; Steffenburg et coll., 1989 ; Bailey et coll., 1995). Dans la toute première étude de Folstein et Rutter (1977), 36 % des jumeaux monozygotes (qui partagent tous leurs allèles) sont concordants, par rapport à 0 % chez les jumeaux dizygotes (qui partagent la moitié de leurs gènes), indiquant donc une base génétique forte. Bien que ces premières études de jumeaux aient été réalisées sur des échantillons de taille réduite et que les taux de concordance calculés soient variables, elles ont malgré tout révolutionné la vision de l'autisme de l'époque en montrant une base génétique. Depuis une dizaine d'années, une trentaine d'études supplémentaires ont été publiées avec des

groupes allant jusqu'à 277 paires de jumeaux avec TSA (pour revue, voir Ronald et Hoekstra, 2011). Récemment, des taux légèrement différents ont été calculés : 77 % (65 %-86 %, n=45) pour les jumeaux monozygotes, 50 % (16 %-84 %, n=9) pour les jumelles monozygotes et 31 % (16 %-46 %, n=45) pour les jumeaux dizygotes, 36 % (11 %-60 %, n=13) pour les jumelles monozygotes. Ces valeurs ont semblé prédire un rôle finalement plus faible des facteurs génétiques (Hallmayer et coll., 2011) ; cependant les intervalles de confiance de ces chiffres sont très larges et chevauchent les précédents taux de concordances obtenus.

- d. **L'héritabilité**, qui correspond à la contribution des facteurs génétiques dans la constitution du phénotype, autrement dit la part de variance phénotypique relevant de la variance génotypique, est estimée à ~80 % (Lichtenstein et coll., 2010). Elle est calculée en fonction du risque de récurrence et du ratio des taux de concordance des jumeaux monozygotes sur celui des jumeaux dizygotes. Elle est établie à l'échelle d'une population donc elle n'a pas de sens au niveau de l'individu et elle ne doit pas être confondue avec l'hérédité, qui correspond à la transmission d'une génération à la suivante. Les premières estimations de l'héritabilité de l'autisme au sens strict ont été de 91-93 % (Bailey et coll., 1995) ; aujourd'hui, en élargissant les critères aux TSA, elle est estimée à ~80 % (Lichtenstein et coll., 2010).

Etude des syndromes génétiques rares et remaniements chromosomiques dans les TSA

L'implication de facteurs génétiques dans les TSA a aussi été démontrée par l'observation d'un nombre important de pathologies génétiques rares associées à l'autisme. Elles comprennent des maladies monogéniques comme le syndrome de l'X fragile, le syndrome de Rett ou la sclérose tubéreuse de Bourneville, et des syndromes de microdélétion ou microduplication comme le syndrome de délétion 2q37 ou le syndrome de Phelan-McDermid (Section 3.2). De plus, des remaniements chromosomiques visibles au caryotype sont détectés chez certains patients, comme des duplications maternelles de la région 15q11-q13 résultant d'un chromosome isodicentrique, des trisomies 21 ou des aneuploïdies des chromosomes sexuels (Section 3.1).

En démontrant une base génétique à l'étiologie des TSA, l'ensemble de ces études a donné naissance au vaste domaine de la recherche génétique dans l'autisme, qui s'est tout d'abord orientée vers l'étude des variants communs et a ouvert la voie à deux décennies d'études de liaison et d'association.

1.2 Recherche de variants fréquents

Comme pour beaucoup de maladies fréquentes, il a été observé dans le cas des TSA une agrégation familiale marquée ainsi que des « phénotypes élargis de l'autisme » au sein de la famille, à un taux plus élevé que dans la population générale. Ces observations ont fait émerger l'hypothèse dite de « maladie commune, variants communs » comme un paradigme prédominant dans le domaine de la génétique de l'autisme pendant plusieurs années. Selon ce modèle, de nombreux allèles communs, pouvant être présents dans la population générale, porteraient chacun un risque faible de développer les troubles et ne seraient ni nécessaires ni suffisants pour l'apparition de la pathologie ; ce serait l'interaction de plusieurs allèles de susceptibilité, associée peut-être à un rôle de l'environnement, qui provoquerait l'apparition des TSA. Selon cette hypothèse, si les membres de la famille d'enfants atteints ont tendance à présenter des manifestations cliniques subtiles des TSA, c'est qu'ils portent probablement quelques allèles à risque. De nombreuses études, basées sur ce modèle, ont cherché à identifier des polymorphismes ayant un rôle de facteur de risque, c'est-à-dire des variants pouvant être trouvés dans les populations témoins mais surreprésentés chez les patients.

Etudes de liaison

La première étude de liaison, réalisée sur une centaine de familles à cas multiples, a été publiée en 1998 (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998). Une myriade d'études du même type a rapidement suivi, utilisant la plupart du temps des échantillons de petite taille et impliquant à chaque fois des

régions chromosomiques différentes. En 2010, une étude de liaison réalisée sur 1 181 familles (Szatmari et coll., 2007) n'a identifié aucune région significativement liée aux TSA et n'a répliqué aucun des résultats obtenus auparavant, suggérant qu'il s'agissait de faux positifs. L'échec de ces études reflète la très grande hétérogénéité génétique caractéristique des TSA.

Etudes d'association

Les études d'association, plus puissantes que les études de liaison dans la recherche de variants à effet faible, ont aussi été largement utilisées. Elles sont de deux types : les études de populations (cas versus témoins) et les études de familles (par exemple le test de déséquilibre de transmission).

Les premières études d'association ont utilisé des stratégies « **gène candidat** » dont le principe consiste à tester un nombre limité de variants localisés à des loci intéressants par leur fonction ou leur localisation (c'est-à-dire trouvés précédemment dans des études de liaison ou touchés par des anomalies cytogénétiques identifiées chez des patients). Nombre d'entre elles ont été réalisées au cours des années 90 puis au début des années 2000, dans le domaine des TSA comme pour d'autres pathologies neuropsychiatriques (Hirschhorn et coll., 2002). Cependant, même si certains résultats semblant plausibles ont été obtenus, aucun n'a été répliqué définitivement et ces études n'ont finalement impliqué aucun gène ou locus dans les TSA, en partie à cause des tailles très limitées des échantillons utilisés.

L'émergence des micropuces à ADN (Section 2.1.1) a ouvert la voie aux approches dites « **génomique entière** » (*genome-wide association studies*, GWAS) qui ne nécessitent pas de sélection a priori de gènes ou de loci candidats. Quatre grandes études d'association pan-génomiques ont été publiées ces dernières années utilisant des micropuces SNP (*single nucleotide polymorphism*) avec des cohortes allant de ~1 500 à plus de 2 700 familles (Wang et coll., 2009 ; Weiss et coll., 2009 ; Anney et coll., 2010 ; Anney et coll., 2012). Deux loci différents sur le chromosome 5 ont d'abord été impliqués : une région non génique au locus 5p14.1 (Wang et coll., 2009) et une région comprenant le gène *SEMA5A* (*semaphorin 5A*) au locus 5p15.2 (Weiss et coll., 2009). Par la suite, en utilisant des puces SNP à un million de marqueurs, Anney et coll. (*Autism Genome Project*), ont identifié une seule association significative pour un groupe de SNP dans une région intronique du gène *MACROD2* (*MACRO domain containing 2*) au locus 20p12.1 (Anney et coll., 2010), non répliquée en doublant la taille de leur échantillon (Anney et coll., 2012). En conclusion, aucune de ces études n'a répliqué les résultats des analyses précédentes. Plusieurs facteurs expliquent l'échec des études d'association pangénomiques dans les TSA : l'hétérogénéité génétique, la taille insuffisante des échantillons de patients et de témoins utilisés, ainsi que la nature même des facteurs génétiques communs potentiellement impliqués. En effet, l'identification de variants communs est directement dépendante du risque relatif et de la fréquence de chaque variant, ainsi que de la taille des échantillons étudiés (Figure 2) ; plus les effets sont faibles, plus la taille de la cohorte doit être importante pour atteindre la puissance statistique nécessaire à l'identification d'allèles de susceptibilité.

L'absence de résultats robustes obtenus à partir des études d'association indique que, si des variants communs sont impliqués dans les TSA, les effets attribuables à chacun d'entre eux sont plus faibles qu'attendu (risque relatif <2), sinon ils auraient été identifiés (Figure 2). L'échec de ces études est donc expliqué d'une part par un risque relatif faible et d'autre part par la taille insuffisante des échantillons utilisés (N = 2 705 au maximum) qui n'apporte pas la puissance statistique nécessaire à l'identification de variants communs à effets très faibles. En se basant sur la distribution des effets liés aux allèles de susceptibilité identifiés dans une pathologie, il est possible de prédire le nombre et les effets des variants encore non identifiés ainsi que la taille des échantillons nécessaires à leur découverte (Park et coll., 2010). En adaptant ces techniques au cas des TSA, Devlin et coll. (2011) confirment que des allèles de susceptibilité associés à des effets substantiels (risque relatif > 1,5) n'existent pas. Selon les auteurs, il existe au mieux quelques variants encore non identifiés associés à des risques intermédiaires (risque relatif 1,3), probablement peu fréquents ; de plus, de très nombreux variants associés à des effets très faibles (risque relatif <1,2) pourraient éventuellement être

identifiés, si l'on arrive à réunir des cohortes très importantes de patients. Il est donc probable que des variants communs existent, au moins chez une partie des patients, mais ils sont associés à des effets extrêmement faibles ; ils sont sûrement très nombreux et agissent probablement en interaction, entre eux et peut-être avec des facteurs environnementaux (Klei et coll., 2012).

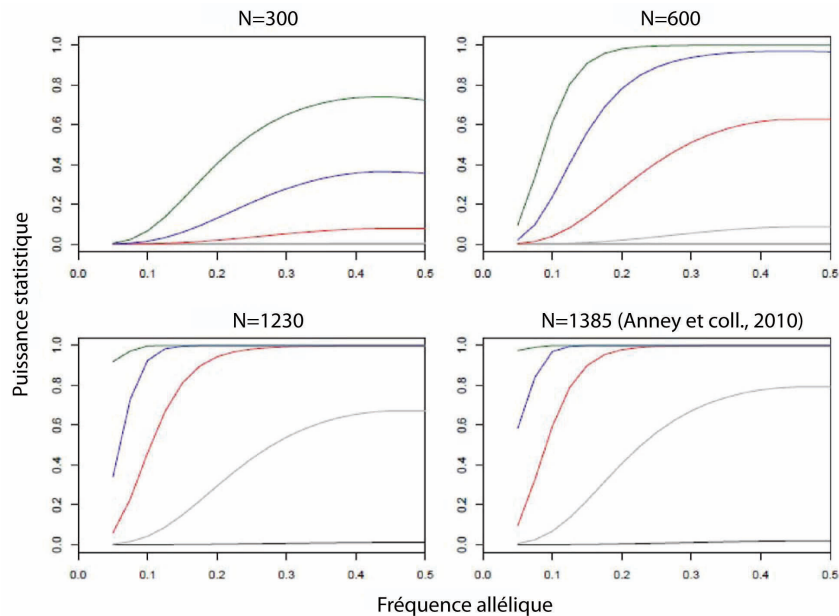


Figure 2. Relation entre le risque relatif associé à chaque variant, la fréquence de chaque variant, la taille des échantillons étudiés et la puissance statistique nécessaire à l'identification des variants.

Chaque graphique représente la puissance statistique d'une étude pangénomique variant selon la taille de l'échantillon étudié (N=300 à N=1 385) ; les courbes représentent la puissance statistique atteinte pour détecter des variants associés à des risques relatifs de 1,2 (courbe noire), 1,4 (courbe grise), 1,6 (courbe rouge), 1,8 (courbe bleue) ou 2 (courbe verte), en fonction de la fréquence allélique dans la population. Le dernier graphique montre que, si des variants associés à des risques ≥ 2 avaient existé, l'étude de Anney et coll. (2010) réalisée sur 1 385 individus de la cohorte de l'Autism Genome Project avait 100 % de chance de les identifier (figure adaptée d'Anney et coll., 2010).

Etant donné les tailles relativement petites des échantillons utilisés dans les TSA, il est instructif de regarder les résultats obtenus à partir des études pangénomiques réalisées dans des cohortes de patients schizophrènes de très grande taille (Purcell et coll., 2009 ; Shi et coll., 2009 ; Stefansson et coll., 2009 ; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium, 2011 ; Ripke et coll., 2013). En effet, avec des cohortes de plus de 15 000 patients et 20 000 témoins (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium, 2011), des preuves statistiques convaincantes répliquées dans des échantillons indépendants ont été apportées pour l'association d'environ dix régions génomiques, incluant la région du complexe majeur d'histocompatibilité (6p22.1) (Stefansson et coll., 2008 ; Purcell et coll., 2009 ; Shi et coll., 2009), la région 11q24.2 en amont du gène *NRGN* (codant une neurogranine) (Stefansson et coll., 2009), ou encore un marqueur localisé dans le microARN *MIR137* (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium, 2011 ; Ripke et coll., 2013).

Les résultats des études d'association pangénomiques dans les TSA ont donc permis de réévaluer les prédictions quant aux effets attendus des variants fréquents potentiellement impliqués dans la pathologie (Figure 3). Ceci implique que, comme dans le cas de la schizophrénie, il faudra réunir des cohortes de très grande taille pour pouvoir détecter des variants à effet faible (N > 15 000 patients).

1.3 Causes non génétiques

Comme cité précédemment, l'héritabilité des TSA est estimée à ~80 % selon les études de jumeaux (Lichtenstein et coll., 2010). La part restante de la variance phénotypique, souvent appelée à tort

« environnement », inclut toutes les causes non génétiques pouvant influencer le phénotype, comme des facteurs épigénétiques, environnementaux ou encore des effets stochastiques et des effets de mesure.

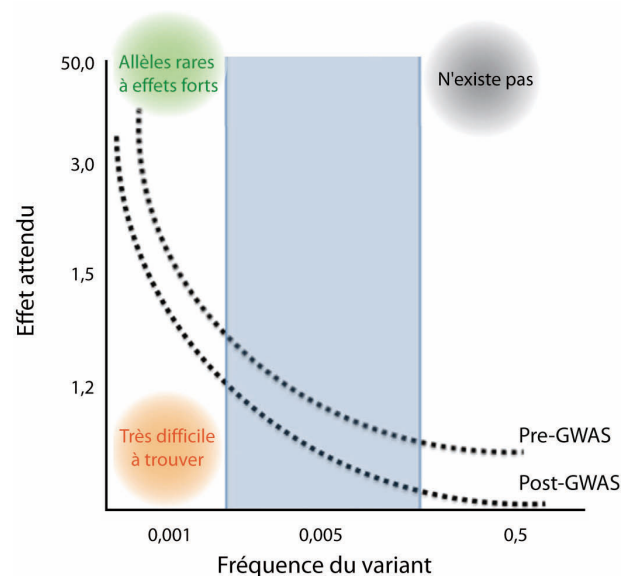


Figure 3. Relation entre la fréquence d'un variant génétique et son effet attendu dans l'apparition des TSA.

Les courbes pointillées montrent nos connaissances sur la relation entre la fréquence d'un variant et son effet attendu avant (courbe supérieure) et après (courbe inférieure) les études d'association sur le génome entier (GWAS). Celles-ci ont montré qu'il n'existe pas de variants communs associés à des effets substantiels ; de plus, si des allèles communs impliqués dans les TSA existent réellement, alors ils sont associés à des effets plus faibles que prévu. Enfin, les variants très rares à effet très faible sont très difficiles, voire impossibles à trouver (figure adaptée de State, 2010).

- Les **facteurs épigénétiques** pouvant avoir un effet sur le phénotype sont encore mal connus, mais de plus en plus d'études s'intéressent à ces mécanismes. Wong et coll. (2013) ont réalisé récemment une analyse de la méthylation du génome chez des jumeaux monozygotes (N=50 paires) normaux, ou bien concordants ou discordants pour les TSA ; ils ont observé des différences des niveaux de méthylation dans certaines régions génomiques entre les différents groupes de jumeaux et au sein des paires de jumeaux discordants, suggérant une implication du « méthylome » dans le TSA.
- Pour la plupart des **facteurs environnementaux** incriminés, aucune preuve formelle de leur implication n'a réellement été apportée. Dans certains cas rares seulement, les TSA sont effectivement dus à une cause environnementale reconnue, comme les infections virales maternelles ou encore l'exposition à certains antiépileptiques ou d'autres molécules toxiques au cours de la grossesse, qui augmenteraient le risque d'apparition de la pathologie (Rasalam et coll., 2005 ; Atladottir et coll., 2010). De plus, de nombreuses études ont analysé l'incidence des complications obstétriques et néonatales sur le risque des TSA (pour revue, voir Gardener et coll., 2011), comme la prématurité, la souffrance périnatale ou les hémorragies maternelles. Bien que les preuves soient insuffisantes pour impliquer l'une de ces complications en particulier, il semble que l'exposition à des facteurs compromettant la santé néonatale et périnatale en général augmente le risque de développer la pathologie (Gardener et coll., 2011).
- Enfin, des **effets stochastiques** ou des **erreurs de mesure** liés à des biais causés par les différences de sexe, de phénotype ou d'âge entre les paires de jumeaux peuvent influencer les mesures des taux de concordance et donc modifier le calcul de l'héritabilité.

2. Contribution des variants rares

Alors que l'essentiel des recherches dans le domaine de la génétique de l'autisme s'est concentré pendant des années sur la recherche de variants communs, l'association connue des TSA avec certaines maladies

monogéniques et génomiques ainsi que l'identification de nombreux remaniements chromosomiques chez des patients indiquaient plutôt un rôle important des variants génétiques rares associés à des effets forts (Veenstra-Vanderweele et coll., 2004). Les techniques du caryotype et de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) ont été utilisées depuis longtemps pour détecter des anomalies structurales rares, particulièrement chez des patients présentant un autisme associé à une déficience intellectuelle ou un autisme syndromique. Elles ont permis d'identifier de nombreux syndromes de microdélétion/microduplication (Section 3.2), comme le syndrome de Phelan-McDermid, le syndrome de Sotos, le syndrome de DiGeorge, les syndromes d'Angelman et de Prader-Willi ou encore les syndromes de Smith-Magenis et de Williams. Les duplications en miroir de ces syndromes ont ensuite été identifiées, elles aussi associées au TSA (comme la duplication 22q11, la duplication 7q11.23 et le syndrome de Potocki-Lupski). De plus, des mutations dans des gènes impliqués dans des maladies génétiques neurodéveloppementales, ainsi que des mutations rares dans des gènes impliqués dans des formes non syndromiques de TSA comme *NLGN3*, *NLGN4X*, *ARX* ou *SHANK3* (Section 3.4), avaient aussi été identifiées par séquençage. Cependant, n'expliquant qu'une petite proportion de patients, les formes d'autisme associées à des anomalies génétiques rares ont longtemps été considérées comme des cas exceptionnels et ont été, dans un premier temps, jugées peu pertinentes pour les formes communes d'autisme idiopathique, jusqu'à l'arrivée de nouvelles technologies comme les micropuces à ADN et les techniques de séquençage de nouvelle génération.

Les micropuces à ADN permettent de rechercher des anomalies chromosomiques sur l'ensemble du génome et d'identifier des remaniements sous le seuil de détection des techniques traditionnelles de cytogénétique, que l'on appelle des variations du nombre de copies (*copy number variant*, CNV). Par ailleurs, les techniques de séquençage de nouvelle génération permettent d'interroger le génome nucléotide par nucléotide, à la recherche de variations de séquence rares (*single nucleotide variant*, SNV). Tout en augmentant la complexité d'interprétation des résultats obtenus, ces techniques ont confirmé le rôle considérable des variants rares et ont permis d'estimer la contribution relative des variations structurales (CNV) et des variations de séquence (SNV) dans l'étiologie génétique des TSA (Sections 2.1, 2.2). Grâce à leur utilisation, de très nombreux diagnostics étiologiques ont été réalisés et le nombre de causes génétiques connues dans les TSA a considérablement augmenté (Section 3).

2.1 Variations du nombre de copies (CNV)

Un CNV est un segment d'ADN de plus de 1 kilobase² (kb) dont le nombre varie par rapport à la diploïdie normale du génome humain (aneuploïdie). A un locus donné, une perte de matériel génétique est appelée une délétion et un gain correspond à une duplication (Figure 4). Les CNV peuvent être hérités ou *de novo*. Dans le cas d'une apparition *de novo*, le CNV n'est pas retrouvé dans les cellules somatiques parentales et l'altération génétique survient soit au niveau des gamètes maternels ou paternels, soit au cours du développement très précoce de l'œuf fertilisé.

Les CNV peuvent n'avoir aucun rôle fonctionnel ou bien entraîner l'apparition d'un phénotype s'ils altèrent la séquence codante d'un gène, le nombre de copies de gènes sensibles au dosage, s'ils dérégulent leur niveau d'expression en touchant un élément régulateur, s'ils démasquent un allèle récessif ou s'ils créent de nouveaux gènes de fusion (pour revue, voir Weischenfeldt et coll., 2013). Les CNV peuvent être récurrents, c'est-à-dire qu'on les retrouve chez plusieurs individus avec la même taille et les mêmes points de cassure, ou non récurrents quand ils ont des tailles différentes chez chaque individu (Figure 5). Certains CNV non récurrents pathogènes peuvent toutefois avoir une région minimale commune dont le changement en nombre de copies entraîne des caractéristiques cliniques similaires.

² La définition de la taille minimale des CNV a diminué avec l'augmentation de la résolution des puces à ADN ; ils sont décrits comme des variants structurels d'au moins 50 bases dans certains articles (Mills et coll., 2010).

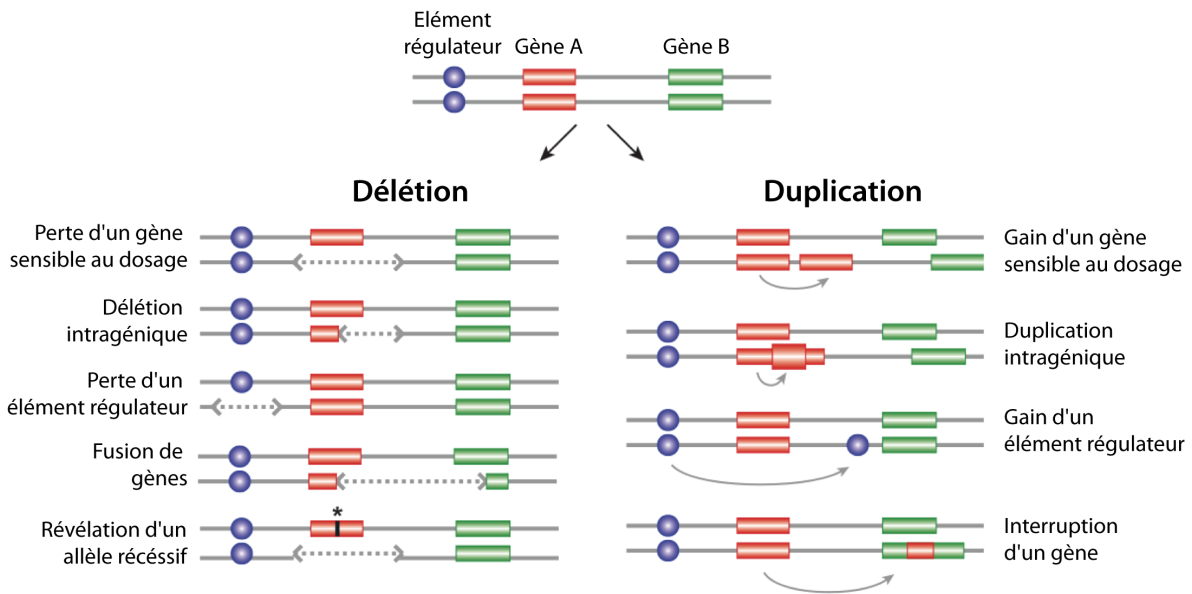


Figure 4. Variations du nombre de copies (CNV).

A un locus donné, une perte de matériel génétique est appelée une délétion et un gain d'une copie correspond à une duplication. Les CNV peuvent affecter un élément fonctionnel (gène ou élément régulateur) de plusieurs manières.

La plupart des CNV récurrents sont causés par un mécanisme de recombinaison homologue non allélique (*non-allelic homologous recombination*, NAHR), lié à la présence de séquences répétées flanquant le réarrangement, appelées duplications segmentales (pour revue, voir Gu et coll., 2008). Celles-ci font en général 10 à 400 kb et partagent plus de 97 % d'identité de séquence. Les réarrangements intra- et inter-chromosomiques sont facilités par la présence de ces séquences répétées, entre lesquelles la recombinaison homologue non allélique peut se faire, prédisposant ainsi la région génomique à l'apparition de CNV. Le remaniement obtenu diffère selon l'orientation des séquences répétées : une recombinaison entre des séquences répétées orientées dans le même sens résulte en une délétion et/ou une duplication, alors qu'une recombinaison entre des séquences inversées aboutit à une inversion (Figure 6). De plus, la recombinaison peut se faire entre des séquences répétées localisées sur deux chromosomes homologues, sur deux chromatides sœurs du même chromosome ou enfin entre des séquences répétées localisées sur la même chromatide (Figure 6).

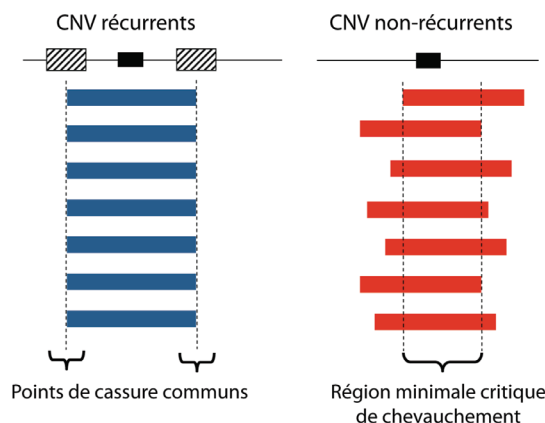


Figure 5. CNV récurrents et non récurrents.

La ligne horizontale noire représente la région génomique où a lieu le réarrangement, le rectangle noir représente un gène localisé dans la région réarrangée et les rectangles rayés sont des séquences répétées qui permettent la recombinaison homologue non-allélique. Les lignes épaisses bleues et rouges sont les CNV (duplications ou délétions). Les CNV récurrents ont la même taille et les mêmes points de cassure ; les CNV non récurrents peuvent avoir une région minimale commune (figure tirée de Gu et coll., 2008).

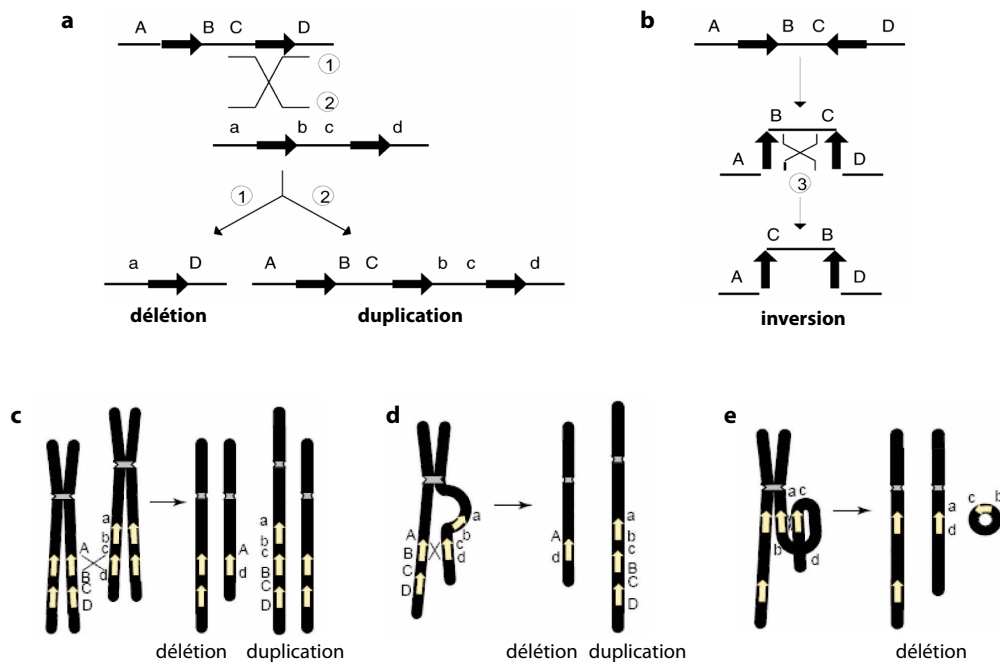


Figure 6. Réarrangements par recombinaison homologue non allélique (NAHR).

a, b, Les séquences répétées sont représentées en noir et leur orientation est indiquée par le sens de la flèche. **a**, La recombinaison entre des séquences répétées orientées dans le même sens donne une délétion et/ou une duplication. **b**, La recombinaison entre des séquences répétées orientées dans des sens inverses donne une inversion. **c, d, e**, Représentation schématique des délétions et duplications réciproques causées par des recombinaisons homologues non alléliques entre deux chromosomes homologues (**c**), entre deux chromatides du même chromosome (**d**) ou sur une même chromatide (**e**). Les séquences répétées sont représentées par des flèches jaunes (figure tirée de Lupski et Stankiewicz, 2005).

Dans le cas des CNV non récurrents, ils sont pour la plupart formés par des mécanismes appelés *non-homologous end-joining* (NHEJ) et *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS) (pour revue, voir Gu et coll., 2008) (Figure 7). Le NHEJ est un mécanisme utilisé par la cellule pour réparer les cassures de l'ADN double-brin ; aucune séquence répétée n'est nécessaire pour la mise en place de ce mécanisme, caractérisé par le fait qu'il laisse une « cicatrice » au niveau de l'ADN, puisque la réparation des double-brins inclut l'ajout de quelques nucléotides aux extrémités cassées. Le modèle de FoSTeS a lieu au moment de la réplication de l'ADN et implique des mécanismes complexes d'invasion et d'hybridation des simples brins en cours de synthèse. Ce mécanisme a lieu en l'absence de séquences répétées, seules des microhomologies (2 à 5 paires de bases) sont nécessaires.

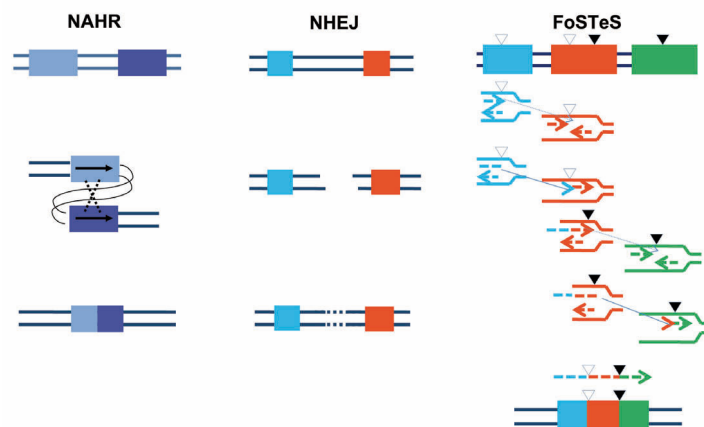


Figure 7. Mécanismes des réarrangements génomiques.

Une recombinaison homologue non allélique (NAHR) au sein d'une chromatide résulte en une délétion ou une duplication ; le mécanisme de *non-homologous end-joining* (NHEJ) cause la délétion de la région présente entre les points de cassure ; le mécanisme de *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS) qui a lieu au cours de la synthèse d'ADN entraîne une délétion complexe (figure tirée de Gu et coll., 2008).

2.1.1 Détection des CNV

Le caryotype constitue l'approche pangénomique diagnostique principale des troubles du développement depuis le début des années 1960 (Figure 8). La résolution obtenue est en moyenne de 10 mégabases (Mb), pouvant atteindre 3 Mb lorsque le caryotype est réalisé en haute résolution. Cette technique a permis d'identifier les délétions/duplications à la base de nombreux syndromes comme le syndrome de Prader-Willi, de DiGeorge ou encore le syndrome de Smith-Magenis (Section 3.2). Dans les années 1990, la FISH, utilisant des chromosomes artificiels de levure (*yeast artificial chromosome*, YAC) ou des chromosomes artificiels de bactéries (*bacterial artificial chromosome*, BAC) a permis, à l'aide de sondes spécifiques, l'étude de régions ciblées du génome ; son utilisation ne permet pas l'étude globale du génome mais elle est d'une aide précieuse pour la caractérisation des points de cassure de réarrangements chromosomiques cytogénétiquement visibles. Dans les années 2000, l'avènement des techniques de puces à ADN ou micropuces a rendu possible l'étude globale du génome à plus haute résolution. Grâce aux données de séquençage du génome humain, une multitude de sondes de différente nature (BAC ou oligonucléotides) ont pu être générées. Les premières puces d'hybridation génomique comparative utilisant des sondes BAC permettaient d'atteindre une résolution moyenne de 1 Mb ; la résolution peut atteindre aujourd'hui ~100 paires de bases.

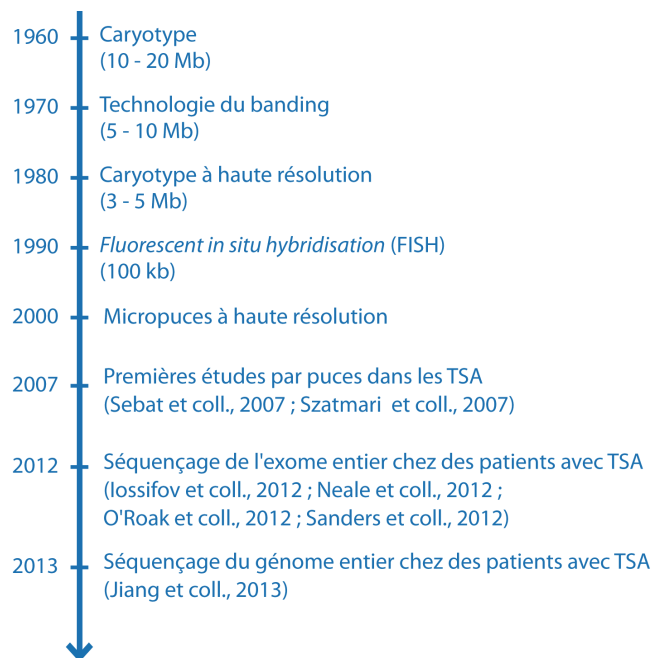


Figure 8. Évolution des techniques de cytogénétique moléculaire jusqu'aux techniques de séquençage de nouvelle génération.

Des remaniements de petite taille répartis sur tout le génome sont aujourd'hui détectables avec l'utilisation des micropuces à haute résolution ; les techniques de séquençage de nouvelle génération permettent maintenant d'interroger l'exome ou le génome nucléotidique par nucléotide.

Les techniques d'hybridation sur puces à ADN ont d'abord été beaucoup utilisées dans le domaine de la cancérologie puis dans les laboratoires cliniques et de recherche où elles ont engendré une renaissance totale de la cytogénétique moléculaire. L'analyse par micropuces est une méthode à haut débit permettant de génotyper simultanément des milliers de loci à travers tout le génome. Il existe deux catégories de micropuces :

- Les **puces d'hybridation génomique comparative** (*array comparative genomic hybridization*, aCGH) qui fonctionnent sur le principe d'une hybridation compétitive entre un ADN test et un ADN de référence marqués par des fluorochromes différents et hybridés sur une même puce sur laquelle des sondes sont attachées. Le nombre de copies est mesuré par les différences relatives de fluorescence. La résolution des puces dépend des sondes utilisées, les puces à clones BAC étant moins résolutive que les puces à oligonucléotides.

- Les **micropuces SNP** (*single nucleotide polymorphism*) qui sont conçues pour génotyper un ADN sur des milliers de SNP simultanément. Un seul ADN test est hybridé sur la puce sur laquelle des oligonucléotides sont fixés. Contrairement aux puces CGH, les micropuces SNP permettent à la fois de génotyper et de détecter les CNV, elles peuvent donc identifier des régions d'homozygotie.

En laboratoire clinique, les techniques de micropuces sont désormais utilisées en routine pour des patients ayant une déficience intellectuelle et des TSA associés ou non à des malformations congénitales multiples. Chez ces patients, le rendement diagnostique des micropuces est d'environ 10-15 % et ne cesse d'augmenter, alors qu'il est inférieur à 3 % avec les technologies traditionnelles de cytogénétique (Miller et coll., 2010). Etant donné ce haut rendement diagnostique et le coût relativement limité, les micropuces sont maintenant recommandées en première intention dans l'exploration étiologique de l'autisme et de la déficience intellectuelle (Miller et coll., 2010). Toutefois, les techniques traditionnelles de cytogénétique sont encore utilisées pour détecter des anomalies chromosomiques non identifiées par les micropuces, telles que les réarrangements équilibrés qui n'entraînent pas de perte ni de gain de matériel génétique (chez ~0,3 % des patients) et les mosaïcismes de faible degré (chez ~1 % des patients) (Miller et coll., 2010).

De très nombreuses études utilisant les micropuces à ADN pour rechercher des CNV dans des cohortes de patients atteints de TSA, avec ou sans déficience intellectuelle, ont été publiées depuis 2007 ; dans des cohortes allant de 264 à 1 124 patients (Sebat et coll., 2007 ; Szatmari et coll., 2007 ; Christian et coll., 2008 ; Marshall et coll., 2008 ; Glessner et coll., 2009 ; Pinto et coll., 2010 ; Shen et coll., 2010 ; Levy et coll., 2011 ; Sanders et coll., 2011). Les résultats obtenus dans ces études varient en fonction des différentes natures de puces utilisées, de leur résolution et de la composition des cohortes de patients. En effet, la proportion de patients présentant une déficience intellectuelle ou des formes syndromiques de TSA ainsi que la proportion de filles atteintes dans les cohortes sont des paramètres qui influencent les résultats puisque ces individus sont plus susceptibles de porter des CNV *de novo*. Certaines cohortes étudiées sont constituées à la fois de cas sporadiques et de familles à cas multiples (Sebat et coll., 2007 ; Szatmari et coll., 2007 ; Christian et coll., 2008 ; Marshall et coll., 2008 ; Glessner et coll., 2009 ; Pinto et coll., 2010), alors que d'autres sont constituées de cas sporadiques uniquement (Levy et coll., 2011 ; Sanders et coll., 2011). La plupart de ces cohortes sont enrichies en patients non syndromiques avec un bon niveau de fonctionnement (c'est-à-dire sans déficience intellectuelle) ; de plus, dans certains centres de recrutement, des anomalies génétiques connues ont été recherchées chez les patients par caryotype, FISH ou encore MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), au moment de leur inclusion. Ceci explique pourquoi le rendement diagnostique de ces études par puces à ADN (~3 % pour l'*Autism Genome Project* ; Pinto et coll., soumis) est nettement inférieur aux rendements obtenus en laboratoires cliniques (10-15 %) (Miller et coll., 2010).

2.1.2 Interprétation des CNV

Les progrès rapides des technologies de puces à ADN et l'augmentation constante de leur résolution ont permis d'identifier des centaines de remaniements de taille très variable et présents sur tous les chromosomes. Rapidement, le problème n'a plus été de détecter les CNV mais plutôt de les interpréter et de définir leur contribution au phénotype. La majorité des CNV détectés chez un individu sont bénins et ils représentent la source la plus importante de polymorphisme humain (Itsara et coll., 2009 ; Conrad et coll., 2010). En effet, les polymorphismes du nombre de copies sont très fréquents dans la population générale et présentent souvent de nombreuses formes alléliques. Parallèlement, le concept de variation structurale pathologique n'est pas nouveau puisque les anomalies chromosomiques font partie des premières causes génétiques identifiées dans les TSA. Pour comprendre l'implication des remaniements chromosomiques submicroscopiques dans la pathologie, il faut donc discriminer les CNV pathogènes des CNV bénins et pour ce faire, il faut d'abord distinguer les CNV rares des CNV fréquents. Ainsi, les études faites chez des individus apparemment sains et le

référencement des CNV communs dans des bases de données sont essentiels pour pouvoir faire cette distinction.

Les premières études par micropuces dans les TSA se sont donc focalisées sur les CNV rares, définis la plupart du temps par une fréquence <1 % dans un échantillon donné (cas et témoins confondus), sans tenir compte de leur mode de transmission. Contrairement à ce qui était attendu, ces études ont montré que le nombre moyen de CNV rares par individu ainsi que leur taille moyenne ne sont pas différents chez les patients par rapport aux témoins (Glessner et coll., 2009 ; Pinto et coll., 2010). On note toutefois que les CNV >1 Mb sont plus fréquents chez les patients et que la taille augmente avec le risque de pathogénicité, les CNV de très grande taille (>5 Mb) étant absents chez les témoins et le plus souvent pathogènes chez les patients. En revanche, le nombre moyen de gènes touchés par les CNV rares identifiés chez les patients est supérieur à celui trouvé chez les témoins et cet enrichissement en gènes est encore plus marqué lorsque l'on ne considère que les délétions (Pinto et coll., 2010 ; Sanders et coll., 2011). De plus, la proportion d'individus portant des CNV rares qui chevauchent des gènes déjà impliqués dans les TSA et la déficience intellectuelle est plus grande chez les patients comparée aux témoins (Pinto et coll., 2010 ; Sanders et coll., 2011). Ainsi, lorsque l'on considère les CNV rares dans leur ensemble, sans tenir compte de leur mode de transmission, le contenu en gènes (souvent lié à la taille mais avec des exceptions) semble être le critère le plus fortement associé aux TSA.

2.1.3 CNV *de novo*, CNV hérités

CNV *de novo*

Rapidement, dans le but d'identifier des CNV étiologiques, les analyses se sont focalisées sur les CNV *de novo*. La constitution de cohortes de témoins dont les parents sont aussi disponibles a permis d'identifier des CNV *de novo* chez ces individus et de mettre en garde contre l'attribution systématique de causalité à tous ceux identifiés chez les cas. L'analyse des CNV *de novo* chez les patients, ainsi que la comparaison de leur nombre et de leur distribution avec ceux identifiés chez des témoins a démontré leur très forte contribution à la vulnérabilité aux TSA. Plusieurs observations peuvent être formulées à partir des études réalisées ces dernières années :

- La plupart des CNV *de novo* sont très rares et souvent uniques, c'est-à-dire détectés chez un seul patient dans chaque cohorte étudiée. Toutefois, lorsqu'ils sont causés par des mécanismes de recombinaison homologue non allélique, ils peuvent être retrouvés de manière récurrente chez plusieurs patients (Sebat et coll., 2007 ; Christian et coll., 2008 ; Marshall et coll., 2008 ; Glessner et coll., 2009 ; Pinto et coll., 2010).
- Il y a plus de patients porteurs de CNV *de novo* (~4,5 à 7 %) (Marshall et coll., 2008 ; Pinto et coll., 2010 ; Sanders et coll., 2011) que de témoins (~1 %) (Sebat et coll., 2007) ou de frères et sœurs non atteints (~2 %) (Sanders et coll., 2011), ce qui démontre leur forte association avec les TSA ; celle-ci est accentuée lorsque l'on considère les CNV de grande taille et ceux riches en gènes.
- Dans les cohortes de patients présentant des formes syndromiques de TSA, la proportion de cas porteurs de CNV *de novo* est considérablement augmentée, pouvant atteindre 27 % (Jacquemont et coll., 2006).
- Parmi les CNV *de novo* trouvés chez les patients, la proportion de délétions est supérieure aux duplications (Sebat et coll., 2007 ; Marshall et coll., 2008 ; Pinto et coll., 2010 ; Levy et coll., 2011 ; Sanders et coll., 2011), indiquant que les délétions sont souvent plus délétères que les duplications.
- Parmi les patients porteurs de CNV *de novo*, il y a plus de filles que de garçons (Sebat et coll., 2007 ; Levy et coll., 2011). De plus, les CNV *de novo* trouvés chez les filles atteintes sont plus grands et plus riches en gènes donc probablement plus délétères (Levy et coll., 2011). Ces résultats vont dans le sens d'un des modèles voulant expliquer le sexe ratio fortement déséquilibré observé dans les TSA (4 garçons pour 1 fille), selon lequel les filles auraient un seuil de tolérance face aux TSA plus élevé que les garçons, indiquant une forme de protection présente spécifiquement chez elles (Werling et Geschwind, 2013) ; ce modèle implique que, pour être atteintes, les filles nécessiteraient un « fardeau étiologique » particulièrement fort.

- Dans un premier temps, des taux de 10 % (12/118) de CNV *de novo* chez les cas sporadiques et 3 % (2/77) dans les familles à cas multiples ont été observés (Sebat et coll., 2007). Puis, selon la même tendance, Marshall et coll. (2008) ont observé 7 % (16/56) de CNV *de novo* chez les cas sporadiques et 2 % (1/49) dans les familles à cas multiples. Cependant, ces résultats n'ont pas été répliqués dans une cohorte de taille nettement supérieure, où des taux similaires de CNV *de novo* au sein des deux types de familles ont été observés : ~5,6 % (22/393) chez les cas sporadiques et ~5,5 % (19/348) chez les familles à cas multiples (Pinto et coll., 2010). De plus, les résultats récemment obtenus par l'analyse de 1 359 familles supplémentaires (n total = 2 446) dans la deuxième étape de l'*Autism Genome Project* confirment que les taux de CNV *de novo* sont identiques chez les cas sporadiques et les familles à cas multiples (Pinto et coll., soumis). Ces observations mettent en garde contre les premiers résultats obtenus, indiquant probablement un biais dans les échantillons de petite taille qui ont été étudiés.
- Les résultats d'une étude récente, semblent indiquer que l'apparition des CNV rares *de novo* non récurrents (non entourés de duplications segmentales) se ferait plus fréquemment dans la lignée germinale du père et augmenterait avec l'âge (Hehir-Kwa et coll., 2011). Néanmoins, ce résultat n'a pas été répliqué dans la dernière étude de l'*Autism Genome Project* sur un échantillon plus large (Pinto et coll., soumis).

L'ensemble de ces observations générales sur la distribution des CNV *de novo* chez les patients par rapport aux témoins démontre leur rôle important dans l'étiologie des TSA. Leur identification et leur analyse ont permis de réaliser de très nombreux diagnostics étiologiques et de découvrir de nombreux loci et gènes nouveaux (Section 3).

CNV hérités

Comprendre comment réconcilier le rôle important des variants *de novo* avec l'observation de familles à cas multiples et du « phénotype élargi de l'autisme » chez certains apparentés de premier degré est un des points clefs dans l'interprétation des corrélations génotype-phénotype. De nombreux variants pathogènes hérités selon différents modes de transmission ont été observés dans les familles à cas multiples atteints de TSA : la transmission par les mères de mutations localisées sur le chromosome X (Section 3), des formes autosomiques récessives ainsi que des formes autosomiques dominantes associées à une pénétrance incomplète (Section 2.1.4).

L'association des TSA avec des syndromes récessifs rares est connue depuis longtemps (pour revue, voir Betancur, 2011). L'utilisation des puces à ADN à la recherche de délétions homozygotes dans des familles consanguines non syndromiques présentant au moins un enfant atteint de TSA, avec ou sans déficience intellectuelle, a permis d'identifier de façon efficace des causes héritées d'autisme (Morrow et coll., 2008). Plus récemment, dans des familles non consanguines, l'observation d'un enrichissement en haplotypes homozygotes chez des patients avec TSA et déficience intellectuelle, par rapport à ceux avec TSA sans déficience intellectuelle et aux frères et sœurs non atteints, a encore confirmé l'importance des variants hérités dans l'étiologie génétique à la base de ces phénotypes (Gamsiz et coll., 2013). Chez les cas sporadiques, la comparaison des remaniements présents chez l'enfant atteint et ceux identifiés chez les frères et sœurs non atteints présente un intérêt majeur dans l'étude des CNV hérités. Comme pour les CNV *de novo*, plusieurs observations peuvent être formulées à partir des données de la littérature :

- La proportion de patients et de frères et sœurs non atteints portant des CNV hérités est identique, même lorsque l'on considère les sous-catégories de CNV touchant des gènes, des exons, des gènes exprimés dans le cerveau ou déjà impliqués dans les TSA (Sanders et coll., 2011). D'une manière intéressante, en analysant tous les CNV rares sans considérer le mode de transmission, Sanders et coll., ont observé une plus grande proportion de patients portant des CNV rares qui chevauchent des gènes déjà impliqués dans les TSA et la déficience intellectuelle, comparé à la fratrie. Mais en restreignant l'analyse aux CNV rares hérités (donc en retirant tous les CNV *de novo*), ils perdent la différence significative, ce qui indique que l'excès observé est majoritairement dû aux CNV *de novo*.

- Aucun biais dans l'origine parentale des CNV hérités n'a été trouvé (Marshall et coll., 2008 ; Levy et coll., 2011 ; Sanders et coll., 2011), même en considérant les variables suivantes : taille, délétions, duplications, CNV uniques, touchant des exons, affectant des gènes exprimés dans le cerveau ou déjà impliqués dans les TSA (Sanders et coll., 2011). Ce résultat ne soutient donc pas le modèle, basé sur l'hypothèse d'une forme de protection présente spécifiquement chez les femmes, selon lequel la transmission des CNV rares se ferait plus souvent par les mères (Zhao et coll., 2007).
- Contrairement aux CNV *de novo*, pour lesquels les délétions excèdent les duplications, la balance est inversée en faveur des duplications transmises « ultra rares » (transmises par un seul parent dans une famille uniquement) (Levy et coll., 2011). Les délétions étant plus délétères, un CNV porté par un parent non atteint sera plus probablement une duplication.

Plus rarement, des cas de mosaïcisme germinale chez le père ou la mère permettent d'expliquer certaines familles à cas multiples ayant des mutations identiques, apparemment absentes chez les parents. Des exemples incluent une famille avec deux sœurs portant une délétion du gène *NRXN1* partiellement présente dans la lignée germinale du père (Szatmari et coll., 2007) ; trois familles, chacune avec deux enfants atteints, portant des délétions ou des mutations dans le gène *SHANK3* (Durand et coll., 2007 ; Moessner et coll., 2007 ; Gauthier et coll., 2010) ; une famille avec deux garçons atteints avec la même mutation de *NLGN4X* provenant d'un mosaïcisme germinale maternel (Zhang et coll., 2009), ou encore une délétion 16p11.2 identifiée chez un frère et sa sœur (Kumar et coll., 2008). Ce mécanisme est probablement sous-identifié puisqu'il n'est suspecté que dans les cas de deux frères ou sœurs atteints avec des mutations apparemment *de novo*. Chez les cas sporadiques, un mosaïcisme germinale chez un des parents passe inaperçu.

2.1.4 Expressivité variable et pénétrance incomplète

Définition

Selon un modèle de génétique mendélienne, la présence d'une mutation chez un individu sain est théoriquement contradictoire avec la notion de pathogénicité (sauf dans le cas d'une transmission liée au chromosome X ou héritée selon un mode récessif). Dans le cas des TSA, l'observation de CNV pathogènes hérités de parents sains, retrouvés chez des frères et sœurs non atteints ou encore trouvés au sein de populations témoins n'est pas rare. Parmi les CNV récurrents récemment décrits chez des patients avec autisme, beaucoup sont en effet associés à des phénotypes variables et peuvent être identifiés dans des cohortes de patients atteints de déficience intellectuelle, d'épilepsie, de schizophrénie ou même, rarement, dans des populations témoins ; c'est le cas par exemple des CNV aux loci 1q21.1, 15q13.3 et 16p13.11 (Section 3.3). On parle alors d'expressivité variable et/ou de pénétrance incomplète (Figure 9). La pénétrance correspond à la fréquence avec laquelle un phénotype particulier est observé, étant donné un génotype spécifique. Si la pénétrance d'un CNV pathogène est de 100 %, alors tous les individus portant ce CNV expriment le phénotype pathologique associé. Dans certains cas, une même anomalie génétique peut engendrer différents tableaux cliniques chez différents individus, on parle alors d'expressivité variable ; les patients présentent toujours un phénotype anormal mais qui peut varier en forme et en sévérité. Seule l'étude d'un nombre très important de patients permet de définir un spectre phénotypique associé à ces CNV. Dans certains cas, on peut espérer que les patients portant tous le même remaniement montrent au moins quelques caractéristiques cliniques communes, un certain degré de concordance phénotypique. La pénétrance incomplète et l'expressivité variable associées à de nombreux variants génétiques compliquent fréquemment l'interprétation de leur implication dans la pathologie.

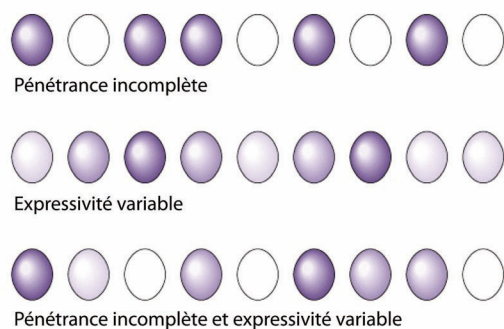


Figure 9. Pénétrance incomplète et expressivité variable.

Chaque ovale représente un individu. En cas de pénétrance incomplète, tous les individus portant un CNV délétère n'expriment pas le phénotype pathologique associé. Plusieurs phénotypes différents sont causés par le même CNV si son expressivité est variable. Souvent, une pénétrance incomplète et une expressivité variable sont observées pour un même CNV.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la pénétrance incomplète et l'expressivité variable associées à certaines mutations.

- **Le modèle oligogénique.** L'apparition d'une deuxième mutation peut moduler le phénotype associé à la première mutation (Girirajan et coll., 2012). Les effets peuvent être additionnels ou épistatiques selon que les mutations touchent des gènes impliqués dans la même voie cellulaire ou non (Veltman et Brunner, 2010).
- **La révélation d'un allèle récessif.** Les délétions peuvent démasquer une mutation récessive présente sur la région homologue intacte. Chez certains patients, ce mécanisme peut entraîner une augmentation de la variabilité phénotypique associée à une délétion donnée. Quelques rares exemples dans la littérature confirment cette hypothèse (Flipsen-ten Berg et coll., 2007 ; Bisgaard et coll., 2009 ; McDonald-McGinn et coll., 2013 ; Pebrel-Richard et coll., 2013), comme par exemple un patient portant une délétion 22q13 ainsi qu'une mutation pathogène dans le gène *ARSA* (arylsulfatase A) situé dans la région délétée, qui expliquent respectivement le retard de développement et la leucodystrophie métachromatique (Bisgaard et coll., 2009), ou encore les mutations du gène *SNAP29* identifiées chez quelques patients ayant un syndrome de délétion 22q11.2 et présentant des caractéristiques phénotypiques atypiques de ce syndrome (McDonald-McGinn et coll., 2013). Cependant, d'autres études ont échoué dans l'identification de mutations ponctuelles dans les gènes de la région délétée, qui pourraient expliquer la variation phénotypique associée à certaines délétions, comme par exemple celles de la région 16p13.11 (Hannes et coll., 2009).
- **L'empreinte génétique.** Son rôle est bien établi dans plusieurs régions génomiques, la plus connue étant la région 15q11-q13 impliquée dans les syndromes de Prader-Willi et Angelman. Bien que ces mécanismes épigénétiques soient encore assez mal compris, il est possible que des gènes soumis à empreinte répartis sur tout le génome contribuent à des variations subtiles du phénotype.
- **Le mosaïcisme somatique.** Lorsque la mutation survient au début de l'embryogenèse, elle n'est observée que dans une partie des cellules d'un individu. Plus la mutation survient tôt dans le développement de l'embryon, plus la proportion de cellules mutées est importante. Dans certains cas, le phénotype va dépendre de la proportion de cellules mutées et du tissu atteint.
- **L'environnement.** Bien qu'une interaction directe entre gènes et environnement n'ait jamais été démontrée dans le cas des CNV à expressivité variable et/ou pénétrance incomplète, on peut imaginer que de tels mécanismes, s'ils existent, pourraient modifier le phénotype. Les facteurs environnementaux peuvent altérer l'épigénome, c'est-à-dire l'ensemble des mécanismes épigénétiques qui régulent l'expression de nos gènes et la dynamique du génome.
- Enfin, on peut imaginer que des **processus stochastiques** survenant au cours des différentes étapes du développement influencent le phénotype.

Exemples

Plusieurs CNV localisés sur le chromosome 16 illustrent parfaitement ces concepts d'expressivité variable et de pénétrance incomplète. Le bras court du chromosome 16 est particulièrement riche en régions répétées et donc hautement susceptible aux microdélétions et microduplications, c'est pourquoi plusieurs syndromes génétiques sont dus à des réarrangements localisés dans cette région (Sections 3.2 et 3.3) (Figure 10). Les microdélétions récurrentes et les microduplications réciproques d'environ 600 kb localisées dans la région **16p11.2 proximale** (GRCh37/hg19 : 29,65-30,20 Mb) sont associées à une expressivité extrêmement variable (Weiss et coll., 2008 ; Fernandez et coll., 2010 ; Rosenfeld et coll., 2010 ; Shinawi et coll., 2010). Elles sont retrouvées chez ~1 % des patients atteints d'autisme (Kumar et coll., 2008 ; Marshall et coll., 2008 ; Weiss et coll., 2008). Le spectre phénotypique associé aux délétions 16p11.2 proximales inclut des TSA, une déficience intellectuelle, une épilepsie, des dysmorphies variées et des malformations congénitales (Bijlsma et coll., 2009 ; Fernandez et coll., 2010 ; Shinawi et coll., 2010). Les duplications sont retrouvées dans des cohortes de patients atteints de TSA, déficience intellectuelle, schizophrénie, épilepsie ou présentant un trouble du déficit de l'attention/hyperactivité (TDAH) (Fernandez et coll., 2010 ; Shinawi et coll., 2010). Enfin, il y a une corrélation directe entre le nombre de copies à ce locus et l'indice de masse corporelle qui diminue quand le nombre de copies augmente. Les délétions 16p11.2 proximales sont identifiées chez des patients obèses, avec ou sans déficience intellectuelle, et l'on estime qu'elles expliquent 0,7 % des cas d'obésité (Walters et coll., 2010), alors que les duplications sont associées à un indice de masse corporelle faible (Jacquemont et coll., 2011). En outre, les CNV de cet intervalle ont des effets opposés sur le périmètre crânien, les délétions étant associées à une macrocéphalie et les duplications à une microcéphalie (Shinawi et coll., 2010). Cette région contient 29 gènes ; des études récentes chez le poisson zèbre ont montré que la plupart des gènes dans la région 16p11.2 proximale jouent un rôle important dans le développement du cerveau (Blaker-Lee et coll., 2012) et ont identifié le gène *KCTD13* comme étant impliqué dans les phénotypes en miroir de la taille du cerveau (Golzio et coll., 2012).

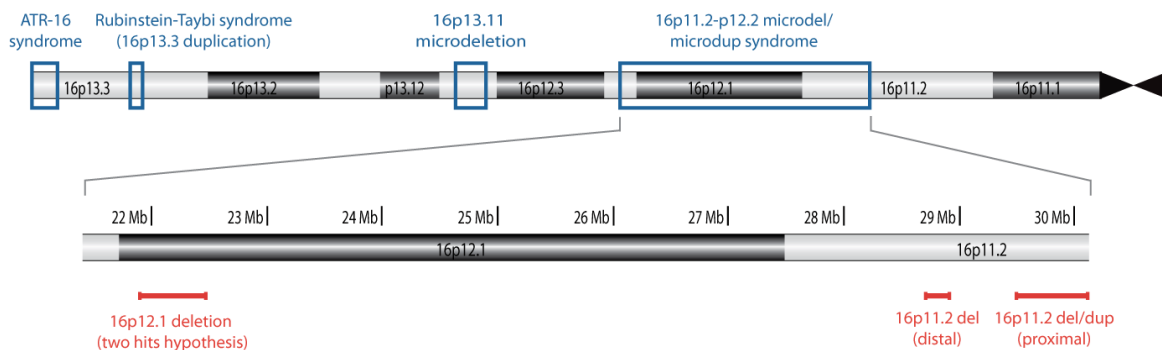


Figure 10. Carte du bras court du chromosome 16.

Plusieurs syndromes de microdélétion/microduplication sont localisés sur le bras court du chromosome 16, particulièrement riche en séquences répétées. La région 16p11.2-16p12.2 d'environ 9 Mb est détaillée ; elle comprend les délétions/duplications 16p11.2 proximales et distales, ainsi que les délétions 16p12.1 (GRCh37/hg19) (figure adaptée de Tabet et coll., 2012).

Toujours sur le chromosome 16, les délétions récurrentes de ~520 kb localisées en 16p12.1 (GRCh37/hg19 : 21,95-22,43 Mb) ont d'abord été identifiées chez quatre patients schizophrènes (International Schizophrenia Consortium, 2008), puis chez un patient atteint d'autisme (Marshall et coll., 2008), alors qu'elles n'ont pas été retrouvées chez plus de 5600 témoins (Itsara et coll., 2009). En analysant plusieurs cohortes de cas présentant divers troubles neurodéveloppementaux (déficience intellectuelle, retard de développement, schizophrénie, malformations congénitales) et de témoins, Girirajan et coll. (2010) ont montré un enrichissement de cette délétion 16p12.1 par rapport aux témoins. Ils ont fait plusieurs observations : (i) Des manifestations phénotypiques très variées sont associées à cette délétion, incluant une déficience intellectuelle, un retard de

langage, une microcéphalie, un retard de croissance, des crises d'épilepsie, une hypotonie et des malformations cardiaques congénitales. (ii) La majorité des délétions 16p12.1 sont héritées. (iii) Les parents porteurs présentent souvent des phénotypes anormaux, dont des troubles bipolaires, un TDAH ou une épilepsie. (iv) Un quart des patients portant la délétion 16p12.1 ont un deuxième CNV (*second hit*). (v) Lorsque le deuxième CNV est responsable d'un syndrome décrit, le phénotype observé est différent et/ou plus sévère de celui des patients n'ayant pas la délétion 16p12.1. (vi) Il y a une corrélation négative entre la proportion de cas ayant des CNV *de novo* et la fréquence d'un deuxième évènement (*second hit*).

L'ensemble de ces observations suggère que la délétion 16p12.1 a un rôle de facteur de risque ou de modulateur plutôt que de mutation pathogène. Les auteurs ont formulé l'hypothèse d'un modèle selon lequel l'action d'un premier CNV, agissant de concert avec un deuxième évènement, résulte en un phénotype distinct ou plus sévère. Le deuxième évènement peut être un CNV, une mutation ponctuelle ou un facteur environnemental. Ce modèle, aussi appelé « modèle oligogénique », permettrait d'expliquer les phénomènes d'expressivité variable et de pénétrance incomplète. Toutefois, il est important de noter que les CNV concomitants (le *second-hit*) identifiés dans cette étude, correspondent à des CNV déjà connus pour être pathogènes et associés à des phénotypes extrêmement variables comme par exemple la délétion 22q13. Ils pourraient donc avoir plus d'impact sur le phénotype que la délétion 16p12.1 elle-même, qui n'a peut-être aucun rôle. Pour déterminer la contribution de chaque CNV, il faut caractériser un nombre très important de cas portant le(s) même(s) remaniements. Bien que les délétions 16p12.1 soient trouvées relativement fréquemment chez des individus témoins, il y a un enrichissement évident chez les patients atteints de déficience intellectuelle et les délétions 16p12.1 sont donc considérées comme un facteur de risque associé à la pathologie (Cooper et coll., 2011 ; Moreno-De-Luca et coll., 2013).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre un rôle considérable des CNV rares, *de novo* ou hérités, dans la vulnérabilité génétique des TSA. La recherche de CNV s'est imposée comme une méthode rapide et efficace pour détecter des réarrangements associés à la pathologie, comprendre la contribution relative des CNV *de novo* et hérités dans l'étiologie des TSA et identifier de nouveaux gènes causals (Section 3). L'ensemble des études utilisant les micropuces nous a permis d'élargir considérablement nos connaissances des bases génétiques des TSA. La Figure 11 illustre les stratégies utilisées pour donner un ordre de priorité aux CNV identifiés.

Bien que le critère d'apparition *de novo* d'un CNV lui donne typiquement la priorité dans les analyses, le paradigme de causalité ne peut pas être vu simplement dans le contexte du mode de transmission. Dans le cas de CNV hérités, la comparaison avec des données obtenues à partir de cohortes de témoins de très grande taille est essentielle pour sélectionner les remaniements rares chez les patients. D'autres critères de sélection des CNV potentiellement pathogènes sont ensuite utilisés : la récurrence chez plusieurs cas indépendants, la taille et la nature du remaniement (délétion/duplication), ou encore le chevauchement avec des loci impliqués dans d'autres pathologies neurodéveloppementales ou avec des gènes candidats. Les CNV candidats peuvent ensuite être recherchés dans d'autres cohortes de cas et/ou si un gène candidat est identifié, celui-ci peut être séquencé pour trouver des mutations chez des patients indépendants. Les progrès constants dans l'amélioration des puces à ADN pour détecter des remaniements toujours plus petits et l'arrivée des techniques de séquençage du génome entier à haut débit promettent d'élargir considérablement notre compréhension de l'architecture étiologique des TSA.

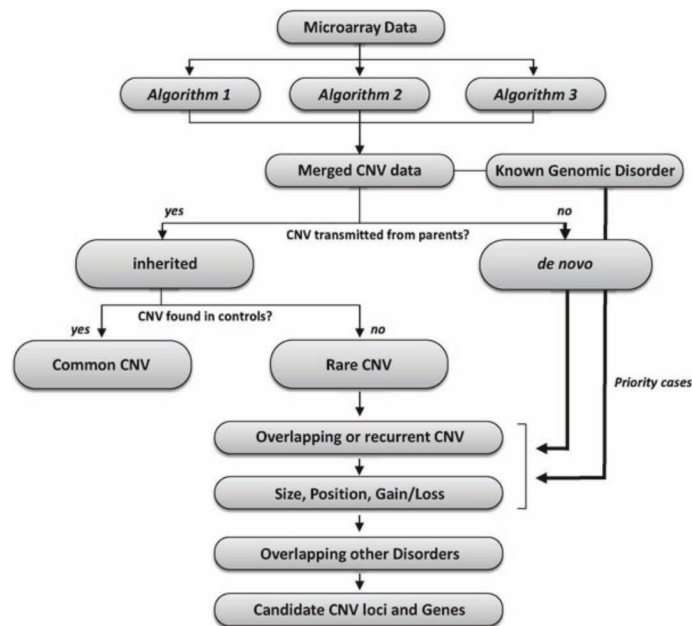


Figure 11. Analyse des données de micropuces et ordre des priorités pour l'étude des CNV rares.

Les données de micropuces sont souvent analysées par plusieurs algorithmes ; la priorité est donnée aux CNV déjà définis dans des syndromes génétiques ou aux CNV *de novo*. Pour les CNV rares non trouvés chez des témoins ou très rarement, des paramètres comme la taille, la position, la récurrence et le chevauchement avec d'autres CNV impliqués dans des pathologies neurodéveloppementales sont utilisés pour évaluer la signification clinique associée aux loci candidats (figure tirée de Marshall et Scherer, 2012).

2.2 Variations de séquence (SNV)

2.2.1 Détection des SNV

Les techniques traditionnelles de séquençage, dites « de première génération », ont été largement utilisées depuis leur mise au point dans la deuxième moitié des années 1970 (Maxam et Gilbert, 1977 ; Sanger et coll., 1977). De nouvelles méthodes ont vu le jour au cours des années 2000 qui permettent d'effectuer un séquençage rapide et à moindre coût. Celles-ci ont révolutionné la génétique humaine, en particulier dans le domaine des maladies rares, où des centaines de gènes ont été découverts grâce au séquençage de l'ensemble des exons (exome) de quelques cas seulement.

L'une des stratégies efficaces pour identifier des gènes impliqués dans les TSA a été de sélectionner les gènes candidats touchés par des CNV puis de les séquencer pour identifier des mutations ponctuelles délétères chez d'autres patients. Cependant, dans le cas de remaniements de grande taille, des dizaines de gènes peuvent être affectés et l'étape qui consiste à déterminer lequel de ces gènes est causal est souvent compliquée. Aujourd'hui, l'efficacité et le prix modéré des nouvelles techniques permettent de séquencer directement la totalité du génome ou de l'exome en très peu de temps. Ces techniques de nouvelle génération sont donc maintenant utilisées dans les laboratoires de recherche pour détecter des variations de séquence (*single nucleotide variants*, SNV) ou des insertions et des délétions de nucléotides potentiellement délétères.

2.2.2 SNV *de novo*, SNV hérités

Comme pour l'analyse des CNV, l'interprétation des SNV identifiés chez des patients atteints de TSA est souvent difficile. La caractérisation du génome humain au niveau individuel et au niveau de la population est une étape fondamentale pour clarifier la contribution des SNV aux phénotypes humains. Il a été récemment estimé que, en plus des innombrables variants synonymes et faux-sens, tout individu peut porter en moyenne 100 à 300 variants perte de fonction, c'est-à-dire des mutations non-sens, avec décalage du cadre de lecture, ou qui affectent des sites d'épissage (Abecasis et coll., 2010 ; MacArthur et coll., 2012). Elles peuvent être de

plusieurs types : des mutations isolées à l'état hétérozygote dans des gènes insensibles à l'haploinsuffisance, des allèles de maladies récessives présents à l'état hétérozygote, des variants perte de fonction à l'état homozygote ou hétérozygote composé dans des gènes redondants ou encore des erreurs de séquençage ou d'annotation du génome humain. Chez les sujets atteints, il faut donc distinguer les SNV pathogènes du « bruit de fond » des variants fonctionnellement neutres.

Quatre grandes études de séquençage de l'exome entier chez des patients atteints de TSA ont été publiées ces dernières années, avec des cohortes allant de 175 à 343 familles (Iossifov et coll., 2012 ; Neale et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b ; Sanders et coll., 2012). Certaines cohortes étudiées sont constituées à la fois de cas sporadiques et de familles à cas multiples (Neale et coll., 2012), alors que d'autres sont constituées de cas sporadiques uniquement (Iossifov et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b ; Sanders et coll., 2012).

SNV *de novo*

Les premières analyses dans les TSA se sont focalisées sur les SNV *de novo*, plus rares et potentiellement plus délétères. L'ensemble des résultats a confirmé le rôle important des mutations *de novo* dans l'étiologie des TSA ainsi que l'hétérogénéité génétique extrême des loci impliqués. En effet, parmi les 122 gènes touchés par des SNV *de novo* perte de fonction identifiés dans ces études (Iossifov et coll., 2012 ; Neale et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b ; Sanders et coll., 2012), seuls cinq ont été trouvés chez deux patients indépendants (*CHD8*, *DIRK1A*, *KATNAL2*, *SCN2A* et *POGZ*). Parmi ceux-là on trouve le gène *CHD8* qui code une hélicase (agissant comme répresseur de la transcription en réorganisant la structure de la chromatine) et dans lequel deux mutations *de novo* ont été identifiées chez des patients lors de l'analyse de l'exome (O'Roak et coll., 2012b) ; par la suite, le séquençage ciblé de 44 gènes chez 2 446 patients atteints de TSA a confirmé son implication dans la pathologie, avec sept autres mutations *de novo* identifiées (O'Roak et coll., 2012a). L'implication de *DIRK1A* et *SCN2A* a aussi été confirmée par d'autres cas de mutations ou délétions *de novo*. Plusieurs observations peuvent être formulées à partir de l'ensemble des résultats publiés :

- Le nombre de SNV *de novo* total (synonymes et non synonymes) est identique chez les patients et leur fratrie non atteinte. En moyenne, une variation de séquence *de novo* est observée par patient et par frère/sœur, suggérant donc un taux de mutation identique (Iossifov et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b ; Sanders et coll., 2012).
- La proportion de patients portant des SNV *de novo* perte de fonction (c'est-à-dire non-sens, touchant des sites d'épissage ou encore provoquant un décalage du cadre de lecture) est deux fois plus élevée par rapport aux frères et sœurs non atteints (Iossifov et coll., 2012 ; Sanders et coll., 2012). Ce résultat indique une très forte association des variants perte de fonction avec les TSA et permet d'estimer que 50 % d'entre eux sont délétères, la difficulté étant de savoir lesquels. Cet enrichissement est encore plus marqué lorsque l'on considère uniquement les SNV *de novo* touchant des gènes exprimés dans le cerveau (Sanders et coll., 2012).
- Plusieurs SNV *de novo* identifiés sont localisés dans des gènes précédemment impliqués dans les TSA et/ou la déficience intellectuelle indiquant que, comme pour l'analyse des CNV, les divisions nosologiques sont difficilement applicables au niveau moléculaire (O'Roak et coll., 2012b).
- De nombreux gènes trouvés mutés chez des patients codent des protéines qui interagissent directement entre elles ce qui indique que, malgré l'hétérogénéité génétique des TSA, il y a des voies biologiques communes impliquées dans la pathologie (Neale et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b).
- Enfin, les quatre études montrent clairement une corrélation positive entre l'apparition de mutations *de novo* ponctuelles et l'âge du père (Iossifov et coll., 2012 ; Neale et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b ; Sanders et coll., 2012). Ce résultat est en accord avec l'augmentation du risque de développer des TSA pour les enfants de pères âgés (Hultman et coll., 2011). Une étude réalisée sur 78 trios, dont la plupart des cas sont atteints de TSA (44 trios) ou de schizophrénie (21 trios), confirme ces résultats (**Figure 12**) (Kong et

coll., 2012). Une augmentation moyenne de deux mutations par an dans la lignée germinale paternelle a été calculée ; à cette vitesse, les auteurs estiment que les mutations sont doublées tous les 16,5 ans. L'augmentation du taux de mutations *de novo* ponctuelles en fonction de l'âge du père est aussi observée dans la population générale (Abecasis et coll., 2010).

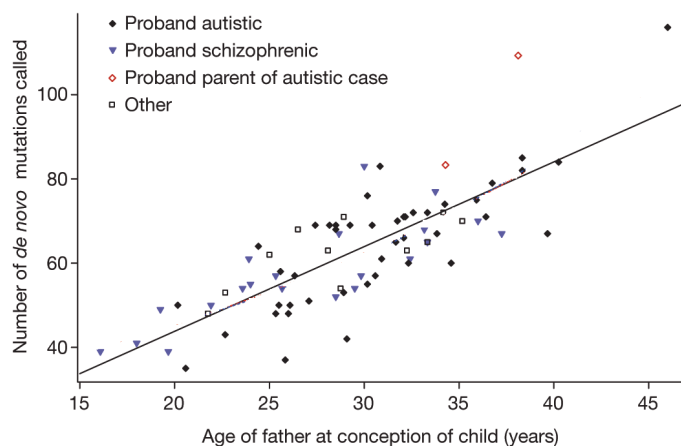


Figure 12. Age du père et nombre de mutations *de novo*.

Le nombre de mutations *de novo* est indiqué en fonction de l'âge du père au moment de la conception de l'enfant pour 78 trios atteints de TSA (n=44), schizophrénie (n=21), ou encore inclus pour d'autres raisons, par exemple la constitution de familles multigénérationnelles (n=13) (figure adaptée de Kong et coll., 2012).

Bien que ce ne soient que des estimations, il est intéressant de noter que Sanders et coll. (2011) ont évalué à 234 le nombre de loci impliqués dans les TSA à partir de la distribution des CNV *de novo* identifiés dans leur cohorte de 1 124 familles à cas sporadiques. En utilisant la même méthode pour l'analyse des SNV *de novo*, ils estiment cette fois que 1 034 gènes sont impliqués dans la vulnérabilité génétique de l'autisme (Sanders et coll., 2012). Toutefois ces résultats sont à considérer avec précaution puisque l'intervalle de confiance associé à ce chiffre va de 119 à 2 555 et le risque lié à chaque loci est inconnu. De plus, ces calculs sont basés sur les résultats obtenus à partir d'une cohorte majoritairement constituée de patients avec TSA de haut niveau (sans déficience intellectuelle), ce qui suggère qu'ils ne s'appliquent probablement pas à toutes les formes d'autisme.

L'estimation de la probabilité d'observer plusieurs SNV *de novo* dans un même gène chez différents patients indépendants est une approche statistique puissante pour identifier des gènes associés aux TSA. Sur la base de leurs observations et prenant en compte la taille de leur échantillon, la taille des gènes et leur pourcentage en GC, Sanders et coll. (2012) estiment que deux mutations perte de fonction dans un même gène suffisent pour associer de manière statistiquement significative ce gène avec la pathologie. Dans la pratique, des preuves additionnelles sont nécessaires avant d'attribuer un rôle étiologique à un variant.

SNV hérités

La méthode de séquençage du génome entier a également été appliquée au sein de **familles consanguines** ayant au moins un enfant atteint de TSA, dans le but d'identifier des facteurs hérités impliqués dans la pathologie (Yu et coll., 2013). Dans cette étude, plusieurs mutations homozygotes faux sens ont été détectées dans des gènes responsables de maladies génétiques connues. Par exemple, des mutations faux sens homozygotes du gène *AMT* (*aminomethyltransferase*) ont été identifiées dans une famille avec trois enfants présentant des TSA. Les mutations perte de fonction d'*AMT* causent une encéphalopathie avec hyperglycémie, un syndrome néonatal autosomique récessif caractérisé par une hypotonie et une épilepsie sévère évoluant vers une déficience intellectuelle profonde et une espérance de vie extrêmement limitée. De façon intéressante, chez cette famille dont les trois enfants avec TSA ont des manifestations neurologiques

moins sévères rappelant l'encéphalopathie glycinique, les mutations *AMT* ont apparemment des effets hypomorphes. D'autres mutations faux sens ou perte de fonction homozygotes dans des gènes impliqués dans les TSA et d'autres troubles apparentés ont aussi été identifiées dans des familles consanguines et beaucoup plus rarement au sein de familles non consanguines (Yu et coll., 2013). Ces résultats montrent que des allèles hypomorphes peuvent engendrer des présentations atypiques de maladies connues ou même des phénotypes complètement différents de ceux dus aux allèles nuls dans un même gène, suggérant donc que notre compréhension de l'étiologie des TSA se fera non seulement par l'identification de gènes causals mais aussi par l'étude de leur architecture allélique. De plus, cette étude démontre à nouveau que des mutations héritées récessives expliquent l'apparition des TSA chez un certain nombre de patients.

Malgré le nombre étonnamment élevé de variants perte de fonction pouvant être identifiés chez un individu sain, ceux trouvés à l'état homozygote ou hétérozygote composé sont largement minoritaires et le plus souvent distribués sur un petit nombre de gènes, comme par exemple les gènes codant les récepteurs olfactifs (MacArthur et coll., 2012). En moyenne, tout individu porte approximativement 5 à 20 variants de ce type, appelés « *knockouts* ». Dans une étude cas-témoins, Lim et coll. (2013) se sont intéressés au rôle dans les TSA des variants perte de fonction retrouvés à l'état homozygote ou hétérozygote composé qui entraînent la perte totale de la fonction du gène. En excluant les variants *knockout* retrouvés fréquemment dans la population témoin et en étudiant uniquement les *knockout* rares (ayant une fréquence inférieure à 5 %), ils trouvent un enrichissement significatif chez les cas : 3 % des témoins et 6 % des patients portent au moins un variant rare *knockout*. De même, ils observent 1,5 fois plus de variants hémizygotés sur le chromosome X chez les garçons atteints de TSA par rapport aux témoins. Leurs résultats montrent une forte association des variants *knockout* dans l'étiologie de l'autisme, donnent davantage de pistes pour comprendre les formes familiales de TSA et indiquent encore une fois que des SNV perte de fonction récessifs ou liés à l'X chez les sujets de sexe masculin jouent un rôle non négligeable dans l'étiologie des TSA.

Tout comme pour les CNV, les études des variations de séquence démontrent un rôle crucial des SNV *de novo* et une importante contribution des mutations héritées dans l'étiologie de l'autisme. Les premières études de séquençage de l'exome entier ont démontré la puissance de cette approche pour l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la pathologie, particulièrement lorsqu'elles se concentrent sur les mutations ponctuelles *de novo*. L'analyse informatique d'autres types de variants, tels que les insertions et les délétions de quelques paires de bases (indels), à partir de données de séquençage de nouveaux gènes est plus difficile mais les méthodes commencent à se développer (Iossifov et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b). L'étude de cette catégorie de variants ainsi que celle des CNV de petite taille laisse présager l'identification d'un grand nombre de variants pathogènes. Les techniques de séquençage de l'exome et du génome entier sont déjà utilisées dans certains centres de recherche clinique pour faciliter le diagnostic génétique et leur utilisation est en pleine expansion.

En conclusion, l'ensemble des résultats de l'étude des CNV et SNV dans les TSA démontre à quel point il est souvent difficile d'attribuer un rôle causal à un gène candidat, étant donné la rareté des mutations observées, leur présence chez des témoins et le nombre de mutations récurrentes nécessaires pour atteindre la significativité statistique. C'est pourquoi d'autres approches, par exemple des études fonctionnelles *in vitro* et/ou *in vivo*, peuvent être utiles pour impliquer un variant rare dans la pathologie. L'observation de plusieurs mutations dans un même gène chez des cas indépendants reste toutefois le meilleur moyen pour apporter la preuve définitive d'une association génétique avec les TSA. Malgré ces difficultés, les techniques de micropuces à ADN et de séquençage de nouvelle génération ont permis d'identifier de nombreux gènes et de quantifier le rôle des différents facteurs génétiques dans la vulnérabilité génétique de l'autisme. L'interprétation des résultats a nécessité l'établissement de nouveaux critères et de nouvelles règles pour comprendre l'effet d'une

mutation donnée et apporter un diagnostic étiologique. Finalement, il apparaît que la structure génétique sous-jacente inclut un ensemble d'allèles rares autosomiques dominants ou récessifs, ou liés au chromosome X, pouvant être associés à une forte pénétrance ou parfois à une expressivité variable et une faible pénétrance.

Notre connaissance actuelle de la contribution relative de différents facteurs génétiques dans l'autisme permet, de façon rétroactive, de mieux comprendre les résultats obtenus à partir des études de jumeaux. L'observation d'une concordance très forte chez les jumeaux monozygotes (70-100 %) et relativement faible (0-30 %) chez les jumeaux dizygotes confirme qu'une fraction significative de cas résulte de mutations *de novo*. D'un autre côté, le fait de trouver la plupart du temps des taux de concordance non nuls pour les jumeaux dizygotes suggère un rôle des facteurs génétiques hérités ou des facteurs environnementaux pré et postnataux et éventuellement une interaction entre les deux. De plus, les taux de concordance des jumeaux dizygotes calculés dans certaines études sont supérieurs à ceux souvent observés chez les frères et sœurs non jumeaux (Ozonoff et coll., 2011 ; Constantino et coll., 2013), soulevant l'hypothèse d'une influence de l'environnement prénatal qui augmenterait le taux de concordance des jumeaux dizygotes (Constantino et coll., 2013).

Théoriquement, si l'on admet une indépendance stricte entre des événements *de novo* chez des jumeaux dizygotes, leur impact sur leur taux de concordance doit être négligeable. Mais l'influence des facteurs *de novo* est accentuée si leur probabilité de récurrence augmente dans la famille. Deux facteurs sont alors évoqués : (i) L'augmentation du taux de mutation dans la lignée germinale en fonction de l'âge du père (Hehir-Kwa et coll., 2011 ; Kong et coll., 2012). (ii) Les mosaïques germinales qui augmentent grandement la probabilité de récurrence d'un événement *de novo* dans la descendance (Durand et coll., 2007 ; Kumar et coll., 2008 ; Zhang et coll., 2009). Ainsi, chez une certaine proportion de paires de jumeaux dizygotes, la concordance pourrait être expliquée par l'implication de facteurs génétiques *de novo*. Le taux de concordance des jumeaux dizygotes peut donc être expliqué à la fois par des mutations héritées, *de novo* et éventuellement des facteurs environnementaux. D'un point de vue épidémiologique, l'augmentation du taux de mutations *de novo* en fonction de l'âge du père est un point important. On peut penser que l'augmentation de la prévalence des TSA observée ces dernières années pourrait être due, au moins en partie, à une réelle augmentation de l'incidence causée par l'accumulation de mutations *de novo* résultant de l'augmentation de l'âge des pères dans les populations modernes (Kondrashov, 2012).

Finalement, les recherches de variations de structure et de séquence ont démontré le rôle prépondérant des mutations rares dans l'étiologie de l'autisme. Cependant, bien qu'ils aient souvent été présentés comme des modèles dichotomiques, la contribution à la fois de variants rares et communs chez un patient n'est pas exclue. Le rôle modulateur de variants communs, additionné aux variants rares à effets forts, pourrait contribuer à la variabilité phénotypique observée parmi les patients.

3. Causes génétiques connues de TSA

Alors que deux décennies de recherche de variants communs nous ont peu appris sur les causes génétiques impliquées dans les TSA, la recherche de variants rares à effet fort et les progrès techniques nous ont permis d'identifier de très nombreux facteurs étiologiques en seulement quelques années (Figure 13).

Comme discuté précédemment, l'origine génétique des TSA est extrêmement hétérogène (Figure 14). Dans ~5 % des cas, les troubles peuvent être causés par des remaniements chromosomiques visibles au caryotype. D'autres cas sont associés à des maladies monogéniques, dont la plus fréquente est le syndrome de l'X fragile (2 %), et des syndromes de microdélétion/microduplication, dont le(s) gène(s) responsable(s) de la pathologie est connu, comme dans les syndromes d'Angelman, de Smith-Magenis, et de Phelan-McDermid, ou bien encore non identifié(s). L'arrivée des puces à ADN a permis de révéler des nouveaux syndromes de microdélétion/microduplication, le plus souvent associés à une pénétrance incomplète et/ou une expressivité variable. De plus, chez une petite proportion de patients, des mutations rares dans des gènes à forte

pénétrance sont identifiées. On voit donc que les causes sont multiples, chacune d'elles étant très rare et identifiée chez une petite proportion de cas seulement, mais, ensemble, elles permettent d'expliquer l'étiologie chez ~25 % des patients atteints de TSA.

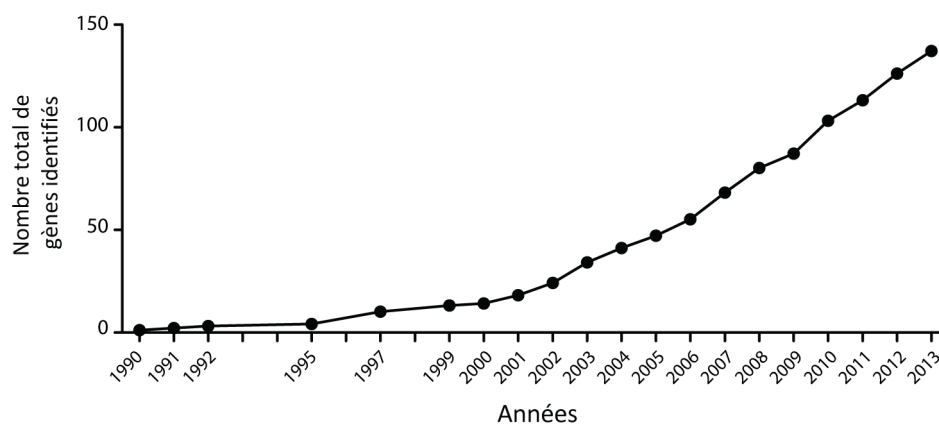


Figure 13. Nombre de gènes impliqués dans les TSA en fonction du temps.

Le nombre de gènes impliqués dans les TSA a énormément augmenté depuis quelques années grâce aux études de recherche de variants rares (figure faite à partir d'une version mise à jour des gènes impliqués publiée dans Betancur, 2011).

3.1 Remaniements chromosomiques

Des anomalies chromosomiques cytogénétiquement visibles ont été rapportées chez ~5 % des patients atteints de TSA (Kielinen et coll., 2004). Elles peuvent correspondre à des anomalies du nombre de chromosomes ou des translocations, inversions, délétions et duplications de très grande taille (>5 Mb) qui peuvent toucher tous les chromosomes.

Différents groupes de duplications segmentales sur le bras long du chromosome 15 entraînent des formes variées de délétions et duplications récurrentes associées aux TSA et à d'autres syndromes neurodéveloppementaux, comme la déficience intellectuelle et l'épilepsie. Les duplications de la région 15q11-q13 sont les remaniements chromosomiques les plus fréquemment identifiés chez des individus avec TSA et correspondent soit à des duplications interstitielles (Section 3.2), soit dans la plupart des cas à des chromosomes surnuméraires appelés des **chromosomes 15 isodicentriques** [idic(15)] (Figure 15). Ceux-ci sont identifiés par caryotype et formés par la duplication inversée de la région proximale 15q : au total les patients ont donc quatre copies de la région 15q11-q13. Ils sont presque toujours sporadiques et la plupart du temps formés à partir du chromosome 15 maternel. Les chromosomes 15 surnuméraires qui n'incluent pas la région critique des syndromes d'Angelman et Prader-Willi sont bénins ; dans le cas contraire, ils causent l'apparition de phénotypes comprenant des TSA, des déficits cognitifs, une hypotonie, des dysmorphies légères et une épilepsie. Les chromosomes 15 isodicentriques sont très fortement associés aux TSA (92 %, 50/54) (Hogart et coll., 2010). En règle générale, les patients porteurs de [idic(15)] maternels ont des phénotypes plus sévères que ceux présentant des duplications interstitielles, indiquant un effet de l'augmentation du dosage des gènes de l'intervalle 15q11-q13.

La trisomie 21, ainsi que les anomalies du nombre de chromosomes sexuels, comme le syndrome de Turner (45, X), le syndrome de Klinefelter (47, XXY), le syndrome 47,XYY et le syndrome 48,XXYY sont aussi associés à l'autisme (Bishop et coll., 2011 ; Ross et coll., 2012 ; Zafeiriou et coll., 2013).

3.2 Syndromes génétiques

Des syndromes génétiques correspondant à des maladies monogéniques variées ou à des syndromes de microdélétion/microduplication sont diagnostiqués chez de nombreux patients atteints d'autisme (pour revues, voir Betancur, 2011 ; Zafeiriou et coll., 2013) (Figure 14). Les TSA font partie des signes cliniques

principaux typiquement associés à certains d'entre eux, tels que le syndrome de l'X fragile (*FMR1*), le syndrome de Phelan-McDermid (délétion 22q13/mutation du gène *SHANK3*), les duplications interstitielles de la région 15q11-q13, le syndrome de Rett (*MECP2*) et le syndrome de duplication *MECP2*, la sclérose tubéreuse de Bourneville (*TSC1*, *TSC2*), le déficit en adénylosuccinate lyase (*ADSL*), le syndrome de Timothy (*CACNA1C*), le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (*DHCR7*), le syndrome de Smith-Magenis (délétion 17p11.2, mutation *RAI1*), le syndrome de Potocki-Lupski (duplication 17p11.2) et le syndrome de microdélétion 2q23.1 (*MBD5*). Pour d'autres, les TSA sont moins fréquemment associés, illustrant bien l'expressivité variable caractéristique de la plupart de ces pathologies génétiques.

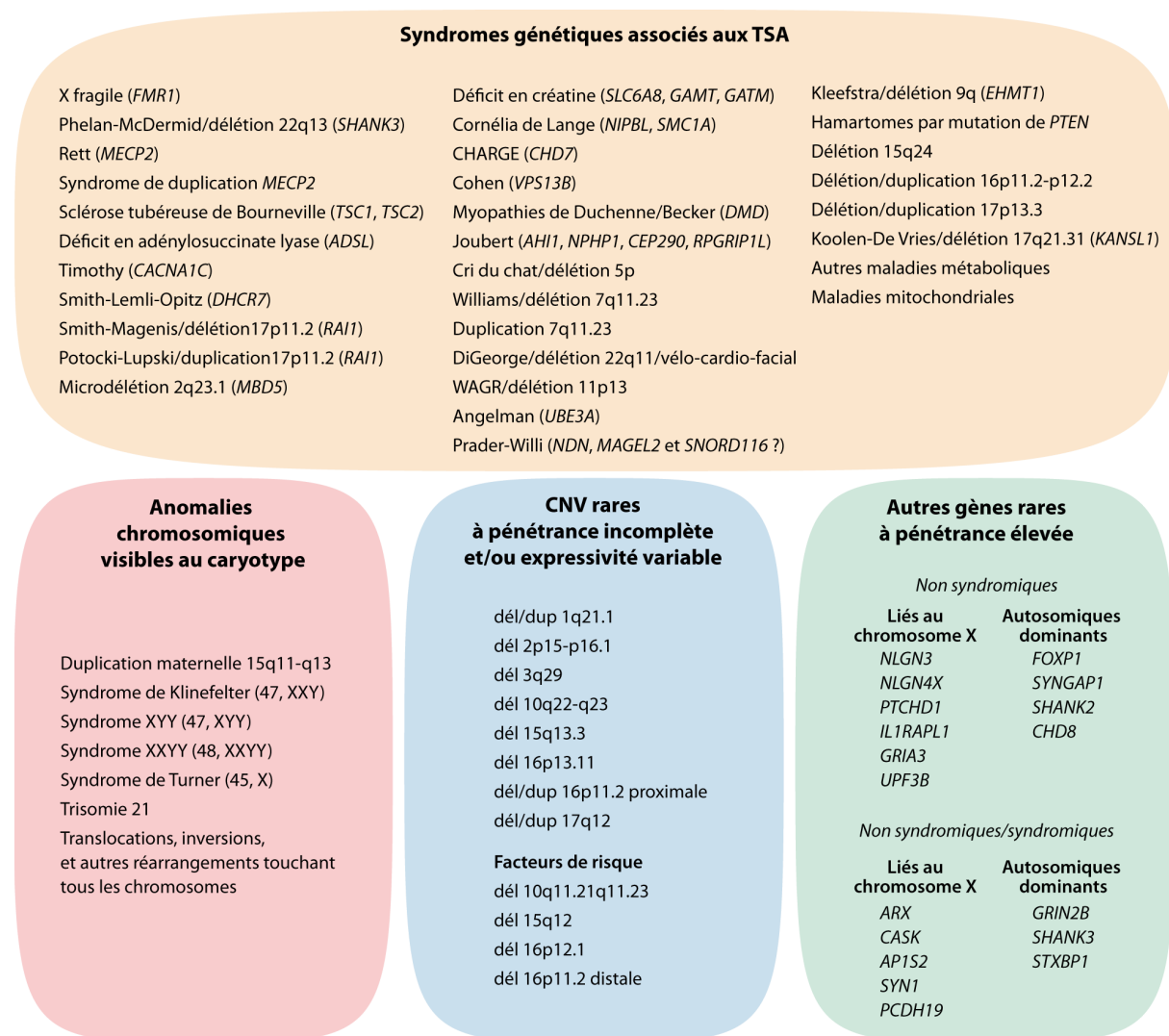


Figure 14. Architecture génétique des TSA.

Les variants génétiques rares associés aux TSA ont été regroupés en quatre catégories avec des exemples représentatifs. Dans leur ensemble, ces causes génétiques rares expliquent la pathologie chez ~25 % des patients.

Tous ces syndromes sont aussi identifiés chez des patients avec déficience intellectuelle. Ainsi, la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle est le syndrome de l'X fragile, avec des mutations de *FMR1* identifiées chez ~2 % des patients (Michelson et coll., 2011), une prévalence identique à celle observée parmi les cas présentant des TSA (Kielinen et coll., 2004). De la même manière, les délétions et mutations du gène *MECP2* associées au syndrome de Rett sont détectées chez 1,5 % des filles avec déficience intellectuelle (Michelson et coll., 2011) et sont aussi une cause relativement fréquente de TSA chez les filles (Carney et coll.,

2003). Les duplications de *MECP2* sont détectées principalement chez les garçons et sont aussi fortement associées aux TSA (76 %, 13/17) et à la déficience intellectuelle (Ramocki et coll., 2010). Plus généralement, la déficience intellectuelle, les TSA et l'épilepsie sont des caractéristiques phénotypiques communes de nombre de ces syndromes, comme le syndrome de Smith-Magenis (Laje et coll., 2010) ou la sclérose tubéreuse de Bourneville (Numis et coll., 2011), démontrant ainsi le chevauchement étiologique de tous ces phénotypes. Dans certains cas plus rares, la schizophrénie peut aussi être l'une des manifestations, comme par exemple pour les délétions 22q11 du syndrome de DiGeorge (ou syndrome vélo-cardio-facial) (Guilmatre et coll., 2009), les duplications interstitielles 15q11-q13 d'origine maternelle (Ingason et coll., 2011) ou des mutations du gène *SHANK3* (Gauthier et coll., 2010).

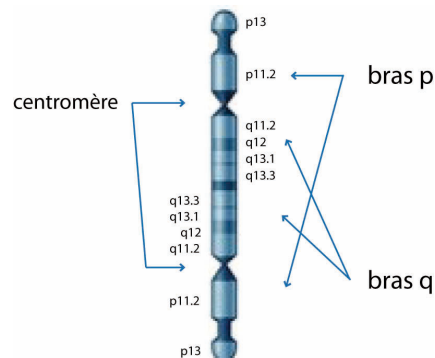


Figure 15. Chromosome 15 isodicentrique.

Les chromosomes 15 isodicentriques, appelés précédemment inv dup (15), sont formés par la duplication inversée de la région proximale 15q. En général ils sont symétriques et ont les mêmes points de cassures (BP4-BP5, voir [Figure 16](#)).

Les réarrangements chromosomiques de la région 15q11-q13 comprennent des duplications (les chromosomes 15 isodicentriques et les duplications interstitielles), les plus fréquentes, ainsi que des délétions (les syndromes d'Angelman et de Prader-Willi), plus rares ([Figure 16](#)).

Les patients ayant des **duplications interstitielles 15q11-q13** présentent un phénotype qui inclut fréquemment les TSA, en plus d'un retard de développement, un retard de langage, différents degrés de déficience intellectuelle, des difficultés de coordination motrice et quelques dysmorphies (Bolton et coll., 2001). Elles sont pour la plupart d'origine maternelle et caractérisées par une pénétrance élevée, avec une forte association avec les TSA (Urraca et coll., 2013). En revanche, les duplications interstitielles du chromosome paternel ne sont pas souvent associées à un phénotype anormal et peuvent être trouvées chez des individus normaux (Veltman et coll., 2005). Néanmoins, plusieurs cas ont été décrits chez des patients présentant un TSA, suggérant une pénétrance réduite par rapport aux duplications d'origine maternelle (Depienne et coll., 2009). Dans certain cas rares il est possible d'observer des triplications interstitielles de l'intervalle 15q11-q13 qui sont apparemment associées à des phénotypes plus sévères et dans certains cas aux TSA, qu'elles soient d'origine maternelle ou paternelle (Hogart et coll., 2010).

La région 15q11-q13 inclut la région critique des syndromes d'Angelman/Prader-Willi ([Figure 16](#)), au niveau de laquelle plusieurs gènes sont soumis à empreinte génétique. Le **syndrome d'Angelman**, dont la prévalence est estimée à 1 pour 12000, est caractérisé par une déficience intellectuelle sévère, des défauts de langage, une ataxie et des comportements typiques incluant des éclats de rires accompagnés de battements des mains ; des TSA ainsi que des crises d'épilepsie sont aussi souvent observés chez ces patients (Hogart et coll., 2010). Ce syndrome est causé par une déficience du gène *UBE3A* (*ubiquitin protein ligase E3*) hérité de la mère, qui peut résulter soit de la délétion 15q11.2-q13 du chromosome maternel dans ~70 % des cas, soit d'une disomie uniparentale paternelle (2-5 %), soit de mutations du gène maternel *UBE3A* (10 %) ou encore de défauts de l'empreinte génétique (10 %) (Zafeiriou et coll., 2013). Bien que le diagnostic soit souvent compliqué par la déficience intellectuelle sévère, environ 50-61 % des patients ayant un syndrome d'Angelman présentent aussi

un autisme typique ou un TSA, avec des déficits sociaux et des troubles de la communication disproportionnés par rapport à leur fonction cognitive globale (Sahoo et coll., 2006 ; Bonati et coll., 2007).

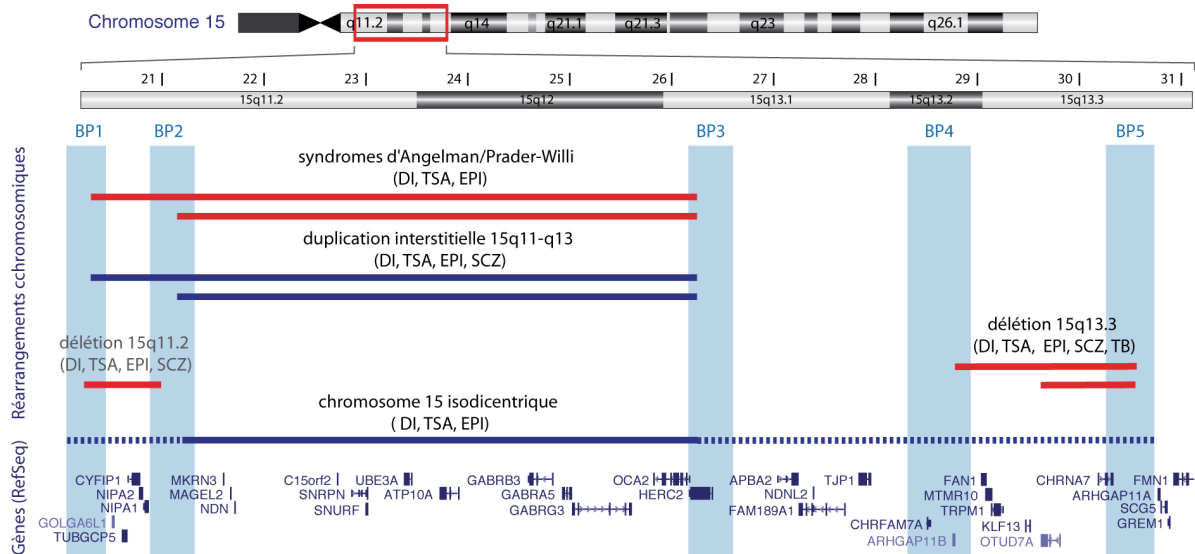


Figure 16. Carte du bras long du chromosome 15 montrant les anomalies identifiées dans la région 15q11-q13.

Les points de cassure (breakpoints, BP) récurrents correspondant aux duplications segmentales sont indiqués en bleu (BP1 à BP5). Les barres horizontales indiquent les régions délétées (rouges) ou dupliquées (bleues) des syndromes d'Angelman/Prader-Willi et du syndrome de duplication 15q11-q13. Les délétions 15q13.3 sont responsables du syndrome de microdélétion 15q13.3 et les délétions 15q11.2 jouent un rôle de facteur de risque dans les TSA (Section 3.3). La signification clinique des duplications 15q11.2 et 15q13.3 est inconnue puisqu'elles sont retrouvées à des fréquences apparemment similaires chez les cas et dans la population générale. Les gènes présents dans la région sont indiqués. Les distances sont en Mb. DI, déficience intellectuelle ; EPI, épilepsie ; SCZ, schizophrénie ; TB, trouble bipolaire.

De nombreux syndromes, très rares, sont aussi associés aux TSA (pour revue, voir Betancur, 2011 ; Zafeiriou et coll., 2013). Certains peuvent être réunis dans des sous-groupes cliniques et étiologiques, par exemple :

- Les **maladies métaboliques génétiques** (ou erreurs innées du métabolisme) sont caractérisées par le dysfonctionnement d'une protéine impliquée dans le métabolisme cellulaire. On peut citer la phénylcétonurie, une maladie récessive causée par des mutations du gène *PAH* codant pour la phénylalanine hydroxylase (Baieli et coll., 2003) ; le syndrome de Smith-Lemli-Opitz causé par des anomalies de la synthèse du cholestérol (*DHCR7*) (Sikora et coll., 2006) et les syndromes de déficit en créatine cérébrale (*SLC6A8*, *GAMT* et *GATM*) (Longo et coll., 2011).
- Les **dystrophies musculaires** sont un groupe de myopathies génétiques héréditaires. Des délétions/duplications du gène *DMD*, localisé sur le chromosome X, sont responsables des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker (Wu et coll., 2005 ; Hinton et coll., 2009). La maladie de Steinert, ayant un mode de transmission autosomique dominant, est provoquée par des mutations dans le gène *DMPK* (Ekstrom et coll., 2008).
- Les **maladies mitochondriales** regroupent un ensemble disparate de maladies liées à des troubles de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elles sont dues à des mutations dans l'ADN mitochondrial ou nucléaire. Le plus souvent ce sont des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire dont la fonction est altérée qui sont à la base de ces pathologies (Haas, 2010).

3.3 CNV rares à expressivité variable et/ou pénétrance incomplète

Avec l'utilisation des puces à ADN, des CNV rares pathogènes ou semblent plutôt jouer un rôle de facteur de risque pour certains, associés à une expressivité variable et/ou une pénétrance incomplète plus ou moins forte, ont été identifiés chez des patients atteints de TSA ainsi que d'autres troubles neurodéveloppementaux. Il s'agit de CNV récurrents, causés par des mécanismes de recombinaison homologue non allélique, qui ont été

caractérisés moléculairement et phénotypiquement pour définir de nouveaux syndromes de microdélétion et microduplication (Figure 14).

Les **CNV rares pathogènes** associés à une expressivité variable et/ou une pénétrance incomplète sont identifiés chez des individus présentant un large spectre de troubles neurodéveloppementaux ou neuropsychiatriques ; c'est le cas des délétions 15q13.3 (Sharp et coll., 2008), des délétions 16p13.11 (Ullmann et coll., 2007) et des délétions/duplications proximales 16p11.2 (Weiss et coll., 2008) pour lesquels les phénotypes associés sont très peu spécifiques (Figure 17). Ceux-ci sont trouvés *de novo* ou hérités de parents apparemment sains ou ayant des troubles neuropsychiatriques et ils sont rarement identifiés chez des individus témoins. Ils sont parfois identifiés chez certains patients présentant des phénotypes sévères, parfois syndromiques, incluant des dysmorphies faciales et des malformations congénitales (Ullmann et coll., 2007 ; Bijlsma et coll., 2009 ; Fernandez et coll., 2010 ; Shinawi et coll., 2010). La signification clinique des duplications en miroir 15q13.3 et 16p13.11 est inconnue, puisqu'elles ont été décrites chez des patients avec différents troubles neurodéveloppementaux mais aussi chez des témoins, avec des études montrant une fréquence identique dans les deux groupes ou bien un très léger enrichissement chez les cas (Ullmann et coll., 2007 ; Guilmatre et coll., 2009 ; van Bon et coll., 2009 ; Moreno-De-Luca et coll., 2013).

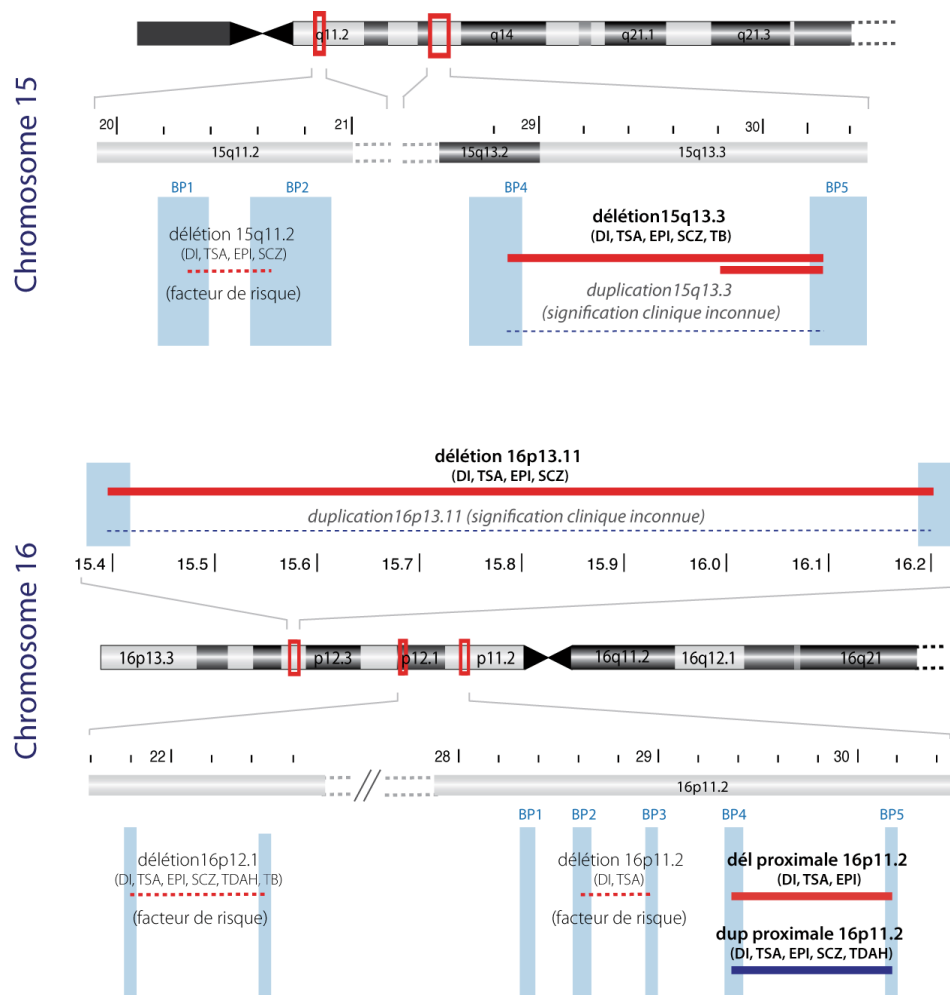


Figure 17. CNV rares à expressivité variable et/ou pénétrance incomplète sur les chromosomes 15 et 16.

Les cartes des chromosome 15 et 16 sont indiquées, avec le détail des régions sujettes à des remaniements ; les barres horizontales indiquent les régions délétées (rouges) ou dupliquées (bleues) ; les points de cassure (*breakpoints*, BP) récurrents sont indiqués en bleu clair. Les CNV clairement pathogènes sont indiqués en noir, ceux considérés comme des facteurs de risque sont indiqués en gris et ceux dont la signification clinique est inconnue sont en gris et italiques ; les phénotypes associés à chaque CNV sont notés entre parenthèses. Les distances sont en Mb. DI, déficience intellectuelle ; EPI, épilepsie ; TDAH, trouble du déficit de l'attention/hyperactivité ; TSA, trouble du spectre autistique ; SCZ, schizophrénie.

D'autres syndromes de microdélétion/microduplication identifiés ces dernières années, caractérisés par une forte variabilité phénotypique et une pénétrance incomplète, semblent jouer un **rôle de facteur de risque**. C'est le cas des délétions 10q11.21q11.23 (Stankiewicz et coll., 2012), des délétions proximales 15q11.2 (BP1-BP2) (Burnside et coll., 2011), des délétions distales 16p11.2 et des microdélétions 16p12.1 (Moreno-De-Luca et coll., 2013) (**Figure 17**) :

- Les délétions et duplications **10q11.21q11.23** ont été récemment reportées chez des patients présentant des phénotypes cliniques variés, avec comme seule caractéristique commune une déficience intellectuelle et un retard de développement (Stankiewicz et coll., 2012) ; elles sont souvent héritées de parents apparemment sains et seules les duplications ont été observées chez des témoins. Un enrichissement significatif des délétions chez les cas a été observé ; cependant, la signification clinique des duplications est inconnue pour le moment.
- Les **délétions proximales 15q11.2** (BP1-BP2) (Doornbos et coll., 2009), adjacentes à la région des syndromes d'Angelman/Prader-Willi et contenant quatre gènes (*NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1* et *TUBGCP5*) ont été décrites chez des patients ayant des TSA. Elles sont enrichies chez les cas avec épilepsie, schizophrénie et d'autres troubles neurodéveloppementaux variés, bien qu'elles soient aussi observées chez des témoins (International Schizophrenia Consortium, 2008 ; Stefansson et coll., 2008 ; de Kovel et coll., 2010). Elles sont aussi trouvées dans des cohortes de patients ayant des malformations cardiaques congénitales (Soemedi et coll., 2012). Les duplications 15q11.2 sont plus fréquentes chez des témoins par rapport aux délétions et ne semblent pas agir comme facteur de risque.
- Les **délétions distales 16p11.2** contenant le gène *SH2B1* sont aussi associées aux TSA comme à l'obésité, la déficience intellectuelle et la schizophrénie (Weiss et coll., 2008 ; Bochukova et coll., 2010 ; Guha et coll., 2013). Leur enrichissement a été démontré dans des cohortes de patients ayant une déficience intellectuelle, un retard de développement ou encore des anomalies congénitales multiples, ainsi que dans des cohortes de patients avec TSA (Moreno-De-Luca et coll., 2013). Encore une fois, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la signification clinique des duplications 16p11.2, dont l'enrichissement chez des cas n'a pas encore été démontré.
- Les **délétions 16p12.1** (modèle *two hit*) ont été associées à de nombreux troubles neurodéveloppementaux, dont la schizophrénie, les TSA et la déficience intellectuelle (International Schizophrenia Consortium, 2008 ; Girirajan et coll., 2010). La plupart d'entre elles sont héritées et on les trouve relativement fréquemment chez des témoins. Toutefois, leur enrichissement a été montré dans la déficience intellectuelle mais pas encore dans les TSA (Moreno-De-Luca et coll., 2013). En revanche, les duplications 16p12.1 ne semblent pas jouer de rôle de facteur de risque.

On voit donc que ces délétions jouant un rôle de facteur de risque sont le plus souvent héritées et trouvées chez des témoins. Leur étude dans des cohortes de très grande taille de patients atteints de déficience intellectuelle et d'autres troubles neurodéveloppementaux a montré leur enrichissement chez les cas par rapport aux témoins. Cependant, sauf dans le cas des délétions 16p11.2 distales (Moreno-De-Luca et coll., 2013), cet enrichissement n'a pas encore été démontré chez des patients avec TSA, probablement à cause de la taille beaucoup plus limitée des échantillons analysés. On peut donc penser que ces délétions agissent en interaction avec d'autres facteurs, encore non identifiés, pour provoquer l'apparition des troubles. Dans tous les cas, les duplications réciproques de ces intervalles, ne semblent pas être associées aux TSA ni à la déficience intellectuelle, puisque leur fréquence est similaire chez les cas et les témoins.

L'ensemble de ces résultats montre la part importante des CNV rares à expressivité variable et/ou pénétrance incomplète dans l'étiologie des TSA et souligne fortement le chevauchement étiologique avec d'autres troubles neurodéveloppementaux, principalement la déficience intellectuelle, l'épilepsie ou encore la schizophrénie.

3.4 Autres gènes rares à pénétrance élevée non syndromiques

Au moins 137 gènes ont été impliqués à ce jour dans les TSA (pour revue, voir Betancur, 2011) (Figure 13). La totalité de ces gènes sont aussi impliqués dans la déficience intellectuelle, indiquant clairement des bases génétiques communes entre les deux pathologies et nombre d'entre eux sont aussi associés à l'épilepsie et plus rarement à la schizophrénie. Sur le chromosome X, au moins 90 gènes sont impliqués dans la déficience intellectuelle, dont 43 ont aussi été associés aux TSA, et témoignent du profond chevauchement étiologique à la base de ces phénotypes (Figure 18). Parmi tous les gènes impliqués dans les TSA, la grande majorité est responsable de syndromes génétiques et maladies monogéniques (Section 3.2). Pour les autres, des mutations rares à pénétrance élevée, ont été trouvées chez des patients présentant des formes non syndromiques de TSA et/ou de déficience intellectuelle (Figure 14).

De façon intéressante, plusieurs gènes codant des **molécules d'adhésion cellulaire synaptiques** (*synaptic cell adhesion molecule*, CAM) ont été impliqués dans les TSA, révélant ainsi une nouvelle voie biologique dans la physiopathologie de l'autisme. Les neuroligines sont des CAM ayant un rôle important dans la formation, le maintien et la fonction des synapses excitatrices et inhibitrices (pour revue, voir Betancur et coll., 2009). Cinq gènes codent des neuroligines chez l'homme, dont deux sont situés sur le chromosome X (*NLGN3* et *NLGN4X*) et un sur le chromosome Y (*NLGN4Y*). Une recherche de mutations sur les gènes du chromosome X codant des neuroligines chez 158 familles avec TSA a identifié une mutation de décalage de lecture dans *NLGN4X* et une mutation faux sens dans *NLGN3* au sein de deux familles ayant chacune deux frères atteints, l'un d'autisme et l'autre d'un syndrome d'Asperger (Jamain et coll., 2003), impliquant ces deux gènes pour la première fois dans l'étiologie des TSA. Ensuite, une mutation non-sens dans *NLGN4X* a été identifiée dans une famille multigénérationnelle avec treize individus de sexe masculin présentant soit une déficience intellectuelle (n=10), soit une déficience intellectuelle et des TSA (n=2) ou encore des TSA sans déficience intellectuelle (n=1) (Laumonnier et coll., 2004). Ces mutations sont très rares puisqu'elles n'ont pas été retrouvées dans plusieurs cohortes de patients avec des TSA (Vincent et coll., 2004 ; Gauthier et coll., 2005 ; Ylisaukko-oja et coll., 2005 ; Blasi et coll., 2006 ; Wermter et coll., 2008). D'ailleurs, dans le cas du gène *NLGN3*, aucune autre mutation n'a été identifiée chez d'autres patients. Pour *NLGN4X*, plusieurs mutations faux sens ont été décrites (Yan et coll., 2005 ; Zhang et coll., 2009), ainsi que des délétions associées aux TSA et à un large spectre de troubles neuropsychiatriques, incluant le syndrome de Tourette, le TDAH, des défauts d'apprentissage ou encore des troubles de l'anxiété (Chocholska et coll., 2006 ; Macarov et coll., 2007 ; Kent et coll., 2008 ; Lawson-Yuen et coll., 2008 ; Marshall et coll., 2008). Cependant, dans quelques cas rares, les délétions de *NLGN4X* ne semblent pas associées à un phénotype anormal chez des individus de sexe masculin (Macarov et coll., 2007 ; Mochel et coll., 2008). Dans l'ensemble, bien que les mutations des gènes *NLGN3* et *NLGN4X* ne soient pas des causes fréquentes de TSA, elles peuvent expliquer l'apparition des TSA dans de très rares cas, avec ou sans déficience intellectuelle.

Le gène *SHANK3*, qui code une protéine membre de la famille des protéines d'échafaudage SHANK, a été identifié comme le gène causal du syndrome de délétion 22q13 (syndrome de Phelan-McDermid) (Durand et coll., 2007), caractérisé par un retard de développement, une hypotonie, un retard sévère ou une absence de langage, des troubles autistiques et quelques dysmorphies (Phelan et McDermid, 2012). Depuis, des mutations et des délétions de *SHANK3* ont été identifiées chez des patients avec autisme, déficience intellectuelle ou schizophrénie (Durand et coll., 2007 ; Moessner et coll., 2007 ; Gauthier et coll., 2009 ; Guilmatre et coll., 2009 ; Gauthier et coll., 2010 ; Hamdan et coll., 2011 ; Gong et coll., 2012).

Deux autres gènes codent des protéines SHANK chez l'homme, *SHANK1* et *SHANK2*. Les méthodes de détection des CNV alliées à des méthodes de séquençage ont permis d'identifier des délétions *de novo* (Berkel et coll., 2010 ; Pinto et coll., 2010), ainsi qu'une mutation *de novo* non-sens de *SHANK2* (Berkel et coll., 2010) chez des patients avec TSA et déficience intellectuelle non syndromique. Comparé à *SHANK3*, le nombre de cas avec des mutations du gène *SHANK2* est faible mais convaincant. En revanche, bien que deux délétions du gène

SHANK1 aient été identifiées dans deux familles à cas multiples atteints de TSA, chacune d'elles étant héritée d'un parent sain et ne ségrégeant pas avec le phénotype (Sato et coll., 2012), les preuves sont encore insuffisantes pour impliquer ce gène dans les TSA.

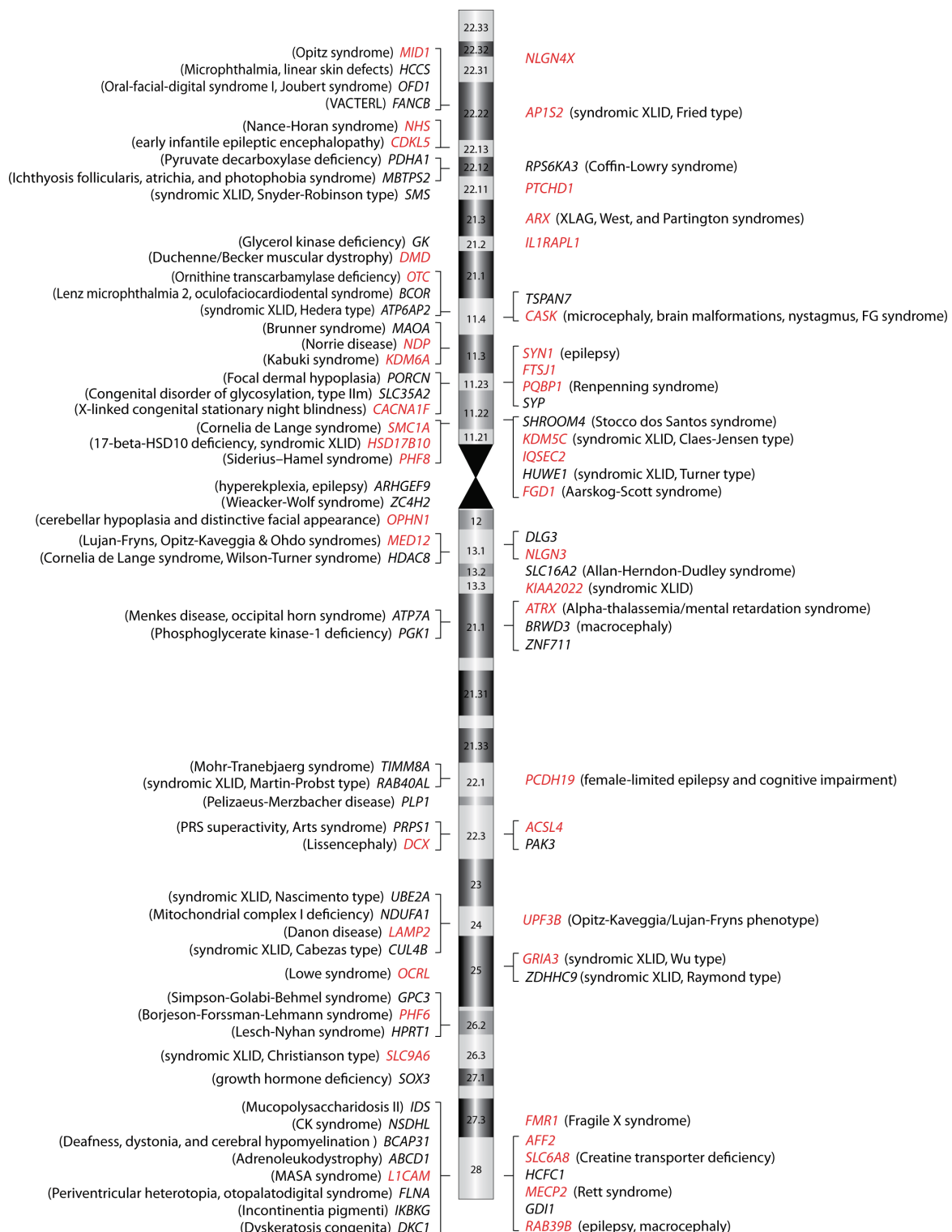


Figure 18. Gènes impliqués dans la déficience intellectuelle liée au chromosome X.

Les gènes dont des mutations ont été identifiées chez des patients avec TSA sont indiqués en rouge. Ceux qui causent des formes syndromiques sont à gauche et ceux qui causent des formes non syndromiques sont à droite ; cependant pour plusieurs gènes de droite, des mutations ont aussi été rapportées dans des familles avec déficience intellectuelle liée à l'X syndromique ; les phénotypes sont indiqués entre parenthèses (version mise à jour d'une figure publiée dans Betancur, 2011).

Tous ces gènes expliquent individuellement une très mince proportion des patients mais leur nombre ne cesse de croître et leur identification permet de cibler des voies biologiques potentiellement impliquées dans la physiopathologie des TSA.

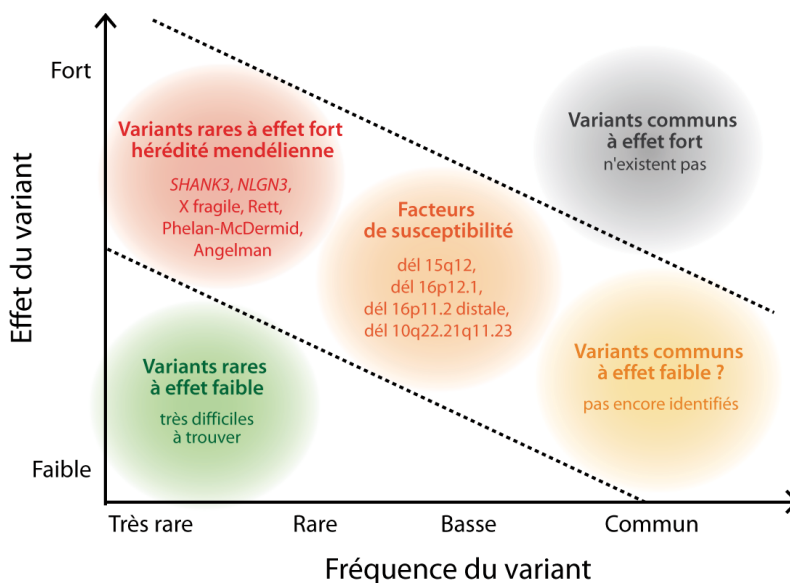


Figure 19. Etiologie génétique des TSA.

Aujourd'hui les causes génétiques connues de TSA sont en grande majorité des variants rares à effet fort, transmis selon différents modes d'hérédité mendélienne ainsi que quelques CNV à pénétrance variable ayant un rôle de facteurs de risque. On sait que les variants communs à effet fort n'existent pas (exclus par les études d'association pangénomiques) et que les variants rares à effet faible, s'ils existent, seront très difficiles à trouver. Aucun variant commun à effet faible n'a été identifié à ce jour (figure adaptée de Manolio et coll., 2009).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre : i) la forte association des variants rares avec les TSA (**Figure 19**) ; ii) l'importante contribution des variants *de novo* ; iii) le rôle non négligeable des variants rares hérités, associés à des formes autosomiques récessives, liées au chromosome X ou autosomiques dominantes avec pénétrance incomplète et/ou expressivité variable ; iv) l'extrême hétérogénéité étiologique associée aux TSA, avec des causes génétiques hétérogènes impliquant des centaines de gènes et loci ; v) les bases génétiques communes entre les TSA et la déficience intellectuelle, l'épilepsie et parfois même la schizophrénie, le TDAH et les troubles bipolaires. L'autisme, comme la déficience intellectuelle, est donc caractérisé par un modèle génétique multiforme dans lequel des centaines de gènes sont impliqués. Les résultats font clairement apparaître les TSA comme un syndrome défini comportementalement avec une grande variabilité phénotypique représentant le point commun de nombreuses maladies génétiques neurodéveloppementales. Le chevauchement étiologique de ces nombreux troubles neurodéveloppementaux suggère fortement qu'ils partagent des mécanismes physiopathologiques communs à identifier. Bien que beaucoup ait été accompli dans notre connaissance des causes impliquées dans la vulnérabilité génétique des TSA, il reste énormément à découvrir ; l'étude d'un nombre très important de cas et de témoins alliés à des études fonctionnelles permettra d'assigner un rôle pathogène à un grand nombre des variants candidats identifiés.

Malgré la variabilité phénotypique observée parmi les patients atteints de TSA, il existe tout de même des caractéristiques cliniques communes chez les patients, il est donc concevable qu'il y ait des mécanismes biologiques partagés, bien que les causes génétiques soient fortement hétérogènes. Le défi consiste donc aujourd'hui à élargir les perspectives, de l'identification des variants rares vers une interprétation plus fonctionnelle des résultats. Pour ce faire, l'analyse des gènes identifiés par les études des CNV et de séquençage de l'exome dans des **réseaux fonctionnels** a permis de dévoiler des groupes de gènes hautement connectés, puis de les relier à des voies ou des fonctions biologiques et des compartiments cellulaires (Pinto et coll., 2010 ; Gilman et coll., 2011 ; Neale et coll., 2012 ; O'Roak et coll., 2012b). A plusieurs reprises, les gènes

codant des molécules d'adhésion cellulaire synaptiques, impliquées dans la formation et la maturation des synapses, ont été identifiés comme des acteurs principaux d'un réseau fonctionnel hautement connecté. Des groupes de gènes impliqués dans la prolifération et la motilité cellulaire, ou encore dans le remodelage de la chromatine et les processus d'ubiquitinylation ont aussi été isolés (Pinto et coll., 2010 ; O'Roak et coll., 2012b). D'autres gènes fonctionnellement reliés codent des protéines de voies de signalisation cellulaires, comme les voies des protéines Wnt, la voie mTOR ou encore celle des Rho GTPases. Ces voies biologiques, avec d'autres identifiées, convergent vers des fonctions liées à la formation du réseau de filament d'actine, essentiel pour le remodelage structurel des épines dendritiques et leur morphogénèse (Gilman et coll., 2011).

Une autre approche consiste à analyser le **transcriptome**, c'est-à-dire l'expression du génome entier chez des patients par rapport aux témoins. Les études du transcriptome sont une manière de mesurer la validité fonctionnelle des facteurs génétiques précédemment associés aux TSA. Malheureusement, elles sont confrontées à plusieurs limitations (Voineagu, 2012). L'accès aux tissus cérébraux nécessaires à l'analyse est souvent un facteur limitant et la majorité des études a donc été réalisée à partir de cultures de lymphoblastes ou d'échantillons sanguins. Pourtant, l'expression des gènes est souvent spécifique d'un tissu donné et seuls 60 % des gènes qui sont exprimés dans le cerveau le sont aussi dans les lymphocytes. Une étude récente a fourni des données du transcriptome à partir de tissus cérébraux, en recherchant des réseaux de gènes co-exprimés dans différentes régions du cerveau (Voineagu et coll., 2011). Les résultats montrent que, dans le cortex, ~400 gènes ont des niveaux d'expression différents chez les individus atteints de TSA par rapport aux témoins, contre seulement deux gènes dans le cervelet, indiquant que les changements d'expression associés aux TSA sont plus prononcés dans le cortex cérébral. Dans cette région, les différences d'expression observées entre le cortex frontal et le cortex temporal dans un cerveau normal (~500 gènes ayant des niveaux d'expression différents dans ces deux régions) sont fortement atténuées chez les patients (seulement 8 gènes ayant des niveaux d'expression différents dans les deux régions corticales) (Voineagu et coll., 2011). Ces résultats suggèrent que les motifs d'expression de gènes qui distinguent normalement les différentes régions corticales seraient altérés dans le cerveau des patients.

La dernière étape nécessite de trouver comment relier notre connaissance moléculaire et cellulaire des TSA à des circuits cérébraux particulièrement complexes chez l'homme. Quelles que soient les fonctions biologiques des gènes impliqués dans l'autisme, ils doivent converger vers des régions cérébrales ou des circuits impliqués dans le langage, la cognition sociale et la flexibilité comportementale (Geschwind, 2008). Le défi consiste à intégrer l'ensemble de ces résultats dans des études d'anatomie cérébrale pour faire le lien entre gènes et cognition.

Par l'identification de gènes impliqués dans les TSA, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents et des différentes étapes allant du gène jusqu'au phénotype est envisageable, avec pour objectif la mise au point de traitements. Chaque nouveau gène impliqué est une cible potentielle pour le développement de pharmacothérapies. L'application des résultats de la recherche dans la pratique clinique permet d'améliorer le diagnostic et de détecter plus précocement les TSA afin de fournir une meilleure prise en charge des patients et de leur famille, avec pour but ultime l'identification de traitements adaptés.

Partie III – Implication de la neurotransmission inhibitrice dans l'autisme

1. GABA et glycine

1.1 Mode d'action

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine sont les deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs du système nerveux central. Traditionnellement, on considère que le GABA est plus important dans le cerveau, alors que la glycine aurait un rôle prépondérant dans la moelle épinière et le tronc cérébral (pour revue, voir Legendre, 2001). Le GABA est une monoamine synthétisée à partir du glutamate (ou acide glutamique) par une enzyme, la glutamate décarboxylase (*glutamic acid decarboxylase*, GAD). Une deuxième voie de biosynthèse du GABA existe aussi à partir du métabolisme de la putrescine. De son côté, la glycine est un acide aminé pouvant être produit à partir de la sérine, de la thréonine ou encore du glyoxylate. La glycine est le principal ligand des récepteurs de glycine et est aussi connue pour son rôle en tant que co-agoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Outre la glycine et le GABA, la taurine, qui est issue de la décarboxylation de la cystéine, a un rôle de transmetteur inhibiteur dans le système nerveux central (pour revue, voir Le Corronc et coll., 2011). Les récepteurs glycinergiques (GlyR) et GABAergiques (GABA_AR et GABA_CR) appartiennent à la famille des canaux ioniques chimio-dépendants (Section 1.2). Ils sont sélectivement perméables aux ions chlorure (Figure 20). La taurine, structurellement similaire aux deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs, peut aussi se lier aux GlyR et GABA_AR, bien qu'elle présente une faible affinité pour ces récepteurs.

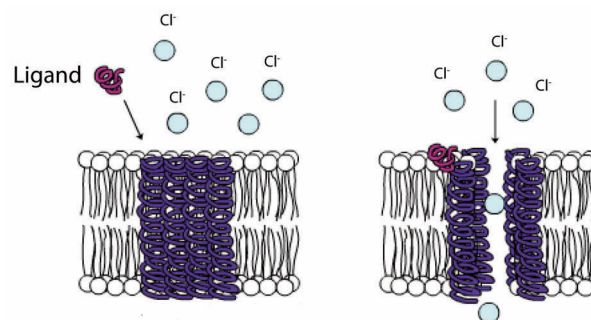


Figure 20. Canal ionique chimio-dépendant.

Le canal ionique transmembranaire s'ouvre pour laisser passer des ions (Cl^- , Na^+ , K^+ ou Ca^{2+}) en réponse à la liaison d'un messenger chimique, le ligand.

De façon intéressante, le GABA et la glycine (ainsi que la taurine) ont une action excitatrice au cours du développement embryonnaire, puis inhibitrice dans les neurones adultes. En effet, la liaison du neurotransmetteur déclenche des changements conformationnels des récepteurs pour laisser passer les ions chlorure selon un flux entrant ou sortant en fonction du potentiel d'équilibre de chlorure de la cellule (E_{Cl}). Dans les neurones adultes, le niveau de chlorure intracellulaire $[\text{Cl}_i]$ est relativement bas ; dans ce cas, le E_{Cl} est négatif et l'ouverture du canal ionique entraîne une entrée de chlorure et donc une hyperpolarisation (Figure 21). En revanche, dans les neurones immatures, le $[\text{Cl}_i]$ est élevé donc le E_{Cl} est positif et l'ouverture du canal ionique entraîne une sortie de chlorure et une dépolarisation. Sachant que la probabilité de générer un potentiel d'action est augmentée par une dépolarisation et diminuée par une hyperpolarisation, les faibles concentrations intracellulaires de chlorure dans les neurones adultes induisent une inhibition alors que les $[\text{Cl}_i]$ élevées des neurones immatures provoquent une excitation (pour revue, voir Ben-Ari et coll., 2012). Les courants chlorure dépolarisants peuvent générer des potentiels d'action et exciter les neurones immatures de

façon directe ou bien par l'activation d'autres canaux voltage-dépendants, ce qui provoque des mouvements d'ions Na^+ et Ca^{2+} .

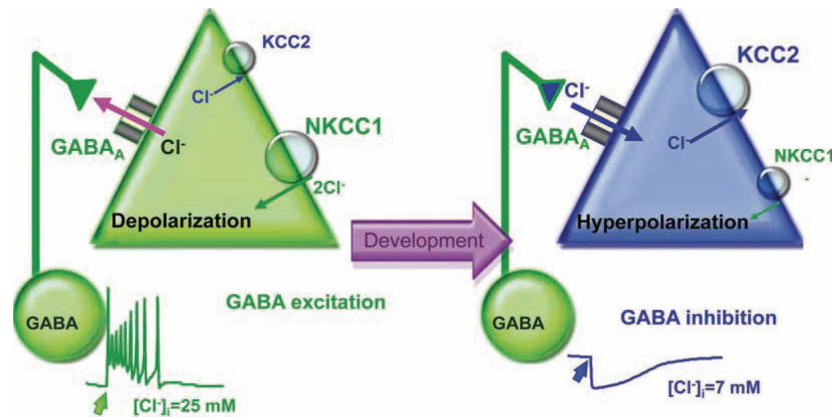


Figure 21. Changement d'action du GABA au cours du développement.

Le changement d'action du GABA est déterminé par l'expression des deux co-transporteurs d'ions chlorure, NKCC1 et KCC2. NKCC1 qui importe les ions Cl^- dans la cellule est déjà présent *in utero*. KCC2 qui exporte les ions Cl^- est actif plus tardivement, dans les neurones matures. La concentration de Cl^- intracellulaire est donc élevée dans les neurones immatures et basse dans les neurones adultes (figure tirée de Ben-Ari et coll., 2012).

Le changement d'action du GABA et de la glycine au cours du développement se fait grâce à l'action des co-transporteurs cation-chlorure (CCC). Ce sont des protéines membranaires transportant le Cl^- avec les ions Na^+ et/ou K^+ . Ils ont une action électroneutre et ils sont les principaux régulateurs de la $[\text{Cl}]_i$ neuronale. Les co-transporteurs Na-(K)-Cl utilisent le courant Na^+ pour permettre une entrée de Cl^- dans la cellule. Les co-transporteurs K-Cl utilisent les ions K^+ pour permettent une sortie de Cl^- et donc une réduction du potentiel d'équilibre. Dans les neurones, NKCC1 et KCC2 sont les deux principaux importateurs et exportateurs de Cl^- . L'activité de NKCC1 est forte au cours de la vie embryonnaire et de la vie postnatale précoce alors que durant cette période le gène *KCC2* est très peu exprimé. C'est pourquoi le niveau de Cl^- est élevé dans les neurones immatures, entraînant une sortie de Cl^- à l'ouverture des récepteurs de GABA et glycine et donc une dépolarisation. En revanche, vers la fin de la vie embryonnaire chez la souris (Bortone et Polleux, 2009) et au cours des premières semaines de vie post-natale chez le rat et l'homme (Ben-Ari et coll., 2012), une forte augmentation de l'expression de KCC2 est observée. L'action de KCC2 induit alors le changement du potentiel d'équilibre et donc une hyperpolarisation à l'ouverture des récepteurs de GABA et de glycine. Même si l'on sait que l'activité des KCC et NKCC peut être modulée par divers mécanismes, par exemple des phosphorylations, les facteurs qui régulent l'expression de *KCC2* sont encore inconnus (Bortone et Polleux, 2009).

1.2. Récepteurs glycinergiques et GABAergiques

1.2.1 Récepteurs glycinergiques

Les récepteurs glycinergiques (GlyR) appartiennent à la famille des récepteurs de canaux ioniques pentamériques (ou *Cys-loop*). Ils sont formés par différentes sous-unités, $\alpha 1$ à $\alpha 4$ et β , codées par les gènes *GLRA1* à *GLRA4* et *GLRB*. Toutefois, chez l'homme, le gène *GLRA4* étant un pseudogène, seules trois sous-unités α sont exprimées (Simon et coll., 2004). Les sous-unités α partagent plus de 80 % d'homologie de séquence ; elles possèdent un grand domaine extracellulaire qui porte les sites de liaison du ligand, quatre domaines transmembranaires (TM1-4) et un grand domaine intracellulaire situé entre TM3 et TM4 (pour revue, voir Lynch, 2009). La sous-unité β , qui a pourtant moins de 50 % d'identité de séquence avec les sous-unités α , possède le même nombre de domaines transmembranaires ; sa boucle intracellulaire entre les TM3 et TM4 permet la liaison avec des protéines cytoplasmiques. Les GlyR peuvent être homomériques 5α ou hétéromériques avec une stœchiométrie $2\alpha:3\beta$ (Grudzinska et coll., 2005). Les cinq sous-unités sont arrangées

de façon symétrique pour former un anneau autour du pore central (Figure 22). Les analyses de structure et la comparaison avec d'autres récepteurs pentamériques suggèrent que le pore conduisant les ions Cl⁻ serait localisé au niveau du TM2 (Miyazawa et coll., 2003 ; Hilf et Dutzler, 2008). Le site de liaison du ligand est quant à lui situé à l'extérieur de la structure, à l'interface des différentes sous-unités.

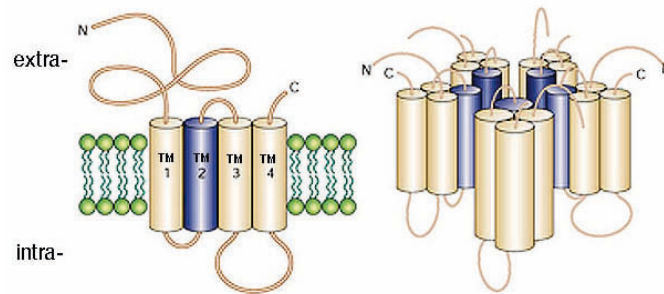


Figure 22. Structure d'une sous-unité du récepteur de glycine et organisation du récepteur pentamérique.

Chaque sous-unité est constituée d'un grand domaine extracellulaire, quatre domaines transmembranaires (TM1-4) et un domaine intracellulaire entre TM3 et TM4. Le récepteur est formé de cinq sous-unités ; TM2 forme le pore qui conduit les ions Cl⁻ (figure tirée de Haverkamp, 2012).

Les sous-unités β , qui ne peuvent pas former à elles seules des récepteurs fonctionnels, se lient avec une haute affinité à la géphyrine (Fritschy et coll., 2008), une protéine d'échafaudage post-synaptique qui permet aux GlyR de s'accumuler à la synapse (Figure 23) ; ces sous-unités ont donc un rôle essentiel dans le trafic intracellulaire et le regroupement synaptique des GlyR. Cependant, les sous-unités β possèdent plus qu'un simple rôle d'unité structurelle puisqu'elles contribuent aussi à la liaison de l'agoniste (Grudzinska et coll., 2005). Les formes homomériques 5α ne possédant pas la sous-unité β ne peuvent pas lier la géphyrine ; elles peuvent diffuser librement dans la membrane plasmique et sont trouvées à des sites extra-synaptiques. Les propriétés pharmacologiques et biophysiques des GlyR dépendent de leur composition en sous-unités et de leur stœchiométrie (Legendre, 2001). Par exemple, les récepteurs homomériques $\alpha 1$ ont une conductance plus faible que les $\alpha 2$ ou $\alpha 3$, due à une substitution d'un acide aminé dans le domaine TM2. Comme cité précédemment, la glycine et la taurine, mais aussi la β -alanine, sont les ligands des récepteurs de glycine. La strychnine, au contraire, est un antagoniste des récepteurs de glycine, dont l'affinité varie en fonction de la combinaison des sous-unités (Grudzinska et coll., 2005).

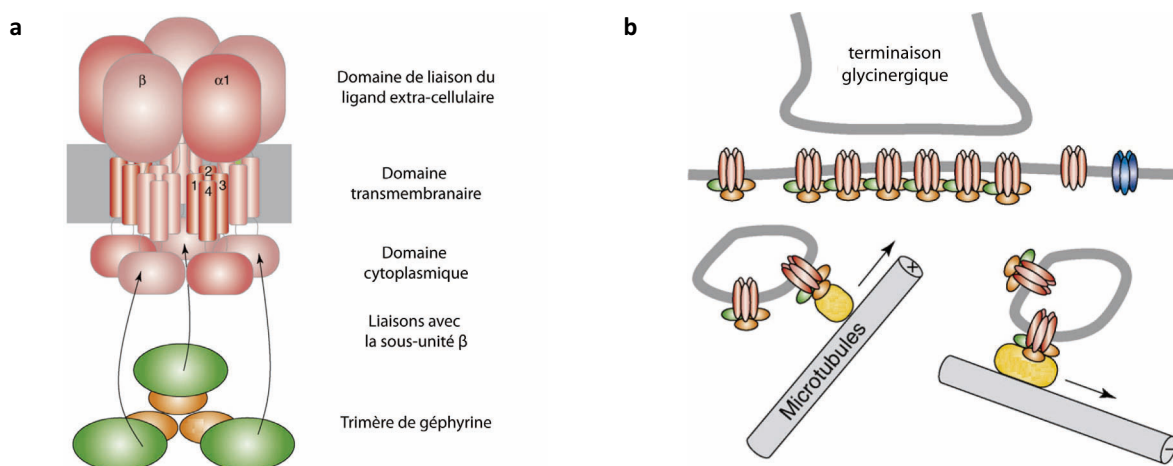


Figure 23. Récepteur de glycine hétéromérique et liaison avec la géphyrine.

a, Un récepteur de glycine pentamérique est représenté avec ses trois domaines fonctionnels, un domaine extracellulaire, un transmembranaire et un domaine cytoplasmique ; les interactions avec un trimère de géphyrine sont indiquées. **b**, Le transport de GlyR $2\alpha:3\beta$ et leur regroupement à la synapse se fait par leur interaction avec les trimères de géphyrine. Les GlyR se lient aux trimères de géphyrine au niveau des synapses ou dans des complexes avec des protéines de transport le long des microtubules (figure adaptée de Fritschy et coll., 2008).

L'expression des sous-unités des GlyR est finement régulée au cours du développement. En effet, la conversion de ces récepteurs d'une fonction excitatrice en inhibitrice est accompagnée de changements dans leur composition en différentes sous-unités. Plusieurs études d'expression, au niveau transcriptionnel et/ou protéique, ont d'abord été réalisées chez le rat (Malosio et coll., 1991 ; Sato et coll., 1992 ; Becker et coll., 1993 ; Watanabe et Akagi, 1995 ; Okabe et coll., 2004 ; Garcia-Alcocer et coll., 2008). Certaines analyses ont aussi été réalisées chez la souris et l'homme (Sergeeva et Haas, 2001 ; Baer et coll., 2009), démontrant une expression globalement similaire des différentes sous-unités malgré quelques différences, en particulier concernant *Glr4*, qui code la sous-unité $\alpha 4$ et qui est exprimé chez la souris et le rat mais non retrouvé chez l'homme. Aujourd'hui, des bases de données d'expression de gènes chez la souris et l'homme apportent des informations précises et complètes à différents stades de développement et dans toutes les régions du cerveau (Allen Brain Atlas, <http://www.brain-map.org/> et Human Brain Transcriptome, <http://www.human-braintranscriptome.org/>).

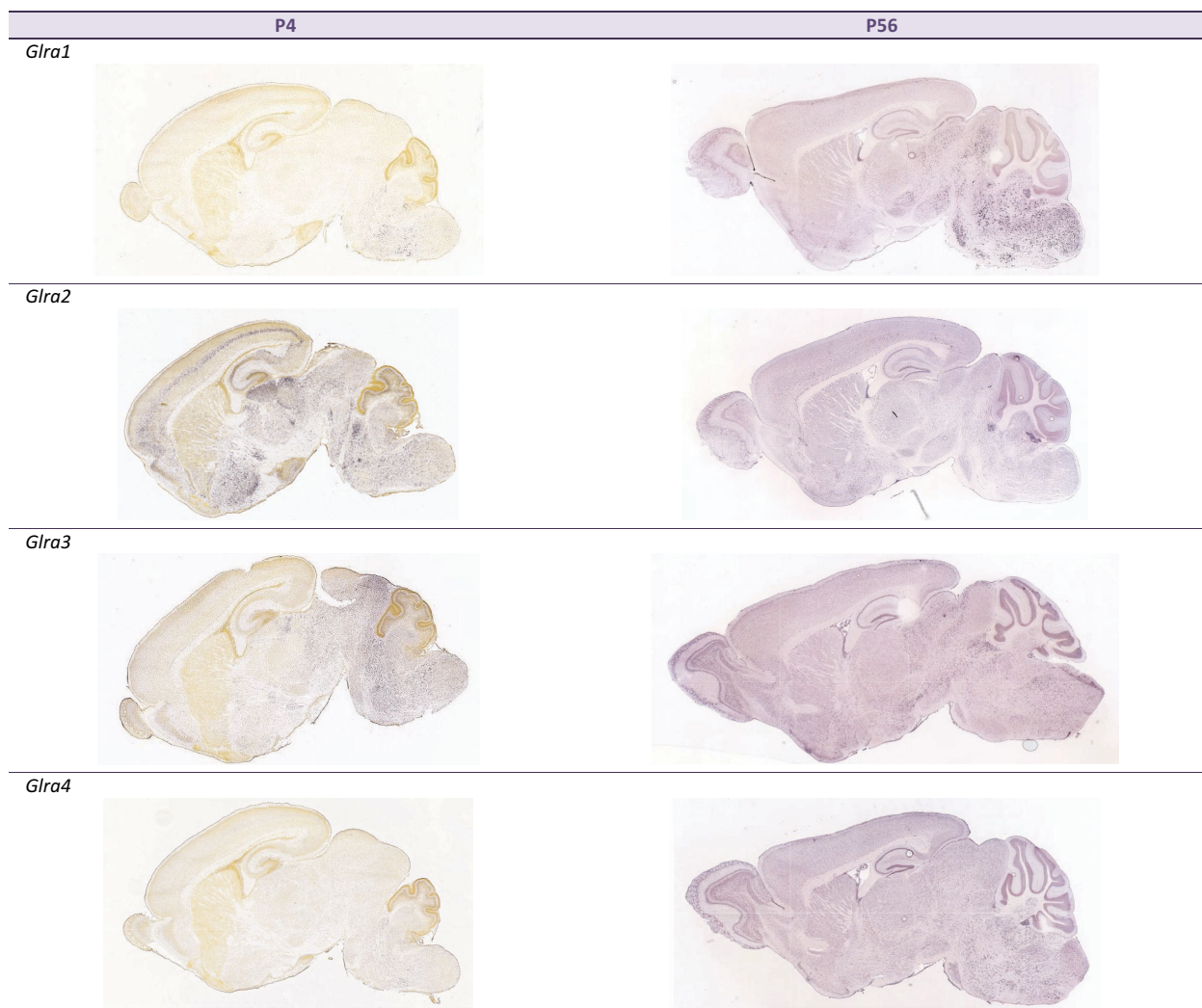


Figure 24. Expression de *Glr1*, *Glr2*, *Glr3* et *Glr4* dans le cerveau de souris.

Hybridation *in situ*, quatre jours après la naissance (P4, à gauche) et à deux mois (P56, à droite) (Allen Brain Atlas, <http://www.brain-map.org/>).

L'ensemble de ces résultats permet de délimiter les profils d'expression des différentes sous-unités des récepteurs de glycine :

- La **sous-unité $\alpha 1$** est très peu exprimée au cours du développement (**Figure 24**), stade auquel on la détecte principalement dans la moelle épinière, où son expression ne cesse d'augmenter. En revanche, chez

l'adulte, on la trouve abondamment dans la moelle épinière (Figure 25) et plus faiblement dans quelques régions du cerveau comme le thalamus, l'hypothalamus ainsi que plusieurs noyaux du tronc cérébral.

- Au contraire, la **sous-unité $\alpha 2$** prédomine largement dans tout le système nerveux central au cours du développement embryonnaire et de la vie post-natale précoce, puis son expression diminue. Plus précisément $\alpha 2$ est détectée au cours du développement à la fois dans le télencéphale, le diencéphale et le mésencéphale chez l'homme et le rongeur (Figures 24 et 25) ; son expression est forte dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus, l'amygdale et la moelle épinière en formation, contrairement à toutes les autres sous-unités α qui ne sont pas ou peu exprimées dans le système nerveux central immature. Chez l'adulte, $\alpha 2$ est détectée à des niveaux plus faibles dans le cortex cérébral, l'hippocampe, certains noyaux thalamiques et encore plus faiblement dans le raphé dorsal et la moelle épinière.

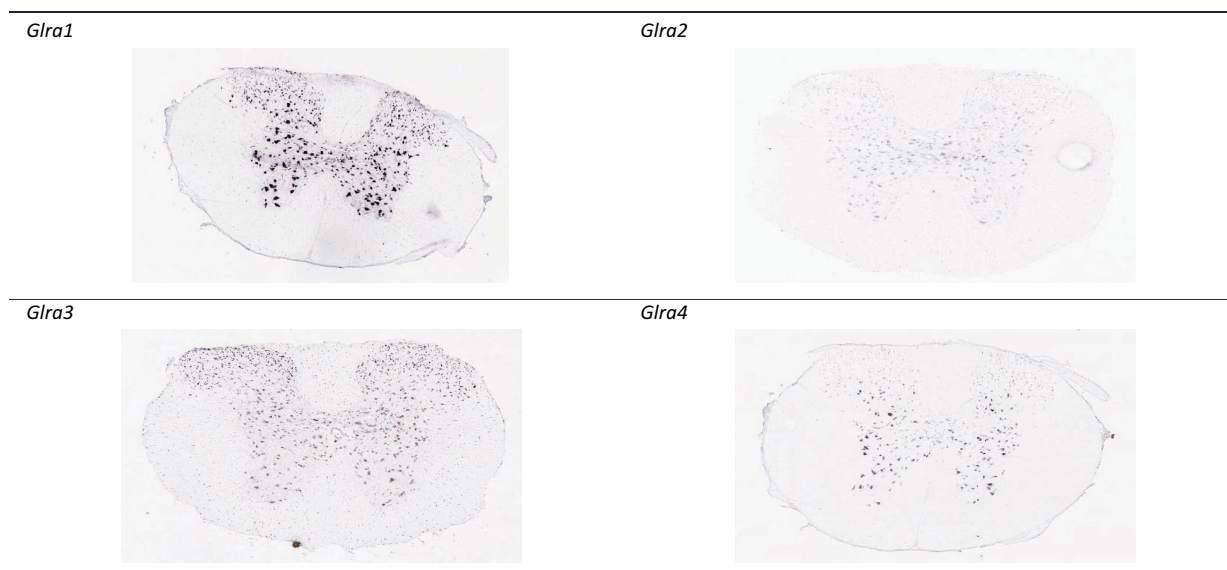


Figure 25. Expression de *Glra1*, *Glra2*, *Glra3* et *Glra4* dans la moelle épinière de souris, par hybridation *in situ*, à deux mois (P56). (Allen Brain Atlas, <http://www.brain-map.org/>)

- L'expression de la **sous-unité $\alpha 3$** est faible au tout début du développement, puis elle augmente progressivement jusqu'à la naissance. On la trouve dans le thalamus, l'amygdale, l'hippocampe, le striatum et le tronc cérébral (Figure 24). Chez l'adulte, elle est la seule à être détectée dans le bulbe olfactif et le cervelet à des niveaux élevés ; elle est faiblement exprimée dans le cortex cérébral, l'amygdale, l'hippocampe et l'hypothalamus.

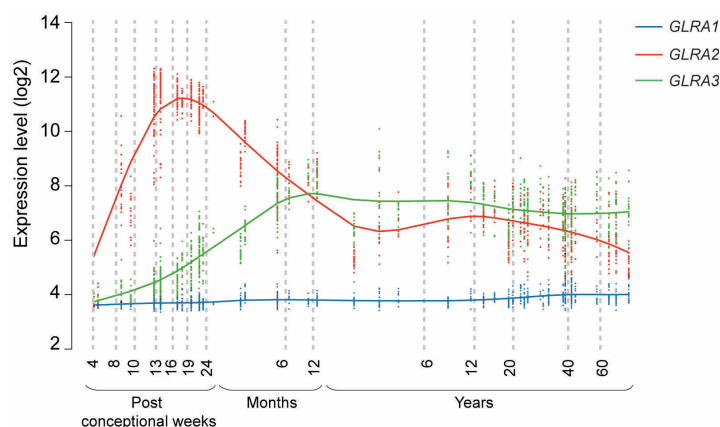


Figure 26. Expression des différentes sous-unités α des récepteurs de glycine dans le néocortex au cours du développement et de la vie adulte chez l'homme.

(Human Brain Transcriptome, www.humanbraintranscriptome.org/)

- La **sous-unité $\alpha 4$** des GlyR a été clonée chez la souris quelques années après les autres sous-unités α et la sous-unité β des GlyR et depuis, elle a été assez peu étudiée (Matzenbach et coll., 1994). Selon Allen Brain Atlas, elle est très faiblement détectable dans certains noyaux du tronc cérébral, à partir de 18 jours de développement embryonnaire puis au cours de la vie post-natale chez la souris ; on la trouve aussi dans la moelle épinière chez l'adulte (Allen Brain Atlas) et dans la rétine (Heinze et coll., 2007). Comme mentionné précédemment, *GLRA4* est un pseudogène chez l'homme.
- Curieusement, les transcrits codant la **sous-unité β** sont bien plus exprimés que ceux correspondant aux sous-unités α , tout au long du développement embryonnaire et de la vie post-natale et dans des régions du cerveau ne possédant même pas de GlyR fonctionnels (Legendre, 2001). Il a d'abord été proposé que la sous-unité β serait capable de se lier à des sous-unités α autres que celles des GlyR, mais aucune preuve de cette interaction potentielle n'a été apportée. Il semble en réalité qu'il existe des mécanismes de régulation post-transcriptionnels puisque la protéine β a un profil d'expression spatialement restreint par rapport aux transcrits. On la détecte aux niveaux des synapses inhibitrices de la moelle épinière de souris adulte, du tronc cérébral et du bulbe olfactif, mais elle n'est pas ou peu détectée dans le néocortex, le cervelet ou l'hippocampe (Weltzien et coll., 2012). Il est possible que son co-assemblage avec des sous-unités α soit nécessaire pour un ancrage ciblé à la membrane plasmique (Weltzien et coll., 2012). Ainsi, dans les régions cérébrales n'exprimant pas de sous-unités α , la sous-unité β serait directement dégradée et donc non détectable à la surface cellulaire.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe une régulation développementale de l'expression des sous-unités α (**Figure 26**). La sous-unité $\alpha 2$, codée par le gène *GLRA2*, est la plus abondante au cours du développement puis son expression diminue progressivement, alors que l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ augmente dans le même temps. Cette permutation intervient au moment même où l'action des GlyR change d'une action excitatrice vers une action inhibitrice. L'étude de l'expression des différentes sous-unités, en accord avec les résultats obtenus lors d'analyses pharmacologiques et électrophysiologiques (Takahashi et coll., 1992 ; Mangin et coll., 2002 ; Mangin et coll., 2003 ; Okabe et coll., 2004 ; Wang et coll., 2005), démontre que les GlyR détectés sur les neurones immatures sont des formes homomériques, composées uniquement de sous-unités $\alpha 2$, progressivement remplacées par des GlyR hétéromériques $\alpha 2\beta$ puis $\alpha 1\beta$ et $\alpha 3\beta$ chez l'adulte.

1.2.2 Récepteurs GABAergiques

Le GABA exerce son action inhibitrice rapide via deux types de canaux ioniques pentamériques : les récepteurs $GABA_A$ ($GABA_A R$) et les $GABA_C$ ($GABA_C R$) ; les $GABA_A R$ sont largement exprimés dans le cerveau alors que l'expression des $GABA_C R$ est restreinte à la rétine et à certaines régions du système nerveux central comme le cortex visuel, l'hippocampe, le cervelet et la moelle épinière (Le Corrionc et coll., 2011). L'inhibition GABAergique lente et prolongée est quant à elle assurée par les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ couplés aux protéines G. Les récepteurs GABAergiques ionotropiques sont composés d'une grande variété de sous-unités. Trois sous-unités pour les $GABA_C R$ ($\rho 1-3$) et seize sous-unités pour les $GABA_A R$ ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ et π). Les sous-unités des $GABA_C R$ ne s'assemblent pas avec les sous-unités des $GABA_A R$. La structure des récepteurs GABAergiques est très proche de celle des GlyR, puisque les sous-unités des $GABA_A R$ et $GABA_C R$ forment aussi des pentamères et sont composées d'un large domaine extracellulaire, de quatre domaines transmembranaires, et d'un grand domaine intracellulaire entre TM3 et TM4 (**Figure 27**) (Jacob et coll., 2008).

Comme pour les GlyR, l'expression de chaque sous-unité des $GABA_C R$ est régulée au cours du développement (Le Corrionc et coll., 2011). Le nombre élevé de sous-unités des $GABA_A R$ offre un potentiel énorme pour la composition des récepteurs, encore augmenté par l'épissage alternatif. Malgré cette diversité, seule une douzaine de combinaisons de sous-unités a été détectée jusqu'à présent. Les $GABA_A R$ les plus abondamment représentés dans le système nerveux adulte ont une stœchiométrie de : deux sous-unités $\alpha 1$,

deux sous-unités β et une sous-unité γ (la γ pouvant être remplacée par les δ , ϵ , θ ou π) (Jacob et coll., 2008). Comme pour les GlyR, le site de liaison de l'agoniste est porté principalement par les sous-unités α alors que la sous-unité γ permet la liaison du récepteur avec le cytosquelette post-synaptique. Les sous-types de GABA_AR exprimés varient en fonction de la zone du cerveau et de la moelle épinière. Les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 3$ sont probablement celles qui constituent les GABA_AR immatures du cerveau puisqu'elles sont très fortement exprimées au cours du développement et leur expression diminue après la naissance.

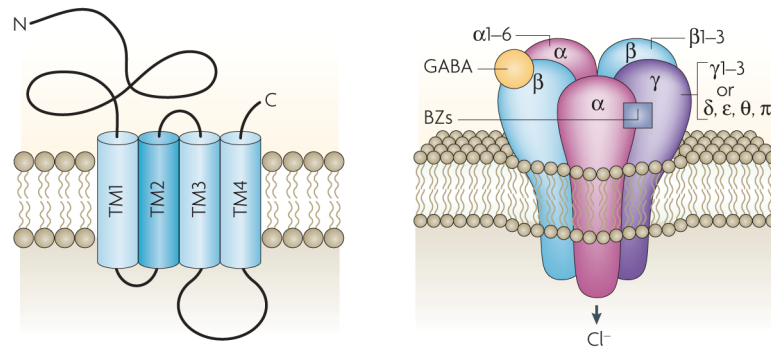


Figure 27. Les récepteurs GABA_A font partie de la famille des canaux ioniques chimio-dépendants.

Malgré l'importante hétérogénéité des sous-unités des GABA_AR, la plupart sont constitués de deux sous-unités α , deux sous-unités β et une sous-unité γ . La sous-unité γ peut être remplacée par les sous-unités δ , ϵ , θ ou π . La liaison du GABA se fait à l'interface entre les sous-unités α et β . Le récepteur contient aussi des sites de liaison pour des molécules psychoactives comme les benzodiazépines (BZ) (figure tirée de Jacob et coll., 2008).

1.2.3 Localisations synaptique et extra-synaptique

Les récepteurs glycinergiques sont trouvés à différentes localisations subcellulaires, au niveau du corps cellulaire ou des dendrites, et peuvent être répartis le long de la membrane plasmique ou bien regroupés à des sites synaptiques ou extra-synaptiques. Les proportions de ces différents groupes changent en fonction du stade de développement, de la région étudiée et de la composition en sous-unités. Dans l'hippocampe de rat par exemple, la localisation des différents GlyR varie selon le type cellulaire (interneurones, cellules pyramidales ou granulaires), selon la région hippocampique considérée et le stade de développement (Aroeira et coll., 2011). Les GlyR **synaptiques** peuvent être détectés au niveau de synapses glycinergiques ou mixtes GABAergique/glycinergique (Danglot et coll., 2004). De plus, ils peuvent être observés sur des boutons pré-synaptiques ; on les détecte à cette position sur des neurones glycinergiques, GABAergiques, glutamatergiques ou encore dopaminergiques, où ils exercent des fonctions variables (pour revue, voir Ye, 2008). Par exemple, chez le rat, l'activation des GlyR présynaptiques sur les terminaisons GABAergiques régule la libération de GABA sur les neurones dopaminergiques au niveau de l'aire tegmentale ventrale (Ye et coll., 2004). En effet, au cours du développement, alors que le GABA a une action excitatrice, l'activation des GlyR présynaptiques facilite la libération GABAergique vésiculaire ; en revanche, quand les neurones sont matures et que le GABA a un effet inhibiteur, l'activation des GlyR présynaptiques inhibe sa libération. Ainsi, il a été proposé que l'effet global de l'activation des GlyR présynaptiques sur les terminaisons GABAergiques serait une augmentation de l'excitation des neurones dopaminergiques, chez le jeune rat comme chez le rat adulte.

Les « vrais » récepteurs **extra-synaptiques**, composés uniquement de sous-unités α , ne peuvent s'accumuler à des sites post-synaptiques puisqu'ils ne possèdent pas de sous-unités β leur permettant de se lier aux complexes de géphyrine, comme c'est le cas pour les GABA_AR dépourvus de sous-unités γ . Ils diffèrent des GlyR hétéromériques $2\alpha:3\beta$ pouvant temporairement échapper à l'espace synaptique par des mouvements de diffusion latérale le long de la membrane plasmique. Ceux-ci peuvent rapidement bouger vers et en dehors des sites post-synaptiques et sont capables de diffuser de façon continue sur la surface cellulaire (pour revue, voir Muller et coll., 2008). L'équilibre dynamique entre les GlyR synaptiques et extra-synaptiques est régulé par

leur interaction avec la géphyrine. Des modifications de l'affinité de liaison entre les récepteurs et la protéine d'échafaudage, par exemple par des mécanismes de phosphorylation des différents partenaires, entraînent une redistribution des récepteurs à la surface cellulaire et donc une modification de la force de transmission synaptique et de la plasticité synaptique (Specht et coll., 2011).

La combinaison particulière de sous-unités des GlyR détermine leur positionnement, mais aussi leurs propriétés fonctionnelles. Les « vrais » récepteurs extra-synaptiques (homomériques 5α) peuvent répondre à une libération lente et continue de neurotransmetteurs. Par exemple, les GlyR immatures exprimés avant la synaptogenèse et composés uniquement de sous-unités α_2 , présentent des cinétiques d'activation et de désensibilisation particulièrement lentes, non compatibles avec une libération synaptique rapide et vésiculaire de neurotransmetteurs (Mangin et coll., 2003). La vitesse de clairance de la glycine dans la fente synaptique étant rapide, les propriétés des récepteurs homomériques α_2 les rendraient complètement inefficaces s'ils étaient localisés à la synapse. Ces propriétés sont en revanche parfaitement adaptées à une libération non vésiculaire, lente et persistante, de neurotransmetteurs et à la présence continue de l'agoniste dans l'espace extracellulaire. La présence de ces GlyR homomériques α_2 , ayant une **fonction paracrine**, démontre une adaptation fonctionnelle avec des implications importantes quant à la contribution de l'activation tonique de ces récepteurs qui a lieu au cours du développement (Section 2). De la même manière, la composition des GABA_AR en différentes sous-unités leur confère des propriétés particulières ; il a été montré que les GABA_AR extra-synaptiques, ne possédant pas la sous-unité γ , ont une cinétique d'activation particulièrement lente (Farrant et Nusser, 2005).

1.2.4 Implication dans des pathologies génétiques humaines

Plusieurs gènes codant des sous-unités de GlyR ou GABA_AR ont été impliqués dans des pathologies humaines variées. Les mutations des gènes codant les sous-unités α_1 et β des récepteurs de glycine, *GLRA1* et *GLRB*, entraînent une **hyperekplexie**, une maladie neurologique rare caractérisée par une rigidité musculaire à la naissance et un réflexe de tressaillement exagéré provoqué par un stimulus inattendu (pour revue, voir Harvey et coll., 2008). Ce phénotype est causé par des anomalies de la neurotransmission inhibitrice dans les circuits réflexes de la moelle épinière, où les GlyR $\alpha_1\beta$ sont fortement exprimés. Les mutations du gène *GLRA1* sont la cause la plus fréquente d'hyperekplexie. Une trentaine de mutations ponctuelles faux-sens, non-sens ou de décalage du cadre de lecture, ainsi que des délétions du gène *GLRA1* localisé sur le chromosome 5 (5q33.1) ont été identifiées et ce nombre ne cesse d'augmenter (Harvey et coll., 2008). Les anomalies peuvent être des mutations faux sens ayant des effets dominant-négatifs, localisées près ou dans le deuxième domaine transmembranaire qui constitue le canal du récepteur. Dans d'autres cas, les patients sont porteurs de mutations récessives, retrouvées dans des familles consanguines ou bien chez des individus hétézygotes composés. Les mécanismes physiopathologiques associés à ces mutations peuvent être des défauts de localisation de la protéine dans la membrane, des altérations de la sensibilité du récepteur à son ligand ou encore des altérations de sa conductance (Chung et coll., 2010).

L'hyperekplexie est caractérisée par une hétérogénéité génétique. Bien qu'aucune mutation des gènes codant les autres sous-unités α des GlyR n'ait été identifiée, des mutations du gène *GLRB* codant la sous-unité β ont été décrites (Rees et coll., 2002 ; Mine et coll., 2013). Les mutations du gène *GlyT2* codant un transporteur pré-synaptique de la glycine représentent la deuxième cause la plus fréquente d'hyperekplexie (Carta et coll., 2012). De plus, d'autres gènes codant des protéines impliquées dans la neurotransmission glycinergique sont aussi impliqués dans cette pathologie : *GPHN* qui code la géphyrine et *ARHGEF9* codant la collybistine qui interagit avec la géphyrine (Tableau 3). Des mutations de ces gènes ont été trouvées chez quelques patients atteints d'hyperekplexie.

Tableau 3. Gènes impliqués dans la neurotransmission glycinergique et l'hyperekplexie

Gène	Localisation	Protéine	Fonction	Références
Récepteurs de glycine				
<i>GLRA1</i>	5q33.1	GLRA1 (GlyR α 1)	La sous-unité α 1 des GlyR est fortement exprimée dans la moelle épinière où elle est responsable de la transmission inhibitrice. Les mutations de ce gène sont la première cause d'hyperekplexie.	(Chung et coll., 2010)
<i>GLRB</i>	4q32.1	GLRB (GlyR β)	La sous-unité β des GlyR permet leur regroupement. Les mutations de ce gène sont la troisième cause d'hyperekplexie.	(Rees et coll., 2002 ; Chung et coll., 2013 ; Mine et coll., 2013)
Protéines responsables du regroupement synaptique des GlyR				
<i>GPHN</i>	14q23.3	Géphyrine	La géphyrine est responsable du regroupement des GlyR. Les mutations de ce gène causent un phénotype d'hyperekplexie et une déficience en cofacteur du molybdène (MoCo), une maladie héréditaire métabolique.	(Reiss et coll., 2001 ; Rees et coll., 2003)
<i>ARHGEF9</i>	Xq11.1	Collybistine	La collybistine est une protéine localisée aux synapses inhibitrices qui interagit avec la géphyrine. Les mutations de ce gène sont associées à une déficience intellectuelle liée à l'X et un phénotype d'hyperekplexie avec épilepsie.	(Harvey et coll., 2004a ; Shimojima et coll., 2011)
Transporteurs de glycine				
<i>SLC6A5</i>	11p15.1	GlyT2	Le transporteur GlyT2 est trouvé sur les axones glycinergiques. Il permet la clairance de la glycine de l'espace synaptique et assure le maintien d'une quantité élevée de glycine dans les terminaisons présynaptiques. Ces mutations représentent la deuxième cause d'hyperekplexie.	(Rees et coll., 2006 ; Carta et coll., 2012)

De nombreux modèles murins d'hyperekplexie ont été étudiés en laboratoire, dont le phénotype rappelle celui observé chez les patients, i.e. une rigidité musculaire, des tremblements et des réactions réflexes exagérées (Legendre, 2001). Il est intéressant de noter que les manifestations observées chez ces souris n'apparaissent qu'après deux semaines de vie post-natale ; ces résultats sont concordants avec les études d'expression de *Gla1* au cours du développement qui montrent que son expression dans la moelle épinière augmente fortement après la naissance.

La sous-unité α 3 a été impliquée quant à elle dans les mécanismes de la **douleur inflammatoire** (Harvey et coll., 2004b). Une infection ou une lésion d'un tissu entraîne la libération de prostaglandines, des molécules endogènes pro-inflammatoires qui déclenchent une douleur chronique en augmentant la réponse nociceptive. Plus précisément, la libération des prostaglandines entraîne la désinhibition de la moelle épinière ; le contrôle inhibiteur assuré par les interneurons spinaux sur les neurones de la corne dorsale ne se fait plus, ce qui facilite la transmission de l'information nociceptive. Il a tout d'abord été démontré que les courants glycinergiques inhibiteurs enregistrés sur les neurones nociceptifs de la moelle épinière chez le rat sont effectivement inhibés par les prostaglandines (Ahmadi et coll., 2002). Plus tard, la sous-unité α 3 des GlyR a été détectée au niveau des neurones nociceptifs de la corne dorsale de la moelle épinière de souris, où elle co-localise avec la géphyrine (Harvey et coll., 2004b). Son rôle dans les mécanismes de la douleur inflammatoire a alors été montré puisque la désinhibition de la moelle épinière se fait en partie par l'inactivation des GlyR contenant la sous-unité α 3 présents dans les couches superficielles de la moelle épinière ; c'est la libération de la prostaglandine E2, qui inhibe les GlyR α 3 grâce à leur phosphorylation par la protéine kinase A. Aucune preuve chez l'homme n'a été apportée à ce jour.

La sous-unité α 3 a aussi été impliquée dans la **régulation du rythme respiratoire** (Manzke et coll., 2010), qui se fait chez les mammifères par l'action d'un réseau neuronal du tronc cérébral. La phosphorylation des GlyR α 3, modulée par les récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A, régule les décharges des neurones glutamatergiques et glycinergiques. Des dérégulations de ce rythme peuvent avoir des conséquences cliniques

graves, comme par exemple des épisodes prolongés d'arrêts respiratoires (apnées) qui peuvent conduire à une hypoxie ; ces manifestations sont observées dans le syndrome de Rett (Chahrour et Zoghbi, 2007) et l'hyperekplexie (Busselberg et coll., 2001).

Enfin, plusieurs gènes codant des sous-unités des récepteurs GABAergiques ont été impliqués dans l'épilepsie (pour revue, voir Noebels, 2003 ; Poduri et Lowenstein, 2011).

2. Rôle de la neurotransmission glycinergique et GABAergique au cours du développement

2.1 Libération paracrine de neurotransmetteurs et activation tonique des récepteurs

Le GABA et la glycine sont détectés précocement dans le système nerveux immature, avant même le début de la synaptogenèse (van den Pol, 1997 ; Tapia et coll., 2000). De la même manière, leurs récepteurs impliqués dans la transmission synaptique à l'âge adulte, sont aussi exprimés à des stades précoces du développement, par des neurones dépourvus de synapses ou même par des cellules non-neuronaux (pour revue, voir Le Corronc et coll., 2011). L'expression précoce de la glycine, du GABA et de leurs récepteurs permet une communication entre les neurones immatures, avant même la formation des premières synapses. Elle se traduit par une libération paracrine de neurotransmetteurs, à partir des neurones ou des cellules gliales, qui entraîne des courants électriques non-synaptiques, spontanés et toniques, dans les réseaux neuronaux en développement. Plusieurs études ont cherché à déterminer précisément les mécanismes non-conventionnels de cette libération paracrine ainsi que la source cellulaire des neurotransmetteurs dans différentes régions du système nerveux central. Par exemple, ce type de courant électrique provoqué par une libération non-synaptique de GABA a été détecté dans des neurones embryonnaires et néonataux d'hippocampe de souris et de rat (Demarque et coll., 2002). Des courants glycinergiques toniques sont aussi observés dans plusieurs régions du système nerveux central : dans la moelle épinière embryonnaire de souris, suite à une libération de glycine par les cellules radiales gliales environnantes (Scain et coll., 2010), dans le néocortex après une libération de taurine par les neurones corticaux (Flint et coll., 1998) ou encore après activation par la taurine des GlyR présents sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (Wang et coll., 2005). En conséquence, l'activation des GlyR et des GABA_AR peut ainsi moduler l'activité électrique du réseau neuronal via la dépolarisation des neurones immatures. Beaucoup d'efforts ont été fournis ces dernières années pour explorer la fonction de ce processus au cours du développement (Section 2.2).

2.2 Rôle physiologique développemental

La glycine, la taurine et le GABA sont libérés de façon paracrine à des stades très précoces du développement et diffusent pour aller activer leurs récepteurs. Cette activation entraîne la dépolarisation des neurones exprimant les GlyR et les GABA_AR ainsi que la formation de courants électriques spontanés dans les neurones. On a longtemps pensé que la formation du cerveau au cours du développement embryonnaire était indépendante de son activité électrique. Celle-ci semblait importante uniquement à des stades plus tardifs pour affiner les connexions nerveuses. Pourtant, des preuves se sont accumulées démontrant que l'activité spontanée du système nerveux immature, qui précède la mise en place d'une activité synaptique, a un rôle majeur sur de nombreux processus de maturation neuronale. La plupart des études se sont focalisées sur le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Cependant, même si les preuves sont moins nombreuses, plusieurs études démontrent aussi l'implication de la transmission glycinergique dans les processus de maturation neuronale que sont la prolifération, la migration et la différenciation des neurones immatures.

Prolifération

Les neurones sont générés en très grand nombre au cours du développement par des divisions asymétriques de cellules progénitrices. Cette prolifération qui a lieu dans le cerveau embryonnaire et au cours de la vie postnatale précoce est en partie régulée par la signalisation électrique spontanée non-synaptique. Chez le rat, l'activation des récepteurs GABAergiques localisés sur les cellules progénitrices de la zone ventriculaire du néocortex embryonnaire entraîne leur dépolarisation, suivie de l'entrée de Ca^{2+} dans ces cellules et finalement, l'inhibition de leur synthèse d'ADN (LoTurco et coll., 1995). De même chez la souris, la libération de GABA à partir de neuroblastes en cours de différenciation dépolarise les cellules souches localisées dans la zone subventriculaire et inhibe leur synthèse d'ADN pour limiter leur prolifération (Liu et coll., 2005) (Figure 28). Cependant, le rôle du GABA peut être inversé dans d'autres régions du cerveau, comme c'est le cas dans le cervelet, où sa libération semble plutôt faciliter la prolifération neuronale (Fizman et coll., 1999). Des preuves directes de l'action de la glycine sur la prolifération n'ont pas encore été apportées.

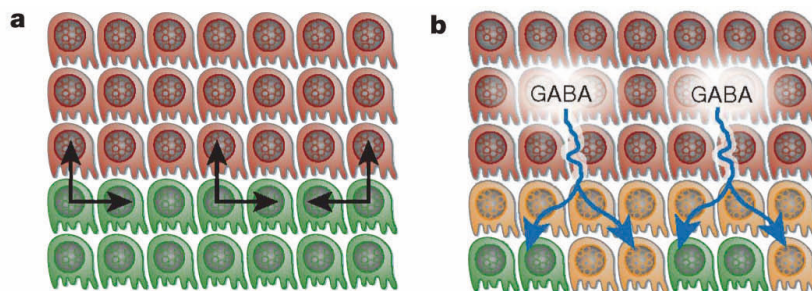


Figure 28. Action du GABA sur la prolifération neuronale.

La libération spontanée de neurotransmetteurs par les neuroblastes entraîne une élévation du Ca^{2+} dans les cellules progénitrices qui limite leur prolifération. **a**, Les cellules progénitrices de la zone subventriculaire (en vert) se divisent de façon asymétrique (flèches) pour donner les neuroblastes (en rouge). **b**, Les neuroblastes libèrent du GABA (flèches bleues), qui dépolarise les cellules progénitrices et provoque une entrée de Ca^{2+} (en jaune) qui inhibe la synthèse d'ADN et la prolifération (figure tirée de Spitzer, 2006).

Migration

La migration des neurones est une étape majeure dans la maturation du cerveau. Cette étape est modulée par l'activité électrique spontanée, déclenchée par l'activation des GlyR et des GABA_A R dans les différents réseaux neuronaux en formation. L'action des neurotransmetteurs va dépendre de la voie de migration (radiale ou tangentielle), du type de cellules (principalement les neurones glutamatergiques ou les interneurons) et de la région du cerveau étudiée. Une étude récente a démontré, par des expériences *in vitro* et *in vivo*, l'implication de la sous-unité $\alpha 2$ des GlyR dans la migration tangentielle des interneurons corticaux, à des stades embryonnaires très précoces (Avila et coll., 2013). L'activation des récepteurs GABAergiques permet aussi de moduler la migration tangentielle des interneurons (Bortone et Polleux, 2009), ainsi que la migration radiale des neurones pyramidaux du cortex (Manent et coll., 2005). De plus, de nombreuses études ont démontré l'action modulatrice du GABA sur la migration neuronale dans le cervelet, l'hippocampe ou encore la voie de migration rostrale (pour revue, voir Manent et Represa, 2007).

Différenciation

La différenciation neuronale est un processus complexe qui comporte plusieurs composantes, deux d'entre elles étant la spécification des neurotransmetteurs exprimés par une cellule et l'expression des canaux ioniques qui régulent son excitabilité. L'activité électrique spontanée détectée à des stades précoces de la vie embryonnaire permet, par des courants calciques intracellulaires, de réguler l'expression des gènes codant des canaux ioniques dans une cellule donnée et donc de déterminer son destin neuronal (pour revue, voir Spitzer, 2006). Dans une population neuronale, elle peut aussi moduler le nombre de cellules exprimant des neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs. Par exemple, la suppression des courants calciques sur des moelles épinières d'embryons de Xénope augmente le nombre de neurones exprimant des

neurotransmetteurs excitateurs et diminue le nombre de ceux exprimant des neurotransmetteurs inhibiteurs (Borodinsky et coll., 2004). Les effets sont inversés lorsque les courants calciques sont augmentés (Figure 29).

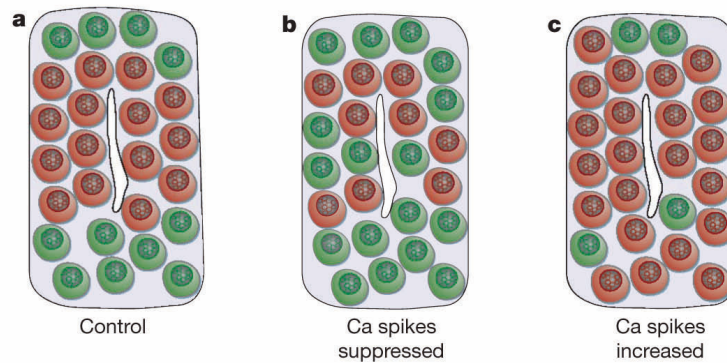


Figure 29. Action du GABA sur la différenciation neuronale, dépendante des courants calciques.

a, Expression normale des neurotransmetteurs excitateurs (vert) et inhibiteurs (rouge) dans les neurones de la moelle épinière. **b**, La suppression des courants calciques augmente le nombre de neurones exprimant des neurotransmetteurs excitateurs et diminue le nombre de neurones exprimant des neurotransmetteurs inhibiteurs. **c**, L'augmentation des courants calciques augmente le nombre de neurones exprimant des neurotransmetteurs inhibiteurs et diminue le nombre de neurones exprimant des neurotransmetteurs excitateurs (figure tirée de Spitzer, 2006).

L'action de la glycine sur la différenciation cellulaire a aussi été observée (Young et Cepko, 2004). En effet, l'application simultanée de glycine et de GABA ou bien de taurine sur des cultures de cellules de rétine (prélevées sur des souris nouveau-nées) entraîne une augmentation du nombre de photorécepteurs. Plus spécifiquement, l'expression ectopique du gène *GLRA2* codant la sous-unités $\alpha 2$ des GlyR dans des cultures d'explant de rétine (prélevées sur des embryons de souris à 14 jours de développement) produit une sortie de la mitose des cellules rétinienne et une augmentation du nombre de photorécepteurs (Young et Cepko, 2004). Enfin, des expériences *in vivo* sur la rétine du rat démontrent que la perte de fonction de *GLRA2* inhibe le développement des cellules photoréceptrices au profit d'autres types cellulaires (Young et Cepko, 2004).

Des effets de la glycine ont aussi été observés sur des cellules de Purkinje mises en culture à partir d'embryons de rat de 20 à 21 jours (Furuya et coll., 2000). La glycine libérée par les cellules astrogliales du cervelet promeut la survie et la croissance dendritique des neurones de Purkinje lorsqu'elle est ajoutée à la culture de neurones. De plus, les effets de la glycine sur la croissance des neurites ont été observés sur des cultures de neurones immatures de moelle épinière de souris (Tapia et coll., 2000 ; Tapia et coll., 2001). L'ajout de strychnine, un antagoniste des GlyR, ou bien de glycine à forte concentration entraînant la désensibilisation des récepteurs, augmente la croissance des neurites (Figure 30).

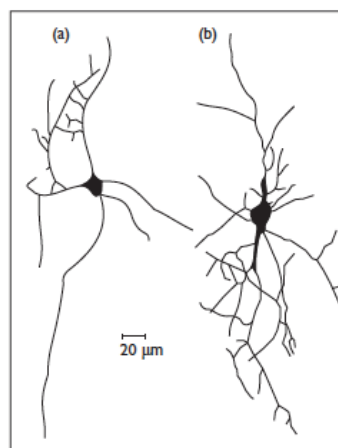


Figure 30. La glycine module la croissance des neurites des neurones spinaux en développement.

Dessin représentant des neurones obtenus à partir de moelle épinière d'embryons de souris à 13 ou 14 jours et mis en culture pendant 7 jours, avec (a) ou sans (b) glycine (à une concentration de 100 μ M, appliquée pendant les dernières 48 h de culture) (figure tirée de Tapia et coll., 2000).

En conclusion, parmi les mécanismes qui gouvernent la maturation des réseaux neuronaux, les neurotransmetteurs inhibiteurs méritent une attention particulière pour plusieurs raisons : (i) La glycine et le GABA ainsi que leurs récepteurs sont exprimés précocement dans le système nerveux en développement. (ii) Ils agissent comme des molécules de signalisation paracrine permettant aux cellules de communiquer avant la formation des synapses. (iii) Ils régulent le calcium intracellulaire requis pour de nombreuses fonctions cellulaires.

3. Déséquilibre de la balance excitation/inhibition : un nouveau mécanisme physiopathologique impliqué dans les TSA

3.1 Hypothèse du déséquilibre de la balance excitation/inhibition

Des processus multiples et complexes sont finement régulés au cours du développement pour assembler le système nerveux. Des événements clés pendant cette période permettent la mise en place de circuits neuronaux équilibrés en éléments excitateurs et inhibiteurs. Par exemple, le cortex cérébral est principalement constitué de cellules pyramidales excitatrices glutamatergiques et d'**interneurones** inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques. Les cellules pyramidales transmettent les informations entre les différentes zones corticales ainsi que vers d'autres régions du cerveau, alors que les interneurones contribuent localement à la formation du réseau neuronal, synchronisent les oscillations entre les neurones et contrôlent l'hyperexcitabilité du cortex (pour revue, voir Marin, 2012). La perturbation de cet équilibre peut avoir des conséquences dramatiques comme c'est le cas pour l'**épilepsie**, caractérisée par une augmentation de l'excitation qui aboutit à une hyperexcitabilité pathologique (Scharfman, 2007). De multiples anomalies peuvent provoquer ce déséquilibre puisqu'il existe des moyens nombreux et variés par lesquels le système nerveux normal contrôle la balance entre excitation et inhibition. En effet, plusieurs gènes codant des sous-unités des récepteurs GABA_A sont impliqués dans différentes formes d'épilepsie (Section 1.2.4). Par ailleurs, plusieurs gènes régulant la production, la migration ou la fonction des interneurones sont impliqués dans l'épilepsie (pour revue, voir Poduri et Lowenstein, 2011). C'est le cas par exemple du gène *ARX* (*aristaless related homeobox*), codant un facteur de transcription permettant de contrôler la migration des interneurones GABAergiques au cours du développement et qui est impliqué dans la déficience intellectuelle liée au chromosome X, l'épilepsie et les TSA (Colasante et coll., 2008 ; Friocourt et coll., 2008).

L'émergence de l'hypothèse d'un déséquilibre de la **balance entre excitation et inhibition (E/I)** en tant que mécanisme physiopathologique impliqué dans certaines formes d'autisme a été basée sur plusieurs observations. Tout d'abord, environ 30 % des sujets atteints de TSA développent une épilepsie, caractérisée par une hyperexcitabilité des circuits neuronaux, c'est-à-dire un excès d'excitation ou une dérégulation du contrôle inhibiteur (Tuchman et Rapin, 2002). De plus, des études d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle ont permis de détecter une hyperactivité dans différentes régions du lobe frontal chez certains patients avec autisme, suggérant que ceux-ci auraient des réseaux corticaux instables (Gomot et coll., 2008 ; Dichter et coll., 2009). Enfin, plusieurs gènes impliqués dans les TSA codent des sous-unités de récepteurs excitateurs ou inhibiteurs, par exemple *GRIN2B* (*glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B*) qui code une sous-unité des récepteurs du glutamate, ou encore des protéines synaptiques qui assurent la neurotransmission excitatrice et/ou inhibitrice, autrement dit des gènes indispensables pour le maintien de la balance E/I (Partie II). L'ensemble de ces observations suggère fortement que les mécanismes qui régulent l'excitation et/ou l'inhibition du cerveau, au niveau moléculaire, cellulaire ou des circuits neuronaux, pourraient être à la base de certaines formes de TSA.

Hussman (2001) a été le premier à proposer que l'inhibition GABAergique pourrait être diminuée dans le cerveau de sujets atteints de TSA, favorisant ainsi les circuits excitateurs. Plus tard, l'idée que des altérations du

système GABAergique combinées à une forte activité tonique excitatrice pourraient exister dans le cerveau de sujets atteints d'autisme a amené Rubenstein et Merzenich (2003) à proposer l'hypothèse que certaines formes du syndrome seraient expliquées par une augmentation du ratio E/I dans des systèmes neuronaux critiques du cerveau. L'idée inhérente à leur hypothèse est qu'il y aurait un « bruit de fond » augmenté de l'activité neuronale, dû soit à un niveau d'excitation disproportionné soit à une inhibition trop faible dans le cortex en développement. Cette dérégulation expliquerait l'apparition des TSA et de plus, rendrait le cortex particulièrement instable, hautement susceptible à une activité épileptique.

Une étude récente a testé directement l'hypothèse du déséquilibre de la balance E/I chez des souris éveillées. En utilisant des outils d'optogénétique, Yizhar et coll. (2011) ont montré que l'élévation (et non la réduction) du ratio cellulaire E/I provoque des altérations du comportement. En effet, en activant spécifiquement les neurones excitateurs du cortex préfrontal, le comportement social des souris testées ainsi que leur apprentissage sont significativement altérés. En revanche, ces souris réagissent normalement lors de tests de locomotion et d'anxiété. Par ailleurs, les auteurs ont montré que l'augmentation de l'inhibition chez ces mêmes souris permet de restaurer partiellement leurs phénotypes anormaux. Ces résultats apportent une preuve directe en faveur de l'hypothèse du déséquilibre de la balance E/I à la base de comportements analogues à ceux observés dans les TSA. Selon cette étude, l'activation spécifique des neurones excitateurs semble suffire à altérer de façon profonde mais réversible les fonctions sociales et cognitives des souris. De plus, l'augmentation de l'excitation étant temporairement délimitée, ces expériences permettent de distinguer les effets d'un déséquilibre de la balance E/I en temps réel par rapport aux nombreuses altérations pouvant avoir lieu au cours du développement et qui ont des effets plutôt à long terme.

Depuis l'hypothèse de Rubenstein et Merzenich (2003), plusieurs études ont cherché à savoir si certains facteurs génétiques connus pour causer des TSA ou d'autres troubles neurodéveloppementaux affectaient effectivement la balance E/I. Si cette hypothèse était vérifiée, elle permettrait de relier nos connaissances génétiques des TSA à un mécanisme physiopathologique commun à certaines formes du syndrome. L'étude de nombreux modèles de souris mutées pour des gènes préalablement impliqués dans les TSA et d'autres troubles neurodéveloppementaux a effectivement permis d'apporter des arguments en faveur de l'hypothèse du déséquilibre entre excitation et inhibition (Section 3.2).

3.2 Dysfonctionnement du système inhibiteur *in vivo*

Plusieurs classes de gènes impliqués dans les TSA ont été étudiées *in vivo* chez la souris. Parmi elles, on retrouve les gènes qui régulent : (i) le développement et la fonction des synapses, comme les neuroligines (*NLGN3* et *NLGN4X*), les neurexines (*NRXN1*), les contactines (par exemple *CNTNAP2*) et les protéines d'échafaudage synaptique (*SHANK2* et *SHANK3*) ; (ii) l'expression d'autres gènes (par exemple *MECP2*) ; et (iii) la traduction et/ou la stabilité de certaines protéines (par exemple *FMR1*). De façon intéressante, alors que leurs fonctions et/ou leur profil d'expression spatio-temporel sont le plus souvent très variés, des dysfonctionnements de la neurotransmission inhibitrice, aboutissant à des déséquilibres de la balance E/I, ont été observés dans des lignées de souris déficientes pour ces gènes. Ces observations permettent donc d'unifier divers facteurs génétiques vers un principe pathophysiologique commun.

3.2.1 Les molécules d'adhésion cellulaire synaptiques et leurs partenaires

Comme décrit précédemment, beaucoup de gènes codant des molécules d'adhésion cellulaire synaptiques (*cell-adhesion molecule*, CAM) ont été impliqués dans les TSA (pour revue, voir Betancur et coll, 2009). Des interactions moléculaires complexes ont lieu au niveau des synapses, incluant les CAM synaptiques, les densités pré- et post-synaptiques et le cytosquelette d'actine, qui permettent de contrôler la formation, la structure, la fonction et le maintien des synapses. Les CAM assurent le contact entre les cellules pré- et post-

synaptiques. De plus, elles offrent un point d'ancrage pour la machinerie pré-synaptique et les protéines d'échafaudage post-synaptiques qui permettent ensuite d'assembler les molécules de signalisation et de lier les récepteurs de neurotransmetteurs au cytosquelette d'actine. La voie des CAM synaptiques impliquée dans les TSA la mieux caractérisée est celle qui comprend les neuroligines (des CAM post-synaptiques) et les neurexines (localisées principalement sur les terminaisons pré-synaptiques) (**Figure 31**). Chez l'homme, il existe cinq gènes codant des neuroligines (*NLGN1*, *NLGN2*, *NLGN3*, *NLGN4X* et *NLGN4Y*) ; et trois gènes codant des neurexines (*NRXN1*, *NRXN2* et *NRXN3*). Cette voie implique aussi les protéines d'échafaudage post-synaptique SHANK1, SHANK2 et SHANK3, partenaires indirects des neuroligines à travers PSD-95 et GKAP. Comme discuté précédemment, des variants rares ont été trouvés chez des patients atteints de TSA et de déficience intellectuelle dans les gènes *NLGN3*, *NLGN4X*, *NRXN1*, *SHANK2* et *SHANK3* (**Partie II**).

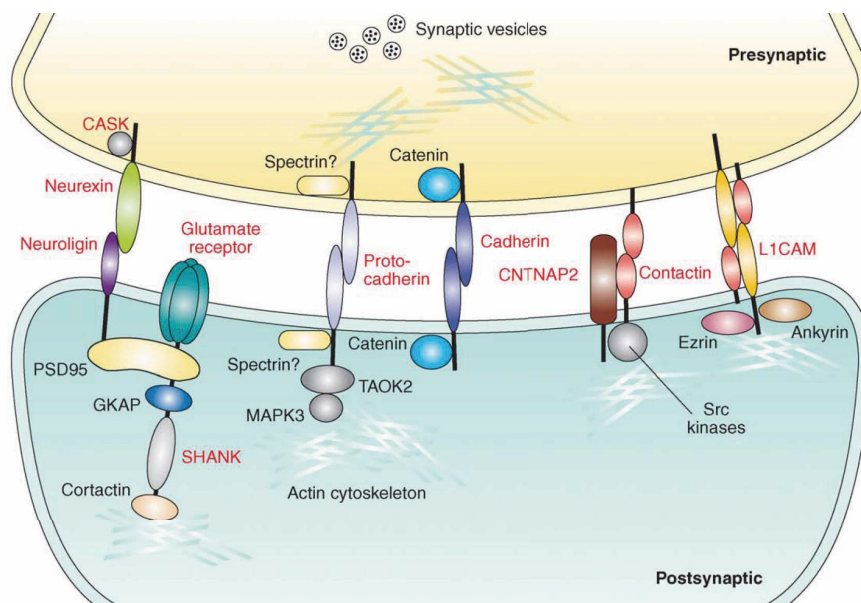


Figure 31. La voie des neuroligines-neurexines.

Les CAM synaptiques connectent les sites pré- et post-synaptiques et ont un rôle dans la maturation, la fonction et la plasticité synaptique. Elles interagissent aussi avec de nombreuses protéines cytoplasmiques, dont des protéines d'échafaudage, des protéines du cytosquelette et des molécules de signalisation. Les protéines dont les gènes ont été impliqués dans les TSA et/ou la déficience intellectuelle sont indiquées en rouge (figure tirée de Betancur et coll., 2009).

Neuroligines

Alors que les neuroligines 1 et 2 sont spécifiquement détectées aux synapses excitatrices et inhibitrices respectivement, les neuroligines 3 et 4 sont exprimées au niveau des deux types de synapses (Budreck et Scheiffele, 2007). Une mutation faux-sens dans le gène *NLGN3* (p.R451C) a été identifiée chez deux frères, l'un étant atteint d'autisme et l'autre présentant un syndrome d'Asperger (Jamain et coll., 2003). Au niveau du cortex somatosensoriel des souris portant cette mutation **R451C**, Tabuchi et coll. (2007) ont détecté une augmentation des marqueurs synaptiques inhibiteurs, incluant le transporteur vésiculaire du GABA (*vesicular GABA transporter*, VGAT) et la géphyrine, sans augmentation du nombre de synapses (**Tableau 4**). Les auteurs ont aussi montré que la transmission inhibitrice est augmentée en réponse à l'application de GABA, alors que la signalisation excitatrice reste inchangée. De plus, ces souris présentent des altérations du comportement social et une augmentation des capacités d'apprentissage spatial.

Étonnamment, aucun des phénotypes moléculaires et physiologiques observés chez les souris R451C n'a été identifié chez les **souris déficientes pour *Nlgn3*** (Tabuchi et coll., 2007) (**Tableau 4**). Les auteurs ont donc proposé que la mutation R451C entraînerait un gain de fonction de la protéine par des mécanismes encore incompris. Un autre groupe a aussi étudié les souris invalidées pour *Nlgn3* et a décrit une diminution des

vocalises et une perte de préférence pour la nouveauté sociale probablement liée à des déficits olfactifs, mais la transmission synaptique n'a pas été explorée (Radyushkin et coll., 2009). Finalement, les résultats publiés par Tabuchi et coll. (2007) sont renforcés par une nouvelle étude des souris R451C qui a montré une augmentation de la transmission GABAergique au niveau de l'hippocampe, alors que la signalisation glutamatergique est intacte (Pizzarelli et Cherubini, 2013). L'exemple des souris portant la mutation R451C renforce donc l'hypothèse qu'un changement de la balance E/I pourrait contribuer à la pathogenèse des TSA. Bien que la question n'ait pas encore été abordée pour les souris R451C, il est probable que le déséquilibre de la balance E/I ne soit pas global, mais plutôt spécifique d'une sous-population neuronale. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer quels circuits neuronaux et quelles régions du cerveau sont impliqués.

Des mutations et des délétions du gène **NLGN4X** ont été identifiées chez des sujets atteints de TSA et de déficience intellectuelle, ainsi que dans d'autres phénotypes neuropsychiatriques incluant le syndrome de Tourette et le TDAH (Jamain et coll., 2003 ; Laumonnier et coll., 2004 ; Kent et coll., 2008 ; Lawson-Yuen et coll., 2008). Deux études de la même lignée de souris déficientes pour *Nlgn4* ont été réalisées et ont obtenu des résultats contradictoires. Dans un premier temps, une réduction des interactions sociales et de la communication ont été décrites chez des souris adultes déficientes pour *Nlgn4* (Jamain et coll., 2008) mais ces résultats n'ont pas été répliqués sur des souris adultes issues de générations ultérieures de la même lignée (Ey et coll., 2012) (**Tableau 4**). Le phénotype moléculaire de ces souris n'a encore jamais été exploré. Alors que des résultats *in vitro* suggèrent que les neuroligines ont un rôle dans la formation des synapses excitatrices et inhibitrices (Chih et coll., 2005), l'étude des souris **triple mutantes pour les gènes *Nlgn1*, *Nlgn2* et *Nlgn3*** a pourtant montré que l'élimination de ces protéines n'affecte pas le nombre de synapses dans le cerveau (Varoqueaux et coll., 2006). Selon l'étude de Varoqueaux et coll., chez une souris sauvage, 80 % des événements synaptiques totaux du tronc cérébral sont des courants GABAergiques/glycinergiques et 20 % sont des courants glutamatergiques. En revanche, chez les souris triples mutantes *Nlgn1-Nlgn2-Nlgn3*, la balance est fortement changée puisque 30 % des événements synaptiques totaux sont des courants GABAergiques/glycinergiques et 70 % sont des courants glutamatergiques. Ces défauts ne seraient apparemment pas dus à une diminution du nombre de synapses mais plutôt à une altération des vésicules pré-synaptiques et un mauvais recrutement des récepteurs GABAergiques post-synaptiques (GABA_AR α 1). Leurs résultats indiquent donc que les neuroligines influencent la balance E/I sans affecter le nombre total de synapses. Elles semblent essentielles pour le bon fonctionnement des synapses mais pas indispensables pour la formation initiale des contacts synaptiques.

Neurexines

Les neurexines permettent de connecter la machinerie pré-synaptique nécessaire à la libération de neurotransmetteurs à la densité post-synaptique. Il existe trois gènes codant des neurexines, chacun d'eux exprimant deux variants, α (long) et β (court), qui diffèrent par leurs domaines extracellulaires. Les délétions du gène *NRXN1* sont associées à une expressivité phénotypique variable incluant des TSA, une déficience intellectuelle, un retard de langage ou une schizophrénie (Béna et coll., 2013). Une seule mutation non sens dans le gène *NRXN2* héritée de la mère (Gauthier et coll., 2011) ainsi que cinq délétions touchant *NRXN3* (Griswold et coll., 2012 ; Vaags et coll., 2012), le plus souvent héritées de parents sains et retrouvées chez des frères et sœurs non atteints, ont été identifiées chez des patients atteints de TSA. L'implication de ces deux gènes reste encore incertaine étant donné la rareté des mutations et/ou l'inconsistance des corrélations génotype-phénotype observées dans les familles.

Les souris **mutantes pour les trois gènes neurexines**, ainsi que les souris **doubles mutantes**, meurent prématurément et présentent une forte diminution de la transmission excitatrice et inhibitrice dans le cortex et le tronc cérébral (Missler et coll., 2003). Missler et coll. ont montré chez les souris triples mutantes que les

neurexines sont essentielles pour le bon fonctionnement de la machinerie pré-synaptique et la libération de neurotransmetteurs. Comme les neuroligines, elles ne semblent pas être indispensables pour la formation initiale des synapses mais primordiales pour leur bon fonctionnement (Missler et coll., 2003 ; Dudanova et coll., 2007). Bien qu'elles soient localisées majoritairement aux sites pré-synaptiques, les neurexines doivent aussi avoir des effets post-synaptiques puisque les souris **déficientes pour Neurexine-1 α** ont une altération spécifique de la transmission post-synaptique excitatrice qui contribuerait probablement à leurs phénotypes anormaux (Etherton et coll., 2009) (**Tableau 4**). Aucun changement de la transmission inhibitrice n'a été détecté chez ces souris. Pourtant, il a été montré par des expériences *in vitro* que les neurexines interagissent directement avec les récepteurs GABA_A et modifient la transmission synaptique inhibitrice (Zhang et coll., 2010). Cette dichotomie peut être expliquée par plusieurs facteurs :

- des changements subtils de la transmission inhibitrice ont pu ne pas être remarqués chez les souris déficientes pour *Neurexine-1 α* face aux défauts écrasants de la neurotransmission excitatrice ;
- la présence des neurexines-1 β aurait pu compenser l'absence des neurexines-1 α et empêcher l'expression d'un phénotype aux synapses inhibitrices. L'ensemble de ces résultats montre que les neurexines ont des fonctions multiples, avec des effets pré- et post-synaptiques, impactant la balance E/I à la fois par des modifications de la transmission excitatrice et inhibitrice.

Tableau 4. Phénotype des souris mutantes pour des molécules d'adhésion cellulaire synaptiques impliquées dans les TSA et présentant des déséquilibres de la balance E/I.

Gène	Modèle de souris	Phénotype comportemental	Phénotype moléculaire, biochimique et synaptique	Références
<i>NLGN3</i>	<i>Nlgn3</i> ^{-/-}	Communication réduite, interactions sociales altérées, déficit olfactif (Radyushkin et coll., 2009)	Aucun phénotype anormal (Tabuchi et coll., 2007)	(Tabuchi et coll., 2007 ; Radyushkin et coll., 2009)
	<i>Nlgn3</i> ^{R451C/-}	Altération du comportement social et augmentation des capacités d'apprentissage spatial (Tabuchi et coll., 2007)	Augmentation du marquage VGAT, pas de changement du nombre de synapses, augmentation de la transmission inhibitrice dans le cortex, pas d'effet sur l'excitation (Tabuchi et coll., 2007) ; augmentation de la transmission inhibitrice dans l'hippocampe, pas d'effet sur l'excitation (Pizzarelli et Cherubini, 2013)	(Tabuchi et coll., 2007 ; Pizzarelli et Cherubini, 2013)
<i>NLGN4X</i>	<i>Nlgn4x</i> ^{-/-}	Interactions sociales et communication réduites (Jamain et coll., 2008)	Non exploré	(Jamain et coll., 2008) (Ey et coll., 2012)
<i>NRXN1</i>	<i>Nrxn1</i> ^{-/-}	Diminution de l'inhibition du réflexe de sursaut, augmentation du toilettage, amélioration des capacités d'apprentissage moteur	Diminution de la transmission excitatrice dans l'hippocampe, pas d'effet sur la transmission inhibitrice	(Etherton et coll., 2009)
<i>CNTNAP2</i>	<i>Cntnap2</i> ^{-/-}	Épilepsie, meilleures performances motrices dans l'open-field et le rotarod, interactions sociales et communication altérées, stéréotypies	Diminution du nombre d'interneurones et défaut de position des neurones excitateurs dans les différentes couches corticales, défaut de synchronie	(Penagarikano et coll., 2011)
<i>SHANK2</i>	<i>Shank2</i> ^{-/-}	Hyperactivité, comportements répétés, interactions sociales et communication altérées	Densité en épines dendritiques diminuée, réduction de la transmission synaptique excitatrice dans l'hippocampe	(Schmeisser et coll., 2012)
<i>SHANK3</i>	<i>Shank3</i> ^{-/-} (Δ ex4-9) (Bozdagi et coll., 2010) ; <i>Shank3</i> ^{-/-} (Δ ex13-16) (Peça et coll., 2011)	Interactions sociales et communication altérées ; comportements répétés	Légère diminution de la transmission excitatrice dans la striatum (Peça et coll., 2011) ; anomalies de la transmission excitatrice hippocampique et potentiation à long terme réduite (Bozdagi et coll., 2010)	(Bozdagi et coll., 2010 ; Peça et coll., 2011)

P8, huitième jour de développement après la naissance ; VGAT (*vesicular GABA transporter*), transporteur du glutamate.

Le gène **CNTNAP2** (*contactin associated protein-like 2*) a attiré un grand intérêt quant à son rôle dans les TSA depuis son implication, à l'origine, dans un syndrome récessif rare décrit chez des familles Amish et caractérisé par une dysplasie corticale, une épilepsie focale et une forte comorbidité avec l'autisme (Strauss et coll., 2006). Une même délétion d'un seul nucléotide provoquant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré a été trouvée chez neuf enfants Amish, tous homozygotes pour cette mutation avec des parents hétérozygotes ; parmi les neuf enfants, six présentent aussi des TSA. Le gène **CNTNAP2** est un membre de la famille des neurexines qui code une protéine membranaire largement exprimée dans le système nerveux. Le cortex des souris homozygotes déficientes pour *Cntnap2* présente des défauts de migration des neurones de projection, avec une mauvaise distribution de ces cellules dans les différentes couches corticales (Penagarikano et coll., 2011) (**Tableau 4**). Ces souris possèdent aussi un nombre réduit d'interneurones dans le striatum et le cortex ainsi qu'une synchronie neuronale altérée au niveau cortical, mesurée par imagerie calcique. Cette dernière observation est particulièrement importante puisque les interneurones sont effectivement connus pour jouer un rôle crucial dans le chronométrage précis de l'activité neuronale (Sohal et coll., 2009). D'un point de vue phénotypique, les souris déficientes pour *Cntnap2* présentent des crises d'épilepsie et des déficits dans les trois domaines comportementaux affectés dans les TSA, c'est-à-dire des déficits de la communication et du comportement social ainsi que des comportements répétés. Il est important de noter que, contrairement aux souris *Cntnap2*^{-/-}, les souris hétérozygotes *Cntnap2*^{+/-} ne présentent aucun phénotype comportemental ou cellulaire anormal, ce qui pose question sur l'impact des anomalies affectant un seul allèle de ce gène. Ces résultats suggèrent que l'activité neuronale non équilibrée et asynchrone, résultant probablement de défauts dans l'architecture des circuits neuronaux, seraient à la base des troubles comportementaux observés chez les souris déficientes pour *Cntnap2*. De plus, cette étude suggère que l'analyse du fonctionnement des interneurones chez les patients atteints de dysplasie corticale et d'épilepsie focale serait digne d'intérêt.

SHANK

Les protéines SHANK sont des protéines d'échafaudage abondantes au niveau de la densité post-synaptique où elles interagissent avec les neuroligines. Comme décrit précédemment, des mutations et des délétions du gène **SHANK3** sont responsables du syndrome de délétion 22q13, fortement associé aux TSA (**Partie II**). De plus, des délétions et une mutation du gène **SHANK2** ont été identifiées chez des sujets atteints de TSA et/ou de déficience intellectuelle (Berkel et coll., 2010 ; Pinto et coll., 2010). Les protéines SHANK étant localisées exclusivement au niveau des synapses glutamatergiques, des défauts de la transmission excitatrice ont été détectés chez des souris déficientes pour *Shank3* (Bozdagi et coll., 2010 ; Peça et coll., 2011) et *Shank2* (Schmeisser et coll., 2012), bien que ces résultats n'aient pas toujours été retrouvés dans d'autres modèles de souris déficientes pour ces gènes mais portant des délétions différentes (pour revue, voir Jiang et Ehlers, 2013) (**Tableau 4**). De la même manière, une diminution des courants post-synaptiques excitateurs a été détectée chez les souris *Shank1*^{-/-} (Hung et coll., 2008). Ainsi, il est probable que les protéines SHANK régulent la balance E/I par une action spécifique sur la neurotransmission excitatrice.

3.2.2 MECP2

Le syndrome de Rett est un syndrome sévère qui se manifeste principalement chez les filles (pour revue, voir Chahrour et Zoghbi, 2007). Les premières manifestations apparaissent en général entre six et dix-huit mois puis progressent tout au long de l'enfance et de l'adolescence. Les principales caractéristiques du syndrome sont une microcéphalie, une hypotonie, des altérations sévères du langage, des déficits cognitifs, des TSA, des comportements stéréotypés et des problèmes respiratoires. Le syndrome de Rett est causé par des mutations et des délétions du gène **MECP2** (*methyl-CpG-binding protein 2*), localisé sur le chromosome X. MECP2 est une protéine nucléaire exprimée de façon ubiquitaire dans le cerveau, qui lie l'ADN méthylé et fonctionne en tant

que répresseur transcriptionnel. Chez la souris, les délétions de *Mecp2* dans le système nerveux, reproduisent la plupart des phénotypes neurologiques caractéristiques du syndrome de Rett (Chen et coll., 2001 ; Guy et coll., 2001). Cependant, les délétions conditionnelles du gène, limitées à des sous-types neuronaux spécifiques ou des régions particulières du cerveau, entraînent l'apparition de certaines des caractéristiques cliniques du syndrome (Figure 32) (pour revue, voir Marin, 2012).

Après avoir observé que l'expression de *Mecp2* est environ deux fois plus élevée dans les neurones GABAergiques que dans les neurones non GABAergiques, Chao et coll. (2010) ont généré une souris déficiente pour *Mecp2* uniquement dans les neurones GABAergiques (*Viaat-Mecp2^{-f/y}*) (Figure 32). Ces souris présentent de nombreuses altérations comportementales rappelant le syndrome de Rett, comme des mouvements stéréotypés, des déficits d'apprentissage et de mémoire, une hyperexcitabilité et des problèmes respiratoires. Ils ont ensuite réalisé un modèle de souris dans lequel *Mecp2* est délété spécifiquement dans les neurones GABAergiques du cerveau antérieur (*Dlx5/6-Mecp2^{-f/y}*) (Figure 32). De la même façon, les auteurs ont observé que le phénotype de ces souris récapitule la plupart des caractéristiques cliniques du syndrome de Rett. Leurs résultats montrent que *Mecp2* est critique pour la fonction normale des neurones GABAergiques, particulièrement dans le cerveau antérieur. L'ensemble des résultats obtenus à partir des nombreux modèles de souris déficientes pour *Mecp2* montre que l'absence de cette protéine dans certains systèmes neuronaux est suffisante pour reproduire de nombreuses caractéristiques cliniques du syndrome de Rett. Donc la fonction de *Mecp2* semble cruciale dans certains circuits de neurones et pas dans d'autres, suggérant fortement que le syndrome de Rett émerge du fonctionnement anormal de populations neuronales spécifiques. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore inconnus, mais il est probable que certains gènes dont l'expression dépend de la protéine MECP2 soient particulièrement importants.

Brain region	Genetic deletion	Repetitive behaviour	Motor incoordination	Ataxia	Breathing irregularities	Anxiety	Social interaction	Aggressive behaviour
	Nestin-Cre; <i>Mecp2^{lox/y}</i> CNS neurons		+	+	+	+		
	TH-Cre; <i>Mecp2^{lox/y}</i> Catecholaminergic neurons	-	+		-	-	-	-
	<i>Pet1</i> -Cre; <i>Mecp2^{lox/y}</i> Serotonergic neurons	-	-		-	-	-	+
	<i>Sim1</i> -Cre; <i>Mecp2^{lox/y}</i> Hypothalamic neurons					+		+
	<i>CaMKIIα</i> -Cre; <i>Mecp2^{lox/y}</i> Pyramidal cells in the cortex and GABAergic neurons in the striatum		+			+	+	
	<i>Viaat</i> -Cre; <i>Mecp2^{lox/y}</i> GABAergic neurons	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Dlx5/6</i> -Cre; <i>Mecp2^{lox/y}</i> GABAergic neurons in the forebrain	+	+	+	-	-	+	-

Figure 32. Fonction de *Mecp2* dans différentes régions du cerveau de souris.

Mecp2 est largement exprimé dans le cerveau. Les analyses comportementales de souris mutantes conditionnelles ont mis en évidence la contribution de différents circuits neuronaux aux déficits fonctionnels observés chez les souris déficientes pour *Mecp2*. Les signes « + » et « - » indiquent la présence ou l'absence d'un phénotype particulier (figure tirée de Marin, 2012).

3.2.3 La protéine FMRP

Le syndrome de l’X fragile est causé par des mutations dans le gène *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*), localisé sur le chromosome X. La protéine FMRP (*fragile X mental retardation protein*), codée par ce gène, possède des motifs de séquence caractéristiques des protéines pouvant se lier aux ARN messagers, indiquant son rôle de modulateur de la synthèse protéique. Pour mieux comprendre sa fonction, plusieurs études ont cherché à identifier ses ARNm cibles (Darnell et coll., 2011 ; Ascano et coll., 2012) et ont identifié de nombreux transcrits codant des protéines impliquées dans la fonction et la maturation neuronale ainsi que dans la plasticité synaptique. FMRP est abondamment distribuée dans le cerveau au cours de l’embryogenèse chez la souris puis son expression diminue dans certains tissus à l’âge adulte.

L’analyse postmortem du cerveau de sujets atteints du syndrome de l’X fragile a dévoilé des anomalies faisant penser à un défaut de développement et/ou d’élimination des neurones (Irwin et coll., 2001). Ces patients présentent un excès d’épines dendritiques immatures, plus fines et plus longues, comparées à celles présentes dans un cerveau normal.

Dans les neurones, la synthèse protéique qui a lieu au niveau des corps cellulaires et des épines dendritiques est importante pour la plasticité synaptique, un processus permettant de déclencher dans le cerveau des changements durables de la force synaptique, que l’on appelle la potentialisation et la dépression à long terme (*long-term potentiation*, LTP et *long-term depression*, LTD). Au cours du développement, la LTP semble être importante pour maintenir des synapses nouvelles, alors que la LTD permet au contraire de les éliminer. Ces mêmes mécanismes contribuent à l’apprentissage et à la mémoire pendant la vie adulte. Au niveau post-synaptique, la LTD peut être déclenchée par l’activation des récepteurs métabotropiques du glutamate ou des récepteurs NMDA, suite à la liaison du glutamate. L’activation des récepteurs mGluR de groupe 1 entraîne aussi la synthèse de nombreuses protéines synaptiques. FMRP permet de réguler cette synthèse protéique ; ainsi, en son absence, cette traduction est accélérée et aboutit à une fonction synaptique aberrante qui contribue aux altérations cognitives et comportementales caractéristiques du syndrome de l’X fragile (pour revue, voir Penagarikano et coll., 2007).

Plusieurs modèles de souris du syndrome de l’X fragile ont été générés, qui présentent des caractéristiques analogues à celles observées chez les patients, comprenant une macro-orchidie, des défauts d’apprentissage, des comportements répétés et une hyperactivité (pour revue, voir Paluszkiwicz et coll., 2011). Au niveau cellulaire et physiologique, des défauts des épines dendritiques ainsi qu’une plasticité synaptique altérée ont été observés chez les souris déficientes pour *Fmr1* (Nimchinsky et coll., 2001 ; Huber et coll., 2002). Alors que les résultats précédents évoquent des défauts de transmission excitatrice responsables du syndrome de l’X fragile, plusieurs études rapportent aussi des dysfonctionnements notables de la fonction inhibitrice et de la transmission GABAergique chez les souris déficientes pour *Fmr1* (Paluszkiwicz et coll., 2011) (Figure 33).

Région	Système inhibiteur	Référence
Cortex somatosensoriel	Diminution de la densité des interneurones positifs pour la parvalbumine, altération de la distribution dans les couches corticales	Selby et coll., 2007
Subiculum	Altération de la transmission GABAergique	Curia et coll., 2009
Amygdale	Réduction du nombre de synapses inhibitrices, diminution de GAD65/67	Olmos-Serrano et coll., 2010
Striatum	Augmentation de la transmission inhibitrice, augmentation de la libération de GABA	Centonze et coll., 2008

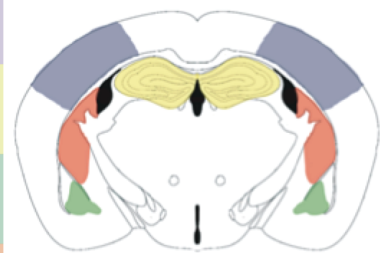


Figure 33. Altérations de la neurotransmission inhibitrice dans le cerveau des souris déficientes pour *Fmr1*. Les défauts varient selon les régions. GAD65/67 : enzymes de synthèse du GABA (figure tirée de Paluszkiwicz et coll., 2011).

La compréhension des mécanismes responsables de ces altérations s'avère compliquée puisque des défauts pléiotropes sont reportés dans différentes études, pouvant toucher le nombre d'interneurones, les récepteurs GABA_A ou encore les enzymes de synthèse du GABA. Par exemple, Selby et coll. (2007) ont montré une diminution significative de la densité d'un sous-type particulier d'interneurones, spécifiquement dans le cortex somatosensoriel de souris déficientes pour *Fmr1* (Figure 33). La distribution de ces cellules dans les différentes couches corticales est aussi altérée. Dans le subiculum cette fois, des anomalies de la transmission GABAergique et une diminution de l'expression de certaines sous-unités des récepteurs GABA_A ont été reportées en l'absence de FMRP (Curia et coll., 2009). Il a aussi été montré que la transmission GABAergique est affectée chez les souris déficientes pour *Fmr1* au niveau de l'amygdale (Olmos-Serrano et coll., 2010) et du striatum (Centonze et coll., 2008), où elle est respectivement diminuée et augmentée. Dans l'amygdale, les auteurs n'ont pas observé d'altération du nombre d'interneurones mais une réduction spécifique du nombre de synapses inhibitrices, sans altération du nombre de synapses excitatrices (Olmos-Serrano et coll., 2010). Ils ont aussi observé un niveau diminué de GAD65 et GAD67, les deux enzymes de synthèse du GABA. L'ensemble de ces résultats démontre encore une fois que des anomalies de la transmission inhibitrice et donc un déséquilibre de la balance E/I sont détectées chez des souris mutantes pour un gène responsable d'un syndrome fortement associé aux TSA. Dans le cas de l'X fragile, les modifications de la fonction GABAergique observées chez les souris déficientes pour *Fmr1* sont multiples et dépendent de la région du cerveau étudiée.

En conclusion, le développement du cerveau est un processus dynamique dans lequel l'hétérogénéité prédomine. Par exemple, certains neurones pyramidaux adjacents peuvent être très différents à un temps donné : silencieux ou riches en contacts synaptiques, avec une faible ou une forte concentration intracellulaire en ions chlorure, etc. De la même façon, les interneurones sont extrêmement hétérogènes, avec des voies de migration diverses et différents modes d'inhibition, leur permettant de contrôler la génération des oscillations synchronisées dans les réseaux neuronaux. Les toutes premières phases du développement du cerveau dépendent d'un programme génétique déterminé. Puis les étapes ultérieures sont modulées par l'apparition d'une activité électrique immature dans le système nerveux central. Le rôle des interneurones inhibiteurs est essentiel pour la mise en place de cette activité électrique qui permet la maturation et l'affinage des circuits neuronaux en développement. Leur action permet *in fine* d'aboutir à des réseaux de neurones dans lesquels la balance E/I est finement régulée.

L'hypothèse que des altérations du système inhibiteur au cours du développement entraînant une dérégulation de la balance E/I seraient à la base de certains troubles neurodéveloppementaux comme les TSA est de plus en plus forte. Il est clair, d'après les études citées précédemment, qu'une modification du niveau d'inhibition peut avoir des effets délétères sur la fonction des neurones concernés. Des perturbations dans le développement du système inhibiteur, depuis la génération et la migration des interneurones, jusqu'à la formation et le fonctionnement de leurs connexions synaptiques, peuvent aboutir à des anomalies neurologiques sévères. Bien que les causes et les manifestations des troubles neurodéveloppementaux considérés auparavant soient différentes, la dérégulation de la fonction inhibitrice émerge comme un thème commun. Pour certains troubles neuropsychiatriques, il est possible que d'autres mécanismes physiopathologiques additionnels soient perturbés, contribuant ainsi à la complexité des phénotypes. La balance E/I pouvant être perturbée par un changement de l'excitation ou de l'inhibition, il existe aussi de nombreux exemples d'une dérégulation du système exciteur, comme c'est le cas des souris déficientes pour le gène *Shank3*. Jusqu'alors, les études se sont focalisées principalement sur les systèmes GABAergique et glutamatergique et même si les preuves manquent encore aujourd'hui, il est très probable que le système glycinergique soit aussi, via son rôle dans la régulation de la balance E/I, impliqué dans certaines formes de TSA. Finalement, quelque soit le système de neurotransmission considéré, les anomalies peuvent toucher les

neurotransmetteurs eux-mêmes, leurs récepteurs, leurs principales enzymes de synthèse ou encore leurs transporteurs spécifiques. Toutes peuvent contribuer à un déséquilibre de la balance E/I à un niveau synaptique qui pourra ensuite influencer le fonctionnement des circuits neuronaux et participer aux troubles comportementaux. D'un point de vue clinique, l'étude de ces nombreux acteurs du maintien de la balance E/I offre des perspectives thérapeutiques nouvelles, potentiellement applicables à de nombreuses maladies neuropsychiatriques comme l'épilepsie, les TSA, la déficience intellectuelle et la schizophrénie.

Aujourd'hui, même si de nombreuses études vont dans le sens de cette hypothèse, elle n'est pas encore universellement acceptée en tant que mécanisme physiopathologique à la base de certaines formes de TSA. Les nouveaux outils d'optogénétique qui permettent d'activer ou d'inhiber sélectivement des populations de neurones et d'étudier directement les conséquences fonctionnelles de ces changements aideront certainement à trancher dans les années à venir.

Les études génétiques de notre équipe sont effectuées chez les familles de la cohorte PARIS (*Paris Autism Research International Study*), dont le recueil a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre plusieurs sites Européens et aux Etats-Unis. Cette cohorte est constituée de plus de 700 familles ayant un ou plusieurs enfants atteints de TSA idiopathique ; les patients chez qui nous avons déjà identifié une étiologie sont exclus.

Depuis plusieurs années, notre équipe participe au consortium international *Autism Genome Project* (AGP), un projet collaboratif ayant pour but de réaliser une analyse pangénomique par micropuces à haute résolution sur un très grand nombre de patients. Le consortium AGP est constitué de nombreux groupes travaillant sur la génétique de l'autisme aux Etats-Unis, au Canada et en Europe. Chaque équipe du consortium fournit les informations phénotypiques et les échantillons d'ADN de ses propres patients ; le génotypage par micropuce et l'analyse des CNV sont centralisés. Les résultats sont ensuite stockés dans une base de données accessible aux membres. Notre équipe s'est chargée de la recherche de CNV potentiellement pathogènes dans l'ensemble de la cohorte et ceux-ci ont ensuite été validés par les différents groupes.

Ainsi, l'AGP a regroupé près de 3 000 familles dont le génotypage par puce à été réalisé en deux parties (phases 1 et 2), chacune incluant ~1 500 familles. Grâce à notre participation à ce consortium, 282 familles de notre cohorte PARIS ont pu être analysées par puces. Les analyses des CNV réalisées par l'AGP ont donné lieu à deux articles, correspondant aux deux phases de l'étude (Pinto et coll., 2010 ; Pinto et coll., soumis).

Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à analyser les CNV des familles de l'étude PARIS, obtenus à partir des micropuces lors de la phase 1 de l'étude de l'AGP (**Article 1, Impact fonctionnel des CNV rares dans les troubles du spectre autistique**, Pinto et coll., *Nature* 2010). Les analyses se sont concentrées sur les CNV rares et ont permis d'identifier de nombreux CNV pathogènes, ainsi que des gènes nouveaux impliqués pour la première fois dans les TSA, comme *SHANK2*, *SYNGAP1* et *PTCHD1*.

Parmi les CNV détectés par les micropuces dans l'étude de l'AGP, nous avons identifié une délétion du gène *GLRA2* localisée en Xp22.2, chez un patient avec TSA de la cohorte PARIS. Ce gène code une sous-unité des récepteurs de glycine (GlyR) fortement exprimée dans le cerveau au cours du développement. Les GlyR sont impliqués dans la neurotransmission inhibitrice du système nerveux central adulte mais ont une action excitatrice au cours du développement. Nous avons effectué une recherche ciblée de mutations par séquençage de *GLRA2* chez 400 patients de sexe masculin de la cohorte PARIS et identifié une mutation faux sens *de novo* chez un patient. Par la suite, des analyses fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*, chez le poisson zèbre et la souris, ont été réalisées dans le but d'étudier l'implication de ce gène dans les TSA (**Article 2, TSA et neurotransmission glycinergique : analyses génétiques et fonctionnelles**, soumis).

Article 1

Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders

Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Bryson SE, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chung BH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Cytrynbaum C, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green A, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizzi R, Kim C, Klauck SM, Kolevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ, McGrath J, McMahon WM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, **Pilorge M**, Piven J, Ponting CP, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Sequeira AF, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stein O, Sykes N, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapduram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Webber C, Weksberg R, Wing K, Wittmeyer K, Wood S, Wu J, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Devlin B, Ennis S, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Hallmayer J, Miller J, Monaco AP, Nurnberger Jr JI, Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Szatmari P, Vicente AM, Veland VJ, Wijsman EM, Scherer SW, Sutcliffe JS, Betancur C

Nature (2010) 466, 368-372

Article 1. Impact fonctionnel des CNV rares dans les troubles du spectre autistique

Bien que la forte participation de facteurs génétiques rares dans les TSA ait été démontrée, les connaissances de l'architecture génétique des TSA restent incomplètes. Dans cette étude, réalisée dans le cadre du consortium international *Autism Genome Project* (AGP), le rôle des CNV dans l'étiologie des TSA a été analysé par l'utilisation de micropuces Illumina à un million de SNP.

Les analyses se sont concentrées sur les CNV rares, c'est-à-dire présents chez <1 % des sujets (patients, parents et témoins confondus) et ayant une taille ≥ 30 kb afin d'éviter les faux positifs parmi les CNV de petite taille. La comparaison des CNV rares chez 996 cas et 1 287 témoins caucasiens n'a pas montré de différence dans la taille moyenne des CNV rares (183 kb), le nombre moyen de CNV rares par individu ($n=2$), ou la proportion de délétions/duplications (~50 %). En revanche, les patients atteints de TSA ont plus de CNV rares géniques que les sujets témoins (+19 %), en particulier des CNV touchant des gènes ou des loci préalablement impliqués dans l'autisme et/ou la déficience intellectuelle (+69 %).

Au cours de ce travail, de nombreux CNV pathogènes, correspondant à de grands réarrangements chromosomiques ou bien à des syndromes de microdélétion/microduplication, ont été identifiés. De plus, l'analyse des CNV a permis de mettre en évidence des gènes nouveaux, impliqués pour la première fois dans les TSA ; par exemple, deux délétions *de novo* du gène *SHANK2*, une délétion *de novo* de *SYNGAP1* mis en cause dans la déficience intellectuelle non syndromique, ainsi que plusieurs délétions chevauchant ou à proximité du gène *PTCHD1*, sur le chromosome Xp22.1, chez des garçons, héritées de leur mère.

A partir des gènes touchés par des délétions rares chez les cas, une analyse *in silico* des réseaux fonctionnels a permis de mettre en évidence des groupes de gènes ayant une fonction commune ou agissant dans les mêmes voies biologiques. En particulier, la voie cellulaire des GTPases de la famille Ras ainsi que celle des Rho GTPases, toutes deux connues pour réguler le remodelage des épines dendritiques, ou encore des gènes liés à la réorganisation du cytosquelette de microtubules ont été impliqués.

En utilisant les données des micropuces obtenues chez 145 familles de notre cohorte (Etude PARIS) incluses dans cette première étape de l'étude, j'ai analysé les milliers de CNV détectés chez les patients et les parents afin d'identifier ceux jouant un rôle potentiellement pathogène. J'ai sélectionné les CNV les plus intéressants selon plusieurs critères : apparition *de novo*, CNV liés au chromosome X et maternellement transmis à des garçons, CNV affectant des gènes ou loci déjà impliqués dans les TSA et/ou la déficience intellectuelle, CNV récurrents chez des individus atteints et absents chez les témoins, CNV affectant des gènes candidats par leur fonction ou impliqués dans une voie neurobiologique déjà mise en cause dans les TSA. Ceux-ci ont été confirmés par PCR quantitative ou MLPA chez les patients et leurs parents, cartographiés précisément par PCR quantitative ou *Long Range PCR* et la ségrégation a été étudiée dans la fratrie. Parmi les CNV particulièrement intéressants décrits dans l'étude AGP, plusieurs ont été identifiés et confirmés au laboratoire chez des patients de l'Etude PARIS, par exemple :

- une délétion *de novo* de 5,4 Mb de la région 11q24.2-q25, affectant 19 gènes, correspondant au syndrome de délétion 11q24 (syndrome de Jacobsen)
- une délétion *de novo* de 750 kb de la région 9q télomérique, incluant le gène *EHMT1* et correspondant au syndrome de Kleefstra
- une duplication *de novo* de 4,5 Mb de la région 12q13.3-q14.1, affectant 94 gènes, non décrite auparavant
- une délétion *de novo* du gène *SHANK2*, impliquant ce gène pour la première fois dans les TSA
- plusieurs réarrangements du chromosome X, transmis maternellement à des garçons et affectant des gènes impliqués dans la déficience intellectuelle ainsi que des nouveaux gènes candidats par leur fonction.

Cette étude, la plus vaste réalisée à l'époque avec des puces à ADN à très haute résolution, souligne le rôle considérable des CNV rares comme facteurs étiologiques dans les TSA. L'ensemble des résultats démontre la

remarquable hétérogénéité étiologique existant dans les TSA, puisque tous les CNV pathogènes retrouvés sont très rares, présents chez un seul ou quelques patients tout au plus. Par ailleurs, les résultats confirment le profond chevauchement étiologique entre la déficience intellectuelle et les TSA. Enfin, l'analyse des CNV constitue une source importante de pistes pour l'identification de gènes candidats et de voies neurobiologiques mises en cause dans l'autisme.

Note : Le Supplément de cet article faisant 74 pages, il n'a pas été joint au manuscrit. Il peut être consulté sur le site de *Nature*.

LETTERS

Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders

A list of authors and their affiliations appears at the end of the paper.

The autism spectrum disorders (ASDs) are a group of conditions characterized by impairments in reciprocal social interaction and communication, and the presence of restricted and repetitive behaviours¹. Individuals with an ASD vary greatly in cognitive development, which can range from above average to intellectual disability². Although ASDs are known to be highly heritable (~90%)³, the underlying genetic determinants are still largely unknown. Here we analysed the genome-wide characteristics of rare (<1% frequency) copy number variation in ASD using dense genotyping arrays. When comparing 996 ASD individuals of European ancestry to 1,287 matched controls, cases were found to carry a higher global burden of rare, genic copy number variants (CNVs) (1.19 fold, $P = 0.012$), especially so for loci previously implicated in either ASD and/or intellectual disability (1.69 fold, $P = 3.4 \times 10^{-4}$). Among the CNVs there were numerous *de novo* and inherited events, sometimes in combination in a given family, implicating many novel ASD genes such as *SHANK2*, *SYNGAPI*, *DLGAP2* and the X-linked *DDX53-PTCHD1* locus. We also discovered an enrichment of CNVs disrupting functional gene sets involved in cellular proliferation, projection and motility, and GTPase/Ras signalling. Our results reveal many new genetic and functional targets in ASD that may lead to final connected pathways.

Twin and family studies indicate a predominantly genetic basis for ASD susceptibility and provide support for considering these disorders as a clinical spectrum. Some 5–15% of individuals with an ASD have an identifiable genetic aetiology corresponding to known rare single-gene disorders (for example, fragile X syndrome) and chromosomal rearrangements (for example, maternal duplication of 15q11-q13). Rare mutations have been identified in synaptic genes, including *NLGN3*, *NLGN4X* (ref. 4) and *SHANK3* (ref. 5), and microarray studies have revealed copy number variation (CNV) as risk factors⁶. CNV examples include *de novo* events observed in 5–10% of ASD cases^{7–9}, *de novo* or inherited hemizygous deletions and duplications of 16p11.2 (refs 9–11) and *NRXN1* (ref. 7), and exceptionally rare homozygous deletions in consanguineous families¹². Genome-wide association studies using single nucleotide polymorphisms (SNPs) have highlighted two potential ASD risk loci at 5p14.1 (ref. 13) and 5p15.2 (ref. 14), but these data indicate that common variation will account for only a small proportion of the heritability in ASD.

To delineate further the contribution of rare genomic variants to autism we genotyped 1,275 ASD cases and their parents using the Illumina Infinium 1M single SNP microarray (Fig. 1). A set of 1,981 controls used for comparison studies was genotyped on the same platform¹⁵ and both data sets were subjected to the same quality control procedures. Ultimately, we analysed 996 ASD cases (876 trios) and 1,287 controls of European ancestry to minimize confounds due to population differences (Supplementary Figs 1 and 2 and Supplementary Table 1)¹⁶.

Two CNV prediction algorithms (QuantiSNP¹⁷ and iPattern (unpublished data)) and additional extensive quality control procedures were used to establish a stringent data set of non-redundant CNVs

called by both algorithms in an individual (Fig. 1, Supplementary Tables 1–3 and Supplementary Fig. 3). This stringent data set of 5,478 rare CNVs in 996 cases and 1,287 controls of European ancestry (Supplementary Table 4) had the following characteristics: (1) CNV present at <1% frequency in the total sample (cases and controls); (2) CNV ≥ 30 kb in size (because >95% of these could be confirmed); and (3) all CNVs further verified using combined evidence from the PennCNV algorithm¹⁸ and child–parent intensity fold changes, genotype proportions (to verify deletions) and visual inspection (for chromosome X).

We assessed the impact of rare CNV in cases compared to controls using three primary measures of CNV burden: the number of CNVs per individual, the estimated CNV size, and the number of genes affected by CNVs (Table 1). No significant difference was found in the former two

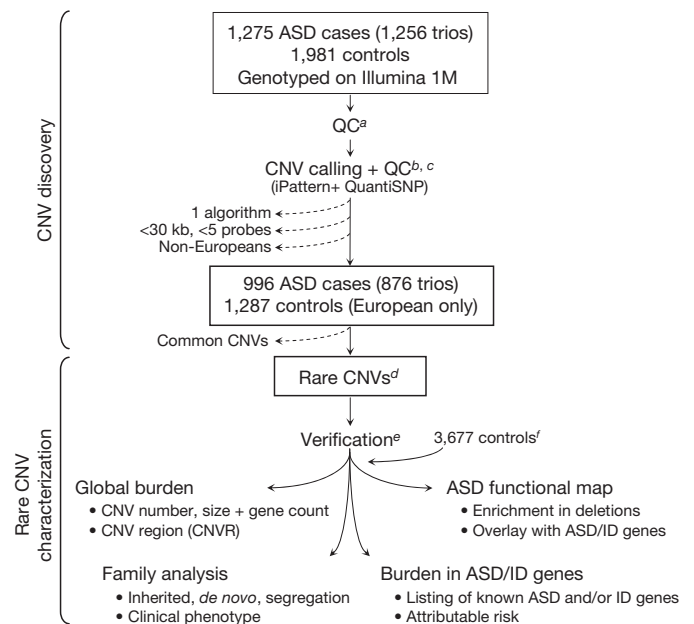


Figure 1 | CNV discovery and characterization. Comprehensive procedures were used to identify the rare CNV data set (boxed). Dashed arrows indicate CNVs not included in downstream analyses. Labels *a–f* are as follows: *a*, SNP and intensity quality control (QC) with ancestry estimation; *b*, QC for CNV calls; *c*, pilot validation experiments using quantitative PCR were used to evaluate the false discovery rate; *d*, rare CNVs in samples of European ancestry were defined as ≥ 30 kb in size and present in the total sample set at a frequency <1%. A total of 70 out of 996 (17%) of ASD cases were analysed on different lower-resolution arrays in previous studies^{9,10,28}. Label *e* indicates that all CNVs were computationally verified and at least 40% of case CNVs were also experimentally validated by qPCR and/or independent Agilent or other SNP microarrays; *f*, 3,677 additional European ancestry controls were used to test specific loci from the primary burden analyses. Additional details are in the Methods and Supplementary Information. ID, intellectual disability.

Table 1 | Global burden of genic rare CNVs in cases versus controls

Type	Classification	Total CNVs (n)	P	Case/control ratio	Baseline rate (ctrl)	P _{corr}
All	None	5,478	0.012*	1.19	3.59	0.003*
	All	2,757	0.008*	1.26	1.08	0.006*
	All	2,721	0.072	1.16	2.51	0.015*
All	None	1,831	0.058	1.26	1.03	0.062
	2–6×	1,419	0.375	1.03	0.83	0.180
	1×	1,094	0.004*	1.57	0.43	0.011*
Deletions only	2–6×	880	0.036*	1.26	0.30	0.036*
	1×	977	0.203	1.16	1.05	0.118
	1×	896	0.749	0.92	0.72	0.442
All	None	5,086	0.313	1.03	2.72	0.181
	30–500 kb	392	0.005*	1.69	0.88	0.005*
	≥500 kb	2,645	0.004*	1.24	0.85	0.004*
Deletions only	30–500 kb	112	0.209	1.32	0.23	0.143
	≥500 kb	2,441	0.801	0.93	1.86	0.518
	≥500 kb	280	0.007*	1.82	0.65	0.012*

Table 1 shows gene count in cases versus controls. Total burden for genes intersected by CNVs in ASD cases (n = 996) compared to controls (n = 1,287). Gene coordinates were defined by the RefSeq boundaries plus a 10-kb region on either side. All genomic analyses used NCBI Build 36. Genome-wide P-values were estimated in 100,000 permutations (one-sided) and additionally corrected (P_{corr}) for global case–control differences in CNV rate and size. Analyses were further stratified according to CNV type ('deletions only' and 'duplications only') and frequency (single occurrences (1×) or CNVs observed two to six times in the total sample (2–6×)). Note that for the two lower-frequency groups, the 'deletions only' and 'duplications only' counts are not expected to sum to the 'all' count (see ref. 26 and Supplementary Information).

* Significant differences (P ≤ 0.05) are indicated.

measures (Supplementary Tables 4a and 5), even after controlling for fine-level ancestry differences by pair-matching cases and controls (Supplementary Information)¹⁶. In contrast, we discovered a significant increase in the number of genes intersected by rare CNV in cases when focusing on gene-containing segments (1.19-fold increase, empirical

P = 0.012). This ASD association with genic CNV was stronger for deletions (1.26-fold increase, empirical P = 8.0 × 10⁻³). These differences remained after we further controlled for potential case–control differences that could be present due to biological differences or technical biases. Restricting our analysis to autosomal CNVs (that is, after removing CNVs located on chromosome X) also resulted in a consistent enriched gene count in ASD cases compared to controls. Single-occurrence CNV deletions had increased rates in ASD cases over controls, indicating that some could be pathogenic.

We then examined parent–child transmission and confirmed that 5.7% (50 out of 876) of ASD cases had at least one *de novo* CNV with >0.6% carrying two or more *de novo* events (Supplementary Tables 4a, 6 and 7). The *de novo* CNV rate in our simplex and multiplex families was 5.6% (22 out of 393) and 5.5% (19 out of 348), respectively, in contrast with previous studies showing a higher rate in simplex families^{8,9}. A total of 226 validated *de novo* (7) and inherited (219) CNVs not observed in controls and affecting single genes were found (Supplementary Table 8).

Numerous novel candidate ASD loci such as *SHANK2*, *SYNGAP1* and *DLGAP2* were identified on the basis of the observation that *de novo* CNV affects these genes in cases but not controls (Supplementary Table 6). The relatedness of *SHANK2* to the causal ASD gene *SHANK3* (ref. 5), involvement of *SYNGAP1* in intellectual disability¹⁹, and interaction of *DLGAP* family proteins with *SHANK* proteins²⁰ further support their role in ASDs. Maternally inherited X-linked deletions at *DDX53–PTCHD1* (7 cases) implicate this locus in ASD. We tested an additional 3,677 European ancestry controls (Fig. 1) and again found no CNV at these genes, and *DDX53–PTCHD1* emerged as a significant ASD risk factor (P = 3.1 × 10⁻³ with the initial 1,287 controls; P = 3.6 × 10⁻⁶ with combined controls; Supplementary Fig. 4).

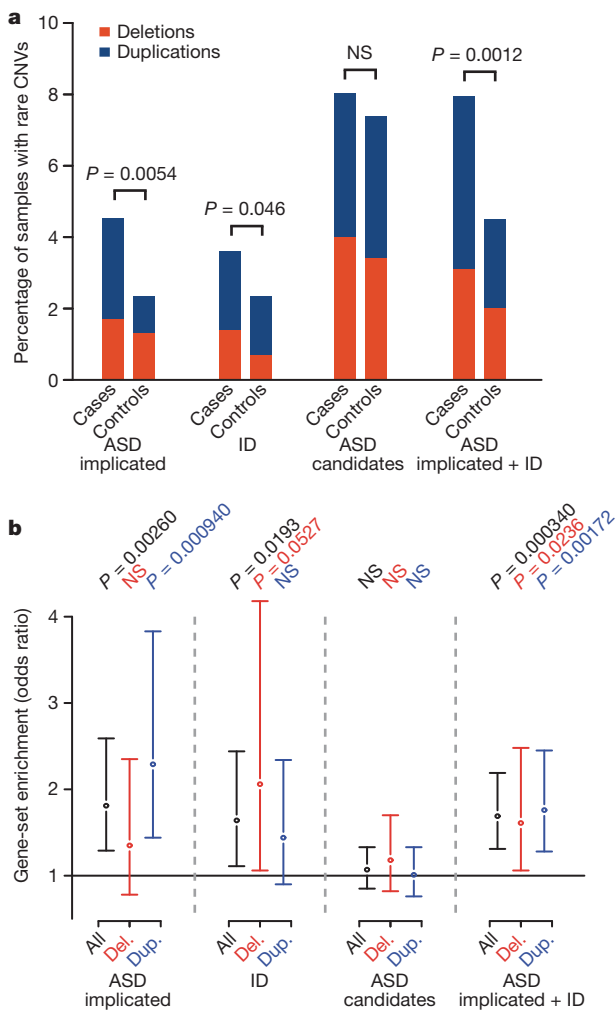


Figure 2 | CNV burden in known ASD and/or intellectual disability genes. **a**, Proportion of samples with CNVs overlapping genes and loci known to be associated in ASD with or without intellectual disability (ID) or intellectual disability only, as well as published candidate genes and loci for ASD (Supplementary Table 9). To select for CNVs with maximal impact, they needed to intersect genes and overlap the target loci by ≥50% of their length. Fisher's exact test P-values for significant differences (P ≤ 0.05, one tailed) are shown. NS, not significant. **b**, Enrichment analysis for genes overlapped by rare CNVs in cases compared to controls for the three gene sets in **a**, relative to the whole genome. Odds ratio and 95% confidence intervals are given for each gene set. Empirical P-values for gene-set enrichment are indicated above each odds ratio. All P-values < 0.1 are listed.

Association studies of individual rare CNV often have insufficient power to discriminate benign from disease-causing variants. Here, we assessed whether genes and CNVs previously associated with ASD and/or intellectual disability were enriched in cases compared with controls, in order to help identify pathogenic events. We defined three gene lists based on evidence from previous studies of their involvement in ASDs (Supplementary Table 9): (1) 'ASD implicated' list consisting of 36 disease genes and 10 loci strongly implicated in ASD and identified in subjects with ASD or ASD and intellectual disability; (2) 'intellectual disability' consisting of 110 disease genes and 17 loci implicated in intellectual disability but not yet in ASD; and (3) 'ASD candidates' including 103 genes from previous studies of common and rare variants.

We observed a higher proportion of cases with rare CNVs overlapping 'ASD implicated' disease genes compared to controls (4.3% versus 2.3%, Fisher exact test $P = 5.4 \times 10^{-3}$; Fig. 2a), corresponding to a significant enrichment for genes in this set (odds ratio (OR) = 1.8; 95% confidence interval (CI) 1.3–2.6, empirical $P = 2.6 \times 10^{-3}$; Fig. 2b, see also Supplementary Information). This effect was stronger for duplications, which may also disrupt genes (OR = 2.3; 95% CI 1.4–3.8, empirical $P = 9.4 \times 10^{-4}$). Enrichment was also found for rare CNVs overlapping intellectual disability genes, more notably for deletions (OR = 2.1; 95% CI 1.1–4.2, empirical $P = 0.053$). In contrast, there was no evidence of enrichment among case CNVs compared to control CNVs for genes in the ASD candidates set (empirical $P > 0.3$). When the two disease gene sets 'ASD implicated' and 'intellectual disability' were combined, we observed 7.6% of cases with rare CNVs preferentially affecting ASD/intellectual disability genes compared to 4.5% in controls (Fisher exact test $P = 1.2 \times 10^{-3}$; Fig. 2a). The observed enrichments did not change when potential case–control genome-wide differences for CNV rate and size were considered.

Our global analyses of these putative pathogenic loci use subjective boundaries for CNV overlap. Manual inspection of the data yields more accurate results. After eliminating CNVs that are less likely to have an aetiological role (heterozygous CNVs that disrupt autosomal recessive loci, events outside the critical region of overlap of genomic

disorders, X-linked genes in females inherited from non-ASD fathers, duplications inherited from non-ASD parents, and intronic CNVs in *NRXN1*), 25 CNVs remained in the ASD group, compared to only four in the controls ($P = 3.6 \times 10^{-6}$; Supplementary Table 10). Moreover, the latter four CNVs were all duplications at 1q21.1, 16p11.2 or 22q11.2, loci known to exhibit incomplete penetrance and variable expressivity⁶. The population attributable risk provided by the combination of all ASD CNVs that overlap ASDs and/or intellectual disability genes is estimated to be 3.3% (Supplementary Table 11). We also identified rare *de novo* chromosomal abnormalities and large CNVs likely to be aetiological (Supplementary Table 10).

We then tested for functional enrichment of gene sets among those genes affected by CNVs to identify biological processes involved in ASD (Fig. 3). Here, the term gene set refers to groups of genes that share a common function or operate in the same pathway. Such a functional enrichment mapping approach can combine single-gene effects into biologically meaningful groups²¹.

We compiled comprehensive collections of gene sets (Supplementary Table 12) and used the Fisher's exact test to assess which gene sets were more frequently affected by rare CNV events in ASD cases compared to controls. An estimate of the false-discovery rate (FDR) at each gene set was obtained by random permutation of case and control labels (Supplementary Information). To visualize enriched gene sets, overlap scores were used to organize these sets graphically into a functional enrichment map (or network) using Cytoscape²². We identified the 'seed' gene sets for the network at an FDR q -value of 5% and further relaxed the thresholds to 12.5% to better capture the network topology²³.

Using these criteria only deletions were found to be significantly enriched in gene sets in cases over controls (Supplementary Fig. 5), consistent with the global burden results (Table 1). Specifically, 76 gene sets affected by deletions (2.18% of sets tested) were found to be enriched and used to construct a functional map (Fig. 3a and Supplementary Figs 6 and 7). We tested for possible bias, including measures of CNV size and number for cases versus controls per gene set, as well as genome proximity, but no differences were found that

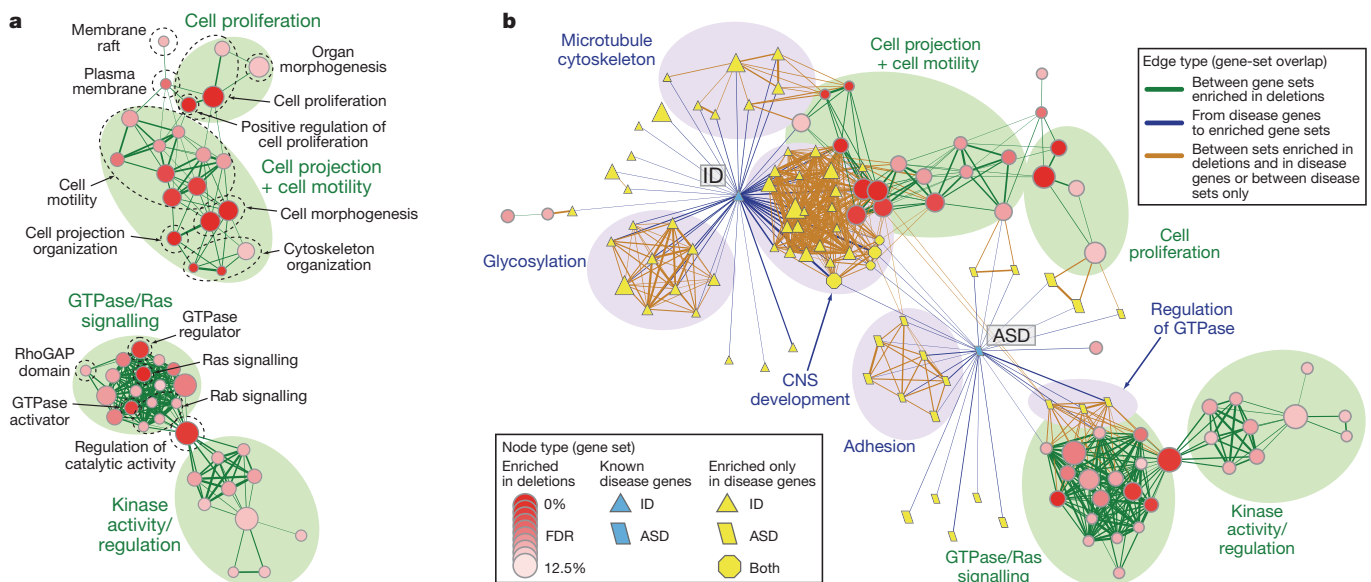


Figure 3 | A functional map of ASD. Enrichment results were mapped as a network of gene sets (nodes) related by mutual overlap (edges), where the colour (red, blue or yellow) indicates the class of gene set. Node size is proportional to the total number of genes in each set and edge thickness represents the number of overlapping genes between sets. **a**, Gene sets enriched for deletions are shown (red) with enrichment significance (FDR q -value) represented as a node colour gradient. Groups of functionally related gene sets are circled and labelled (groups, filled green circles; subgroups, dashed line). **b**, An expanded enrichment map shows the

relationship between gene sets enriched in deletions (**a**) and sets of known ASD/intellectual disability genes. Node colour hue represents the class of gene set (that is, enriched in deletions, red; known disease genes (ASD and/or intellectual disability (ID) genes), blue; enriched only in disease genes, yellow). Edge colour represents the overlap between gene sets enriched in deletions (green), from disease genes to enriched sets (blue), and between sets enriched in deletions and in disease genes or between disease gene-sets only (orange). The major functional groups are highlighted by filled circles (enriched in deletions, green; enriched in ASD/intellectual disability, blue).

might explain the observed enrichments (Supplementary Figs 8 and 9).

We identified enrichments in gene sets known to be involved in ASDs and also discovered new candidate ASD pathways (Fig. 3a and Supplementary Table 13). For example, gene sets involved in cell and neuronal development and function (including projection, motility and proliferation) previously reported in ASD-associated phenotypes were identified²⁴. Novel observations included gene sets involved in GTPase/Ras signalling, with component Rho GTPases known to be involved in regulating dendrite and spine plasticity and associated with intellectual disability. We also found a tentative link to sets in the kinase activity/regulation functional group where only minorities of these sets meet a stringent 5% FDR q -value threshold (Supplementary Fig. 10).

We further assessed the relationship of our functional enrichment map with known ASD/intellectual disability genes (Fig. 3b and Supplementary Fig. 11) and found genes enriched in sets linked to microtubule cytoskeleton, glycosylation and CNS development/adhesion²⁵. The two groups of genes found to be enriched in deletions (Fig. 3a) also displayed connectivity to the ASD/intellectual disability disease gene sets, either directly or through intermediates (Fig. 3b and Supplementary Fig. 12). Although ASD genes seem to be enriched in different subsets of genes compared to intellectual-disability-only genes, we cannot discount the possibility that this is the result of selection bias, and we expect that more intellectual disability genes may yet be linked to ASD.

Our findings provide strong support for the involvement of multiple rare genic CNVs, both genome-wide and at specific loci, in ASD. These findings, similar to those recently described in schizophrenia²⁶, suggest that at least some of these ASD CNVs (and the genes that they affect) are under purifying selection²⁷. Genes previously implicated in ASD by rare variant findings have pointed to functional themes in ASD pathophysiology^{6,28}. Molecules such as NRXN1, NLGN3/4X and SHANK3, localized presynaptically or at the post-synaptic density (PSD), highlight maturation and function of glutamatergic synapses. Our data reveal that *SHANK2*, *SYNGAP1* and *DLGAP2* are new ASD loci that also encode proteins in the PSD. We also found intellectual disability genes to be important in ASD²⁹. Furthermore, our functional enrichment map identifies new groups such as GTPase/Ras, effectively expanding both the number and connectivity of modules that may be involved in ASD. The next step will be to relate defects or patterns of alterations in these groups to ASD endophenotypes. The combined identification of higher-penetrance rare variants and new biological pathways, including those identified in this study, may broaden the targets amenable to genetic testing and therapeutic intervention.

METHODS SUMMARY

Raw data from ASD family (accession phs000267.v1.p1) and SAGE control (Accession: phs000092.v1.p1) genotyping are at NCBI dbGAP. CNVs were analysed using PLINK v1.07³⁰, R stats and custom scripts. See Supplementary Information for details. A list of all CNVs passing quality control is available in Supplementary Table 8.

Received 3 December 2009; accepted 7 May 2010.

Published online 9 June 2010.

1. Veenstra-Vanderweele, J., Christian, S. L. & Cook, E. H. Jr. Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 379–405 (2004).
2. Chakrabarti, S. & Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am. J. Psychiatry* **162**, 1133–1141 (2005).
3. Bailey, A. et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.* **25**, 63–77 (1995).
4. Jamain, S. et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genet.* **34**, 27–29 (2003).
5. Durand, C. M. et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genet.* **39**, 25–27 (2007).
6. Cook, E. H. Jr & Scherer, S. W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* **455**, 919–923 (2008).

7. Szatmari, P. et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genet.* **39**, 319–328 (2007).
8. Sebat, J. et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* **316**, 445–449 (2007).
9. Marshall, C. R. et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 477–488 (2008).
10. Weiss, L. A. et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N. Engl. J. Med.* **358**, 667–675 (2008).
11. Kumar, R. A. et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 628–638 (2008).
12. Morrow, E. M. et al. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* **321**, 218–223 (2008).
13. Wang, K. et al. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* **459**, 528–533 (2009).
14. Weiss, L. A., Arking, D. E., Daly, M. J. & Chakravarti, A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* **461**, 802–808 (2009).
15. Bierut, L. J. et al. A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 5082–5087 (2010).
16. Lee, A. B., Luca, D., Klei, L., Devlin, B. & Roeder, K. Discovering genetic ancestry using spectral graph theory. *Genet. Epidemiol.* **34**, 51–59 (2010).
17. Colella, S. et al. An Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2013–2025 (2007).
18. Wang, K. et al. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* **17**, 1665–1674 (2007).
19. Hamdan, F. F. et al. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N. Engl. J. Med.* **360**, 599–605 (2009).
20. Romorini, S. et al. A functional role of postsynaptic density-95-guanylate kinase-associated protein complex in regulating Shank assembly and stability to synapses. *J. Neurosci.* **24**, 9391–9404 (2004).
21. O'Dushlaine, C. et al. Molecular pathways involved in neuronal cell adhesion and membrane scaffolding contribute to schizophrenia and bipolar disorder susceptibility. *Mol. Psychiatry* doi:10.1038/mp.2010.7 (16 February 2010).
22. Cline, M. S. et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nature Protocols* **2**, 2366–2382 (2007).
23. Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
24. Meechan, D. W., Tucker, E. S., Maynard, T. M. & LaMantia, A. S. Diminished dosage of 22q11 genes disrupts neurogenesis and cortical development in a mouse model of 22q11 deletion/DiGeorge syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 16434–16445 (2009).
25. Wegiel, J. et al. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-010-0655-4 (3 March 2010).
26. International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* **455**, 237–241 (2008).
27. Conrad, D. F. et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* **464**, 704–712 (2010).
28. Glessner, J. T. et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**, 569–573 (2009).
29. Skuse, D. H. Rethinking the nature of genetic vulnerability to autistic spectrum disorders. *Trends Genet.* **23**, 387–395 (2007).
30. Purcell, S. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements The authors acknowledge the families participating in the study and the main funders of the Autism Genome Project Consortium (AGP): Autism Speaks (USA), the Health Research Board (HRB; Ireland), The Medical Research Council (MRC; UK), Genome Canada/Ontario Genomics Institute, and the Hilibrand Foundation (USA). Additional support for individual groups was provided by the US National Institutes of Health (NIH grants HD055751, HD055782, HD055784, HD35465, MH52708, MH55284, MH57881, MH061009, MH06359, MH066673, MH080647, MH081754, MH66766, NS026630, NS042165, NS049261), the Canadian Institute for Advanced Research (CIFAR), the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (France), Autistica, Canada Foundation for Innovation/Ontario Innovation Trust, Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Po 255/17-4) (Germany), EC Sixth FP AUTISM MOLGEN, Fundação Calouste Gulbenkian (Portugal), Fondation de France, Fondation FondaMental (France), Fondation Orange (France), Fondation pour la Recherche Médicale (France), Fundação para a Ciência e Tecnologia (Portugal), the Hospital for Sick Children Foundation and University of Toronto (Canada), INSERM (France), Institut Pasteur (France), the Italian Ministry of Health (convention 181 of 19.10.2001), the John P Hussman Foundation (USA), McLaughlin Centre (Canada), Ontario Ministry of Research and Innovation (Canada), the Seaver Foundation (USA), the Swedish Science Council, The Centre for Applied Genomics (Canada), the Utah Autism Foundation (USA) and the Wellcome Trust core award 075491/Z/04 (UK). D.P. is supported by fellowships from the Royal Netherlands Academy of Arts and

Sciences (TMF/DA/5801) and the Netherlands Organization for Scientific Research (Rubicon 825.06.031). S.W.S. holds the GlaxoSmithKline-CIHR Pathfinder Chair in Genetics and Genomics at the University of Toronto and the Hospital for Sick Children (Canada).

Author Contributions D.P., J.D.B., R.M.C., E.H.C., H.C., M.C., B.D., S.E., L.G., D.H.G., M.G., J.L.H., J.H., J.M., A.P.M., J.I.N., A.D.P., M.A.P.-V., G.D.S., P.S., A.M.V., V.J.V., E.M.W., J.S.S., C.B. and S.W.S. were leading contributors in the design, analysis and writing of this study. A.J.B., A.B., G.D., C.M.F., H.H., S.M.K., E.M., S.F.N., G.O., J.P., T.H.W., J.D.B., R.M.C., E.H.C., H.C., B.D., S.E., L.G., D.H.G., M.G., J.L.H., J.H., A.P.M., J.I.N., A.D.P., M.A.P.-V., G.D.S., P.S., A.M.V., V.J.V., E.M.W., S.W.S., J.S.S. and C.B. are Lead Autism Genome Project Consortium (AGP) investigators who contributed equally to this project. All other authors were either involved in phenotype and clinical assessments or have participated in experiments and analysis.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare competing financial interests: details accompany the full-text HTML version of the paper at www.nature.com/nature. Readers are welcome to comment on the online version of this article at www.nature.com/nature. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.W.S. (stephen.scherer@sickkids.ca).

Dalila Pinto¹, Alistair T. Pagnamenta², Lambertus Klei³, Richard Anney⁴, Daniele Merico⁵, Regina Regan⁶, Judith Conroy⁶, Tiago R. Magalhaes^{7,8}, Catarina Correia^{7,8}, Brett S. Abraham⁹, Joana Almeida¹⁰, Elena Bacchelli¹¹, Gary D. Bader^{5,7,2}, Anthony J. Bailey¹², Gillian Baird¹³, Agatino Battaglia¹⁴, Tom Berney^{15,56}, Nadia Bolshakova⁴, Sven Bölte¹⁶, Patrick F. Bolton¹⁷, Thomas Bourgeron¹⁸, Sean Brennan⁴, Jessica Brian¹⁹, Susan E. Bryson²⁰, Andrew R. Carson¹, Guillermo Casallo¹, Jillian Casey⁶, Brian H.Y. Chung¹, Lynne Cochrane⁴, Christina Corsello²¹, Emily L. Crawford²², Andrew Crosssett²³, Cheryl Cyttrynbaum¹, Geraldine Dawson^{24,25}, Maretha de Jonge²⁶, Richard Delorme²⁷, Irene Drmic¹⁹, Eftichia Duketis¹⁶, Frederico Duque¹⁸, Annette Estes²⁸, Penny Farrar²⁰, Bridget A. Fernandez²⁹, Susan E. Folstein³⁰, Eric Fombonne³¹, Christine M. Freitag¹⁶, John Gilbert³⁰, Christopher Gillberg³², Joseph T. Glessner³³, Jeremy Goldberg³⁴, Andrew Green⁶, Jonathan Green³⁵, Stephen J. Guter³⁶, Hakon Hakonarson^{33,37}, Elizabeth A. Heron⁴, Matthew Hill⁴, Richard Holt², Jennifer L. Howe¹, Gillian Hughes⁴, Vanessa Hus²¹, Roberta Iglizios¹⁴, Cecilia Kim³³, Sabine M. Klauck³⁸, Alexander Kolevzon³⁹, Olena Korvatska⁴⁰, Vlad Kustanovich⁴¹, Clara M. Lajonchere⁴¹, Janine A. Lamb⁴², Magdalena Laskawiec¹², Marion Leboyer⁴³, Ann Le Couteur^{15,56}, Bennett L. Leventhal^{44,45}, Anath C. Lionel¹, Xiao-Qing Liu¹, Catherine Lord²¹, Linda Lotspeich⁴⁶, Sabata C. Lund²², Elena Maestrini¹¹, William Mahoney⁴⁷, Carine Mantoulan⁴⁸, Christian R. Marshall¹, Helen McConachie^{15,56}, Christopher J. McDougle⁴⁹, Jane McGrath⁴, William M. McMahon⁵⁰, Alison Merikangas⁴, Ohsuke Migita¹, Nancy J. Minshew⁵¹, Ghazala K. Mirza², Jeff Munson⁵², Stanley F. Nelson⁵³, Carolyn Noakes¹⁹, Abdul Noor⁵⁴, Gudrun Nygren³², Guiomar Oliveira¹⁰, Katerina Papanikolaou⁵⁵, Jeremy R. Parr⁵⁶, Barbara Parrini¹⁴, Tara Paton¹, Andrew Pickles⁵⁷, Marion Pilsorge⁵⁸, Joseph Piven⁵⁹, Chris P. Ponting⁶⁰, David J. Posey⁴⁹, Annemarie Poustka^{38,4}, Fritz Poustka¹⁶, Aparna Prasad¹, Jiannis Ragoussis², Katy Renshaw¹², Jessica Rickaby¹, Wendy Roberts¹⁹, Kathryn Roeder²³, Bernadette Roge⁴⁸, Michael L. Rutter⁶¹, Laura J. Bierut⁶², John P. Rice⁶², Jeff Salt³⁶, Katherine Sansom¹, Daisuke Sato¹, Ricardo Segurado⁴, Ana F. Sequeira^{7,8}, Lili Senman¹⁹, Naisha Shah⁶, Val C. Sheffield⁶³, Latha Soorya³⁹, Inês Sousa², Olaf Stein⁶⁴, Nuala Sykes², Vera Stoppioni⁶⁵, Christina Strawbridge³⁴, Raffaella Tancredi¹⁴, Katherine Tansey⁴, Bhoorna Thiruvahindrapuram¹, Ann P. Thompson³⁴, Susanne Thomson²², Ana Tryfon³⁹, John Tsiatis⁵⁵, Herman Van Engeland²⁶, John B. Vincent⁵⁴, Fred Volkmar⁶⁶, Simon Wallace¹², Kai Wang³³, Zhouzhi Wang¹, Thomas H. Wassink⁶⁷, Caleb Webber⁶⁰, Rosanna Weksberg¹, Kirsty Wing², Kerstin Wittmeyer⁴⁸, Shawn Wood³, Jing Wu²³, Brian L. Yaspan²², Danielle Zurawiecki³⁹, Lonnie Zwaigenbaum⁶⁸, Joseph D. Buxbaum³⁹, Rita M. Cantor⁵³, Edwin H. Cook³⁶, Hilary Coon⁵⁰, Michael L. Cuccaro³⁰, Bernie Devlin³, Sean Ennis⁶, Louise Gallagher⁴, Daniel H. Geschwind⁹, Michael Gill⁴, Jonathan L. Haines⁶⁹, Joachim Hallmayer⁴⁶, Judith Miller⁵⁰, Anthony P. Monaco², John I. Nurnberger Jr⁴⁹, Andrew D. Paterson¹, Margaret A. Pericak-Vance³⁰, Gerard D. Schellenberg⁷⁰, Peter Szatmari³⁴, Astrid M. Vicente^{7,8}, Veronica J. Vieland⁶⁴, Ellen M. Wijsman⁷¹, Stephen W. Scherer^{1,72}, James S. Sutcliffe²² & Catalina Betancur⁵⁸

¹The Centre for Applied Genomics and Program in Genetics and Genomic Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario M5G 1L7, Canada. ²Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford OX3 7BN, UK. ³Department of Psychiatry, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania 15213, USA. ⁴Autism Genetics Group, Department of Psychiatry, School of Medicine, Trinity College, Dublin 8, Ireland. ⁵Banting and Best Department of Medical Research, Terrence Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 3E1, Canada. ⁶School of Medicine and Medical Science, University College, Dublin 4, Ireland. ⁷Instituto Nacional de Saude Dr Ricardo Jorge 1649-016 Lisbon and Instituto Gulbenkian de Ciencia, 2780-156 Oeiras, Portugal. ⁸BioFIG—Center for Biodiversity, Functional and Integrative Genomics, Campus da FCUL, C2.2.12, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal. ⁹Program in Neurogenetics, Department of Neurology and Center for Autism Research and Treatment, Semel Institute, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, California 90095, USA. ¹⁰Hospital Pediátrico de Coimbra, 3000 – 076 Coimbra, Portugal. ¹¹Department of Biology, University of Bologna, 40126 Bologna, Italy. ¹²Department of Psychiatry, University of Oxford, Warneford Hospital, Headington, Oxford OX3 7JX, UK. ¹³Newcomen Centre, Guy's

Hospital, London SE1 9RT, UK. ¹⁴Stella Maris Institute for Child and Adolescent Neuropsychiatry, 56128 Calambrone (Pisa), Italy. ¹⁵Child and Adolescent Mental Health, University of Newcastle, Sir James Spence Institute, Newcastle upon Tyne NE1 4LP, UK. ¹⁶Department of Child and Adolescent Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy, J.W. Goethe University Frankfurt, 60528 Frankfurt, Germany. ¹⁷Department of Child and Adolescent Psychiatry, Institute of Psychiatry, London SE5 8AF, UK. ¹⁸Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur; University Paris Diderot-Paris 7, CNRS URA 2182, Fondation FondaMental, 75015 Paris, France. ¹⁹Autism Research Unit, The Hospital for Sick Children and Bloorview Kids Rehab, University of Toronto, Toronto, Ontario M5G 1X8, Canada. ²⁰Department of Pediatrics and Psychology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3K 6R8, Canada. ²¹Autism and Communicative Disorders Centre, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109-2054, USA. ²²Department of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt Kennedy Center, and Centers for Human Genetics Research and Molecular Neuroscience, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee 37232, USA. ²³Department of Statistics, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania 15213, USA. ²⁴Autism Speaks, New York 10016, USA. ²⁵Department of Psychiatry, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-3366, USA. ²⁶Department of Child Psychiatry, University Medical Center, Utrecht 3508 GA, The Netherlands. ²⁷INSERM U 955, Fondation FondaMental, APHP, Hôpital Robert Debré, Child and Adolescent Psychiatry, 75019 Paris, France. ²⁸Department of Speech and Hearing Sciences, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA. ²⁹Disciplines of Genetics and Medicine, Memorial University of Newfoundland, St John's Newfoundland A1B 3V6, Canada. ³⁰The John P. Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami, Miami, Florida 33101, USA. ³¹Division of Psychiatry, McGill University, Montreal, Quebec H3A 1A1, Canada. ³²Department of Child and Adolescent Psychiatry, Göteborg University, Göteborg S41345, Sweden. ³³The Center for Applied Genomics, Division of Human Genetics, The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA. ³⁴Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University, Hamilton, Ontario L8N 3Z5, Canada. ³⁵Academic Department of Child Psychiatry, Booth Hall of Children's Hospital, Blackley, Manchester M9 7AA, UK. ³⁶Institute for Juvenile Research, Department of Psychiatry, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612, USA. ³⁷Department of Pediatrics, Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA. ³⁸Division of Molecular Genome Analysis, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg 69120, Germany. ³⁹The Seaver Autism Center for Research and Treatment, Department of Psychiatry, Mount Sinai School of Medicine, New York 10029, USA. ⁴⁰Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA. ⁴¹Autism Genetic Resource Exchange, Autism Speaks, Los Angeles, California 90036-4234, USA. ⁴²Centre for Integrated Genomic Medical Research, University of Manchester, Manchester M13 9PT, UK. ⁴³INSERM U995, Department of Psychiatry, Groupe Hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, AP-HP; University Paris 12, Fondation FondaMental, Créteil 94000, France. ⁴⁴Nathan Kline Institute for Psychiatric Research (NKI), 140 Old Orangeburg Road, Orangeburg, New York 10962, USA. ⁴⁵Department of Child and Adolescent Psychiatry, New York University and NYU Child Study Center, 550 First Avenue, New York, New York 10016, USA. ⁴⁶Department of Psychiatry, Division of Child and Adolescent Psychiatry and Child Development, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94304, USA. ⁴⁷Department of Pediatrics, McMaster University, Hamilton, Ontario L8N 3Z5, Canada. ⁴⁸Centre d'Etudes et de Recherches en Psychopathologie, Université de Toulouse Le Mirail, Toulouse 31200, France. ⁴⁹Department of Psychiatry, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202, USA. ⁵⁰Psychiatry Department, University of Utah Medical School, Salt Lake City, Utah 84108, USA. ⁵¹Departments of Psychiatry and Neurology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania 15213, USA. ⁵²Department of Psychiatry and Behavioural Sciences, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA. ⁵³Department of Human Genetics, University of California—Los Angeles School of Medicine, Los Angeles, California 90095, USA. ⁵⁴Centre for Addiction and Mental Health, Clarke Institute and Department of Psychiatry, University of Toronto, Toronto, Ontario M5G 1X8, Canada. ⁵⁵University Department of Child Psychiatry, Athens University, Medical School, Agia Sophia Children's Hospital, 115 27 Athens, Greece. ⁵⁶Institutes of Neuroscience and Health and Society, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne NE1 7RU, UK. ⁵⁷Department of Medicine, School of Epidemiology and Health Science, University of Manchester, Manchester M13 9PT, UK. ⁵⁸INSERM U952 and CNRS UMR 7224 and UPMC Univ Paris 06, Paris 75005, France. ⁵⁹Carolina Institute for Developmental Disabilities, University of North Carolina at Chapel Hill, North Carolina 27599-3366, USA. ⁶⁰MRC Functional Genomics Unit, Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, Oxford OX1 3QU, UK. ⁶¹Social, Genetic and Developmental Psychiatry Centre, Institute Of Psychiatry, London SE5 8AF, UK. ⁶²Department of Psychiatry, Washington University in St Louis, School of Medicine, St Louis, Missouri 63130, USA. ⁶³Department of Pediatrics and Howard Hughes Medical Institute Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242, USA. ⁶⁴Battelle Center for Mathematical Medicine, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital and The Ohio State University, Columbus, Ohio 43205, USA. ⁶⁵Neuropsychiatria Infantile, Ospedale Santa Croce, 61032 Fano, Italy. ⁶⁶Child Study Centre, Yale University, New Haven, Connecticut 06520, USA. ⁶⁷Department of Psychiatry, Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa 52242, USA. ⁶⁸Department of Pediatrics, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2J3, Canada. ⁶⁹Center for Human Genetics Research, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee 37232, USA. ⁷⁰Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Pennsylvania 19104, USA. ⁷¹Departments of Biostatistics and Medicine, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA. ⁷²Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5S 1A1, Canada.

‡Deceased.

Article 2

Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic neurotransmission in autism

Pilorge M, Fassier C, Le Corrond H, Potey A, Bai J, Delaby E, Assouline B, Guinchat V, Devillard F, Delorme R, Nygren G, Råstam M, Meier JC, Otani S, James VM, Topf M, Dear TN, Gillberg C, Leboyer M, Giros B, Gautron S, Hazan J, Harvey RJ, Legendre P, Betancur C

(soumis)

Article 2. TSA et neurotransmission glycinergique : analyses génétiques et fonctionnelles

Les TSA correspondent à un ensemble de troubles neurodéveloppementaux caractérisés par une profonde hétérogénéité génétique. Des études récentes des variations du nombre de copies de gènes et des variations de séquence ont identifié de nombreux gènes impliqués dans la pathologie. Cependant, notre compréhension de l'étiologie des TSA et des mécanismes physiopathologiques sous-jacents est incomplète. Dans cette étude, nous avons impliqué pour la première fois dans les TSA le gène *GLRA2*, localisé sur le chromosome X et codant la sous-unité $\alpha 2$ des récepteurs de glycine (GlyR).

Après avoir identifié une délétion localisée en Xp22.2 affectant le gène *GLRA2* chez un garçon avec TSA, le séquençage de ce gène chez 400 patients de sexe masculin de notre cohorte nous a permis d'identifier une mutation faux sens *de novo*. La délétion et la mutation sont très rares, elles n'ont pas été trouvées chez d'autres patients et sont absentes respectivement chez 15 574 individus témoins et 13 758 chromosomes X témoins des bases de données et de la littérature.

Les GlyR sont des récepteurs ionotropiques sensibles à la glycine qui assurent la neurotransmission inhibitrice dans le système nerveux central chez l'adulte mais ont une action excitatrice au cours du développement. Les GlyR $\alpha 2$ sont fortement exprimés dans le cerveau embryonnaire et néonatal, où ils auraient un rôle dans le développement neuronal. En effet, des résultats récents indiquent que les GlyR $\alpha 2$ régulent la migration des interneurons corticaux au cours du développement (Avila et coll., 2013).

Des expériences *in vitro* réalisées sur des cellules CHO transfectées avec les formes délétées et mutées de *GLRA2* nous ont permis de démontrer les effets perte de fonction de la délétion et de la mutation identifiées chez des patients avec TSA. En effet, des expériences d'immunohistochimie ont montré que la délétion empêche l'ancrage de la protéine GLRA2 à la membrane plasmique, alors que la mutation ponctuelle altère de façon dramatique l'affinité du récepteur pour la glycine, comme le montrent les résultats d'électrophysiologie.

Des expériences chez le poisson zèbre nous ont permis d'observer *in vivo* des effets perte de fonction associés aux mutations identifiées chez les patients. L'inactivation ciblée de *glra2* par un oligonucléotide antisens chez l'embryon de poisson zèbre entraîne une désorganisation des trajectoires axonales des motoneurons spinaux. L'injection du transcrit sauvage chez les morphants restaure le phénotype normal, alors que les transcrits délétés et mutés n'ont aucun effet. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature montrant que la transmission glycinergique module la croissance des neurites pendant le développement (Tapia et coll., 2000 ; Tapia et coll., 2001).

Nous avons aussi effectué une analyse comportementale détaillée des souris déficientes pour le gène *Glr2*, qui présentent des déficits spécifiques d'apprentissage et de mémoire dans le test de reconnaissance d'objet, alors que leurs performances dans les tâches de mémoire spatiale ne sont pas altérées. Enfin, des expériences d'électrophysiologie nous ont permis de révéler un défaut de potentialisation à long terme dans le cortex de ces souris adultes. Ces résultats suggèrent que l'altération de la transmission glycinergique induit un défaut de plasticité synaptique dans le cortex préfrontal, une région impliquée dans les TSA. Les défauts de migration des interneurons corticaux, ayant été reportés récemment chez les souris déficientes pour *Glr2*, apportent un mécanisme potentiel pour les déficits cognitifs et de plasticité synaptique (Avila et coll., 2013).

L'ensemble de nos résultats implique le gène *GLRA2* pour la première fois dans les TSA. Cette étude offre de nouvelles perspectives quant au rôle biologique de ce gène et suggère l'implication de la neurotransmission glycinergique dans la physiopathologie des TSA et de la déficience intellectuelle. Ces résultats sont concordants avec l'hypothèse émergente selon laquelle un déséquilibre de la balance excitation/inhibition serait à la base de certaines formes de TSA.

Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycine neurotransmission in autism

Marion Pilorge^{1,2,3}, Coralie Fassier^{1,2,3}, Hervé Le Corronc^{1,2,3,4}, Anaïs Potey^{1,2,3}, Jing Bai^{1,2,3}, Elsa Delaby^{1,2,3}, Brigitte Assouline⁵, Vincent Guinchat^{5†}, Françoise Devillard⁶, Richard Delorme⁷, Gudrun Nygren⁸, Maria Råstam^{8‡}, Jochen C. Meier⁹, Satoru Otani^{1,2,3§}, Victoria M. James^{10,11}, Maya Topf¹⁰, T. Neil Dear^{12¶}, Christopher Gillberg⁸, Marion Leboyer^{13,14,15,16}, Bruno Giros^{1,2,3}, Sophie Gautron^{1,2,3*}, Jamilé Hazan^{1,2,3*}, Robert J. Harvey^{11*}, Pascal Legendre^{1,2,3} & Catalina Betancur^{1,2,3}

Autism spectrum disorders (ASD) are common neurodevelopmental conditions characterized by marked genetic heterogeneity¹. Recent studies of rare copy number variants (CNVs)^{2,3} and sequence variants⁴⁻⁶ have identified numerous loci associated with ASD. However, our knowledge of the overall genetic architecture and the underlying pathophysiological mechanisms of ASD remains incomplete. Here we identified the X-linked gene *GLRA2*, encoding the glycine receptor (GlyR) $\alpha 2$ subunit, as a gene implicated in ASD. GlyRs are ligand-gated chloride channels that mediate inhibitory neurotransmission in the adult nervous system but exert an excitatory action in immature neurons. GlyRs containing the $\alpha 2$ subunit are highly expressed in the embryonic and neonatal brain^{7,8}, where they are thought to play an important role in neuronal development⁹. In this respect, recent findings indicate that GlyR $\alpha 2$ activation promotes cortical interneuron migration¹⁰. After identifying a microdeletion disrupting *GLRA2* in a boy with autism², sequencing of 400 unrelated males with ASD revealed one *de novo* missense mutation. *In vitro* functional studies demonstrated dramatic alteration of protein function caused by both the deletion and the mutation identified in ASD. Targeted *glra2* knockdown in zebrafish induced severe axon branching defects, rescued by co-injection with wild-type but not ASD-associated mutated transcripts. Finally, *Gla2* knockout mice exhibited cognitive deficits in object recognition memory and impaired synaptic plasticity in the prefrontal cortex. Our results implicate *GLRA2* for the first time in ASD and suggest that altered glycinergic transmission may predispose to ASD and cognitive impairments.

Hundreds of rare and very-rare variants, both inherited and *de novo*, have been shown to contribute to the genetic origins of ASD¹⁻⁶. Among them, numerous variants have been identified in genes located on the X-chromosome¹, which may partially explain the excess of affected males over females observed in ASD, especially in individuals with normal IQ. As part of a large CNV screen in ASD², we recently identified a microdeletion of *GLRA2* on chromosome Xp22.2 in a boy with autism, inherited from his healthy mother (Fig. 1a). Patient 1 has autism, language delay, low average IQ, and no distinctive clinical features (Supplementary Note). The *GLRA2* gene spans 202 kb and contains 9 exons. The 151 kb deletion encompasses exons 8 and 9 of *GLRA2*, and is predicted to result in loss of transmembrane domains 3 and 4 (TM3 and TM4). This was validated using qPCR and the deletion breakpoint was localized

to intron 7 (Fig. 1b, c, Extended Data Fig. 1). The endpoints of the deletion arose in regions lacking extensive homology, suggesting that this is a non-recurrent event. No other *GLRA2* deletions were observed in 1131 ASD cases, 2712 parents, and 1858 controls². Furthermore, deletions were absent from 1124 ASD probands³ and 11004 controls from previous studies (Extended Data Table 1).

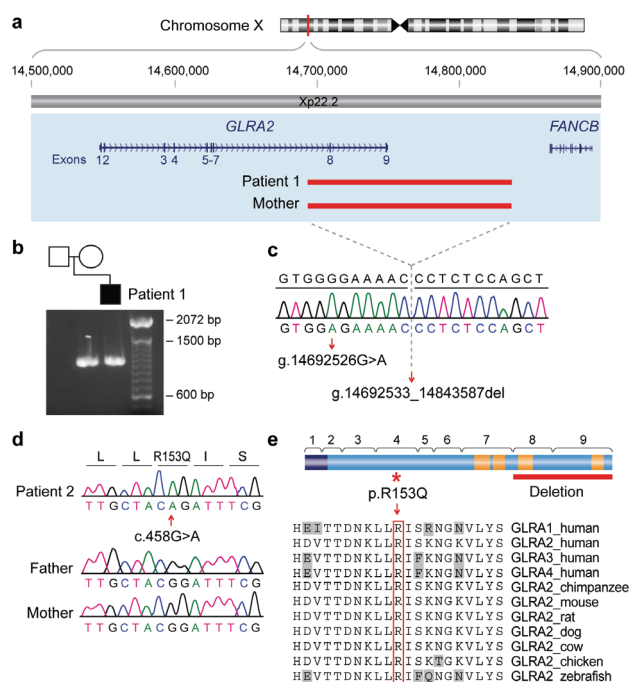


Figure 1 | Microdeletion and mutation of *GLRA2* in ASD. **a**, Physical map of Xp22.2. CNV analysis showed a *GLRA2* deletion removing exons 8 and 9 in Patient 1, inherited from his unaffected mother (red). **b**, Gel image of long-range PCR products showing an abnormal 1.1 kb allele in Patient 1 and his mother. **c**, Breakpoint sequence analysis in Patient 1 revealed a 151,055 bp deletion starting in intron 7 of *GLRA2*. A G>A transition precedes the deletion. **d**, Identification of a *de novo* missense mutation in exon 4 of *GLRA2* in Patient 2 (c.458G>A, p.R153R>Q). **e**, Schematic representation of the *GLRA2* protein with the deletion and the mutation identified in ASD. The exons are indicated by brackets; the signal peptide and the four transmembrane domains are shown in dark blue and orange, respectively. The alignment of protein sequences of human GlyRs and orthologs from other species is shown below. The highly conserved arginine at position 153, mutated in Patient 2, is boxed in red.

¹INSERM, U952, 75005 Paris, France. ²CNRS, UMR 7224, 75005 Paris, France. ³Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France. ⁴Université d'Angers, 49000 Angers, France. ⁵Centre Hospitalier Alpes-Isère, Centre Alpin de Diagnostic Précoce de l'Autisme, 38120 Saint Egrève, France. ⁶Centre Hospitalier Universitaire Grenoble, Département de Génétique et Procréation, 38700 Grenoble, France. ⁷AP-HP, Robert Debré University Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, 75019 Paris, France. ⁸Gillberg Neuropsychiatry Centre, University of Gothenburg, 41119 Gothenburg, Sweden. ⁹Max Delbrück Center for Molecular Medicine, 13125 Berlin, Germany. ¹⁰Institute for Structural and Molecular Biology, Department of Biological Sciences, Birkbeck College, London WC1E 7HX, United Kingdom. ¹¹Department of Pharmacology, UCL School of Pharmacy, London WC1N 1AX, United Kingdom. ¹²Leeds Institute of Molecular Medicine, University of Leeds, St. James's University Hospital, Leeds LS9 7TF, United Kingdom. ¹³INSERM U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Psychiatric Genetics, 94010 Créteil, France. ¹⁴AP-HP, Henri Mondor-Albert Chenevier Hospital, Department of Psychiatry, 94010 Créteil, France. ¹⁵University Paris-Est Créteil, Faculty of Medicine, 94010 Créteil, France. ¹⁶Fondation Fondamental, Créteil 94010, France. ¹⁷Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montreal, Quebec, H4H 1R3, Canada. ¹⁸Present address: Department of Child and Adolescent Psychiatry, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France. ¹⁹Present address: Department of Clinical Sciences, Child and Adolescent Psychiatry, Lund University, 22241 Lund, Sweden. ²⁰Present address: Center of Medical Education, Faculty of Health Sciences, Ryotokuji University, Urayasu 279-8567, Japan. ²¹Present address: South Australian Health and Medical Research Institute, Adelaide SA 5001, Australia. Correspondence should be addressed to C.B. (catalina.betancur@inserm.fr). *These authors contributed equally to this work.

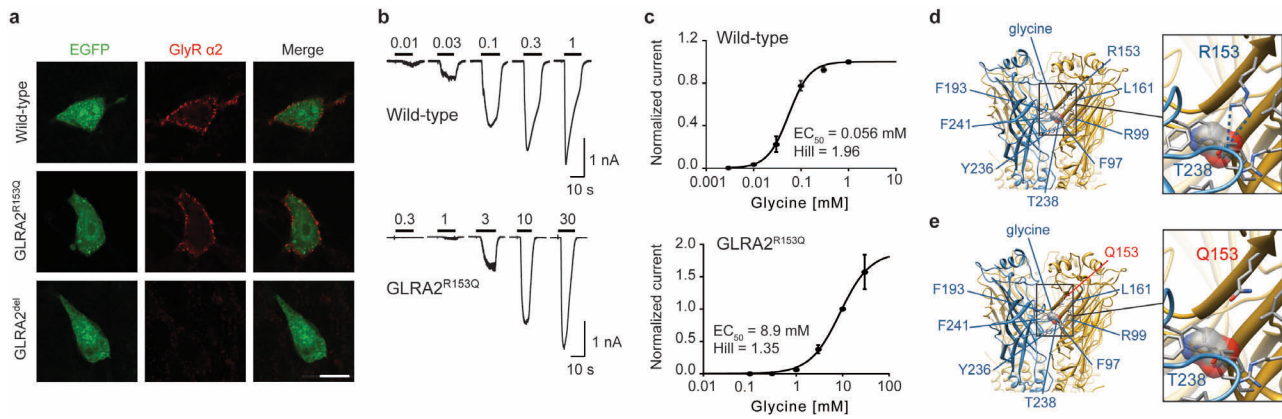


Figure 2 | *GLRA2* mutations identified in individuals with ASD abolish normal protein function. **a**, Surface expression of wild-type and mutant *GLRA2* proteins. The mutated protein (*GLRA2*^{R153Q}) localized properly to the plasma membrane, as shown by the punctiform staining of GlyR $\alpha 2$ at the cell surface, whereas the truncated mutant (*GLRA2*^{del}) failed to traffic to the membrane. The different constructs were co-transfected with EGFP cDNA in CHO cells. Scale bar: 10 μm . **b**, Representative traces of currents evoked by application of glycine on CHO cells expressing wild-type and mutant *GLRA2* proteins. Bars represent application of glycine at concentrations noted. **c**, Fit of data in **b** to the Hill equation. Errors indicate SEM ($n = 7-13$ cells). **d**, **e**, Predicted structure of the homomeric GlyR $\alpha 2$ subunit. The blue and yellow $\alpha 2$ subunits contain residues on the plus and minus sides of the glycine-binding site, respectively. A single glycine-binding site is represented in the native state (**d**) and the R153Q mutant (**e**). Predicted residues of importance are labelled by residue number. Dashed lines indicate hydrogen bonds. Elimination of the hydrogen bonds stabilising the binding-site residue T238 is predicted to cause direct disruption of glycine binding.

The glycine receptor typically consists of pentameric combinations of two subunit types, α and β , although GlyRs containing the $\alpha 2$ subunit can also form homomeric receptors. Three genes, *GLRA1*, *GLRA2*, and *GLRA3*, encode GlyR α subunits in humans (*GLRA4* is a pseudogene), whilst *GLRB* encodes the β subunit. GlyR α subunits exhibit distinct spatial and temporal expression patterns in the central nervous system (CNS). The $\alpha 2$ subunit is widely expressed in embryonic and perinatal CNS and expression markedly decreases after birth^{7,8} (Extended Data Fig. 2), suggesting a role for $\alpha 2$ -containing GlyR in neuronal development. By contrast, $\alpha 1$ and $\alpha 3$ GlyRs mediate the majority of glycinergic neurotransmission in the adult spinal cord and brain stem, where they are involved in hyperekplexia (startle disease), and inflammatory pain¹¹. Although known as the main inhibitory neurotransmitters in the adult CNS, glycine and GABA have a depolarizing and excitatory action in immature neurons due to the inverted chloride gradient observed during development^{9,12}. At these early stages, embryonic GlyRs and GABA_ARs are located extrasynaptically and can be tonically activated by paracrine release of endogenous agonists^{9,13,14}. The subsequent increase in intracellular Ca^{2+} generates spontaneous electrical activity that can shape neuronal network formation¹⁵. The developmental role of GABA in neuronal proliferation, migration, and differentiation has been widely documented¹⁶⁻¹⁸ and several studies support similar neurotrophic effects for glycine in the developing CNS^{10,19-21} and retina²².

To further delineate the role of *GLRA2* mutations in ASD, we used direct sequencing to investigate the coding regions and splice site junctions of this gene in 400 affected males. We identified a *de novo* missense mutation, c.458G>A, leading to the amino acid substitution p.R153Q (Fig. 1d) in Patient 2, a male with non-syndromic autism, severe language delay, mild intellectual disability, and pharmaco-responsive epilepsy with generalized tonic-clonic seizures (Supplementary Note). The mutation affects a highly conserved arginine located in the glycine-binding site (Fig. 1e), was absent from 404 unaffected fathers of ASD probands and has not been reported in 937 ASD cases and 870 controls of the ARRA Autism Sequencing Consortium⁴, the 1000 Genomes Project²³, and the Exome Sequencing Project (Extended Data Table 2). In total, the p.R153Q mutation was absent from 13758 control X chromosomes. This mutation was predicted to be damaging by

PolyPhen-2, SNPs&GO, MutPred, PANTHER, and SIFT (Extended Data Table 3). No other likely pathogenic mutations in *GLRA2* were identified in ASD male chromosomes (Extended Data Tables 2, 4). The rarity of most genetic variants in ASD usually precludes the possibility of identifying sufficient repeated instances of mutations in the same gene to understand

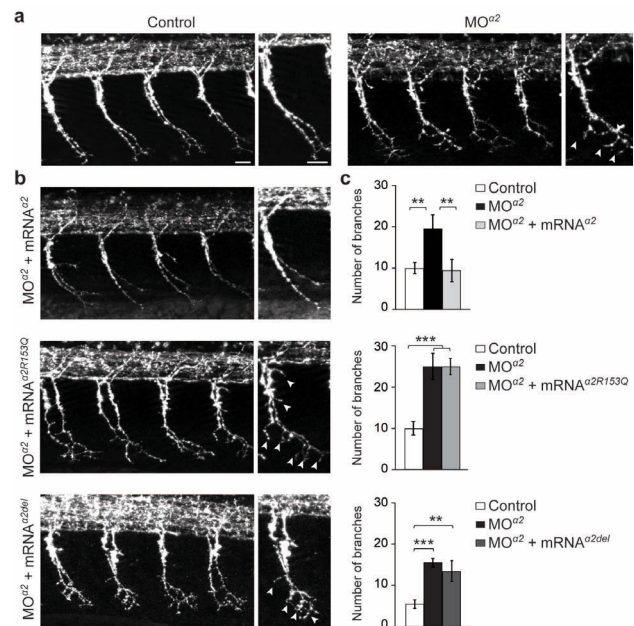


Figure 3 | ASD-associated mutations in *GLRA2* fail to rescue the axon branching phenotype caused by knockdown of the zebrafish orthologue. **a**, **b**, Immunostaining of 28-h post-fertilization control (**a**), morphant (*MO* ^{$\alpha 2$}) (**a**), and rescued (*MO* ^{$\alpha 2$} + *mRNA* ^{$\alpha 2$} or *mRNA* ^{$\alpha 2R153Q$} or *mRNA* ^{$\alpha 2del$}) (**b**) larvae labelled with Znp1 antibody; lateral views of the trunk (anterior to the left). Higher magnifications are shown on the right. Arrows indicate aberrant supernumerary branches of spinal motor axons. Scale bars: 10 μm . **c**, Quantification of axon branching in 16 somites centred around the anus in control, morphant, and rescued larvae. The number of branches was significantly higher in *MO* ^{$\alpha 2$} larvae than in controls and was rescued by concomitant overexpression of human *GLRA2* (*mRNA* ^{$\alpha 2$}), whereas deleted (*mRNA* ^{$\alpha 2del$}) or mutated (*mRNA* ^{$\alpha 2R153Q$}) versions of the transcript failed to rescue the abnormal axon phenotype. Data represent mean \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

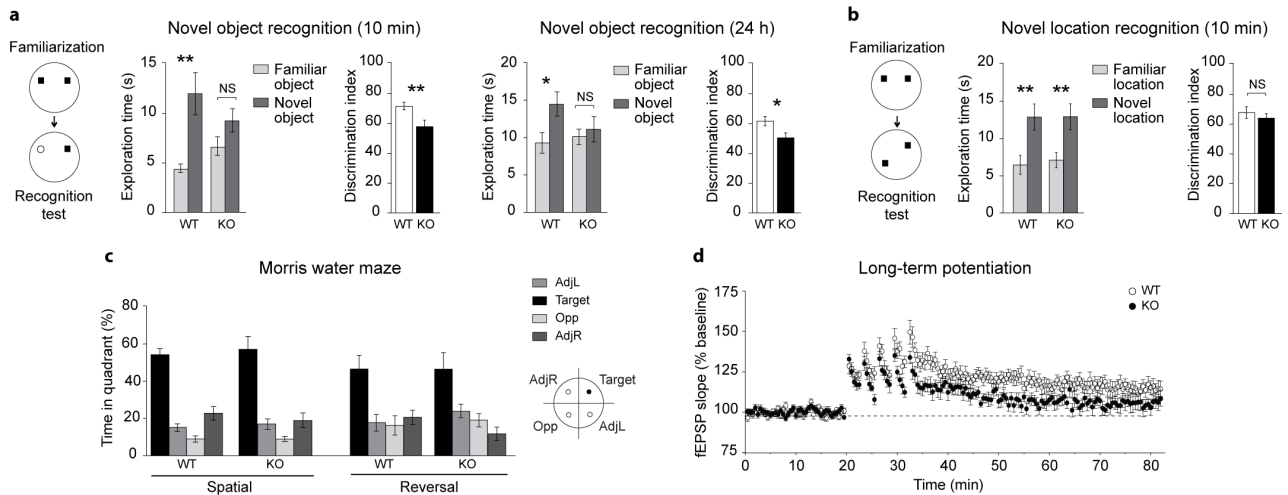


Figure 4 | *Glra2*^{-/-} mice exhibit deficits in recognition memory and impaired cortical synaptic plasticity. **a**, In the novel object recognition task, adult wild-type (WT) mice spent more time exploring the novel object, whereas *Glra2*^{-/-} mice had no preference for either object after a 10-min or 24-h memory delay, as measured by exploration time and discrimination index ($n = 11$ WT, 12 *Glra2*^{-/-}). **b**, *Glra2*^{-/-} mice exhibited no deficits when assessed on the spatial version of the task (the novel location recognition test) and showed normal preference for the object placed in a new location ($n = 9$ WT, 10 *Glra2*^{-/-}). **c**, In the Morris water maze, *Glra2*^{-/-} mice displayed normal acquisition and reversal learning. Both genotypes showed a significant preference for the target quadrant during a probe trial conducted 10 min following the final training session ($n = 5$ WT, 7 *Glra2*^{-/-}). AdjL, adjacent left quadrant; Target, target quadrant; AdjR, adjacent right quadrant; Opp, opposite to target quadrant. **d**, *Glra2*^{-/-} mice exhibited impaired long term potentiation in the prefrontal cortex ($n = 14$ slices from 9 WT mice, 10 slices from 6 *Glra2*^{-/-} mice). Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

their functional impact and confirm pathogenicity. Consequently, additional lines of evidence are required.

We used *in vitro* studies to analyse the functional impact of the *GLRA2* deletion and R153Q substitution found in ASD patients. We generated truncated (*GLRA2*^{del}) and mutated (*GLRA2*^{R153Q}) constructs as shown in Extended Data Fig. 3. Whereas the wild-type and *GLRA2*^{R153Q} proteins were both observed at the plasma membrane of transfected CHO cells, *GLRA2*^{del} was undetectable at the cell surface (Fig. 2a) and appeared mislocalized in the cytoplasm (Extended Data Fig. 4), likely due to the loss of TM3 and TM4. To determine the functional properties of the two mutant GlyRs, we analysed whole-cell currents evoked by the application of glycine on transfected cells. As shown in Fig. 2, the minimum concentration of glycine able to evoke a whole-cell current was ~ 100 times higher in cells expressing the *GLRA2*^{R153Q} mutant than in cells expressing the wild-type GlyR $\alpha 2$ subunit. Expression of *GLRA2*^{R153Q} was associated with a rightward shift in the dose-response curves, with a significantly higher EC_{50} value (mutant $EC_{50} = 8.9 \pm 0.9$ mM, $n = 7$; wild-type $EC_{50} = 0.056 \pm 0.002$ mM, $n = 13$; $P < 0.01$; Fig. 2b, c), indicating that the efficiency of the receptor was dramatically reduced. This result implies that GlyRs containing the R153Q mutation are unlikely to be significantly activated in response to glycine release under physiological conditions (≤ 1 mM in the synaptic cleft)²⁴. As expected, application of glycine at high concentration (30 mM) on cells expressing *GLRA2*^{del} did not evoke any current ($n = 5$), due to the lack of cell surface expression of the deleted protein. To further study the effects of the R153Q substitution in Patient 2, we generated a homology model of the human GlyR $\alpha 2$ homomer. We predict that R153Q abolishes a critical hydrogen bond in the glycine-binding site, leading to the destabilization of the ligand-binding region and loss of function (Fig. 2d, e). Taken together, our results demonstrate that both the *GLRA2* deletion and the R153Q mutation identified in patients with ASD dramatically impair GlyR function.

To test whether the deletion and R153Q missense mutation affect *GLRA2* function *in vivo*, we knocked down *glra2* expression in zebrafish embryos using specific morpholino oligonucleotides, characterized a prominent morphant pheno-

type, and carried out rescue experiments. Knockdown of *glra2* impaired spinal motor axon morphology and caused multiple aberrant branching (Fig. 3a). This abnormal phenotype was fully rescued by human wild-type *GLRA2* mRNA, whereas injection of the deleted or mutated transcripts failed to rescue these axon outgrowth defects (Fig. 3b, c), showing that both mutations disrupt *GLRA2* function *in vivo*. These findings are consistent with previous studies showing that glycinergic transmission modulates neurite outgrowth during development^{19,21}.

To further investigate the role of GlyR $\alpha 2$ in ASD, we characterized male *Glra2* knockout mice in a battery of behavioural tests related to ASD. Mutant mice were viable and fertile, with a normal life span. Locomotor activity and motor coordination in hemizygous *Glra2*^{-/-} mice were indistinguishable from wild-type littermates (Extended Data Fig. 5a-d). *Glra2* mutant mice exhibited normal anxiety and repetitive behaviours as well as normal social behaviour (Extended Data Figs 5e-h, 6a-d). However, when assessed in the novel object recognition test, *Glra2*^{-/-} mice showed no preference for the novel object 10 min after the familiarization phase (Fig. 4a), indicating impaired short-term memory. This deficit was confirmed in three additional cohorts and was also observed in the long-term memory version of the task, after a delay of 24 h (Fig. 4a). In contrast, *Glra2*^{-/-} mice did not display deficits in spatial learning in either the novel location recognition task or in the Morris water maze (Fig. 4b, c, Extended Data Fig. 6e). These results indicate that *Glra2* knockout mice have partially impaired learning and memory processes, with normal hippocampal-dependent spatial abilities. This cognitive profile is consistent with the observation that mutations in *GLRA2* in humans are associated with mild intellectual disabilities and is reminiscent of the preserved visuospatial abilities typical of ASD.

We next measured synaptic plasticity in *Glra2*^{-/-} mice and observed that long-term potentiation induced by high-frequency stimulation in the prefrontal cortex was significantly impaired (Fig. 4d). These findings suggest that defective glycinergic signalling results in abnormal plasticity in the prefrontal cortex, a region consistently implicated in ASD^{25,26}. The recent demonstration of tangential migration defects of cortical

interneurons during embryogenesis in *Gla2* mutant mice¹⁰ supports a developmental role for GlyR $\alpha 2$ and provides a mechanistic substrate for our observation of synaptic dysfunction and aberrant behaviour in these mice.

In conclusion, we used a combination of genetics and functional studies to demonstrate that *GLRA2* mutations resulting in loss of function are associated with ASD, language delay, and mild cognitive impairment in humans. The cognitive and synaptic defects observed in *Gla2*^{-/-} mice are consistent with the repeated implication of GABAergic inhibitory neurotransmission in models of autism^{27,28} and emerging evidence of imbalanced excitation/inhibition as a mechanism underlying ASD²⁹. Overall, our data provide new insights into the biological roles of *GLRA2* and implicate for the first time glycine neurotransmission as a mediator of ASD phenotypes.

METHODS SUMMARY

Subjects. Patients were recruited by the Paris Autism Research International Study (PARIS) at specialized clinical centres in France and Sweden³⁰. All patients were evaluated by psychiatrists and had confirmed ASD diagnoses; subjects with known genetic disorders were excluded. Informed consent was obtained from all families in accordance with the research ethics boards of the participating institutions.

Zebrafish. To knock down zebrafish *gla2*, two-cell stage wild-type zebrafish embryos were injected with antisense morpholino oligonucleotides directed against the *gla2* translation initiation site (*gla2* MO) at 1 pmole per embryo and analysed at 28 h post-fertilization by standard immunostaining procedures. For rescue experiments, the wild-type, mutated, and deleted versions of human *GLRA2* transcripts were co-injected at 100 pg in one-cell stage zebrafish embryos together with the *gla2* MO.

Mice. *Gla2* mutant mice were generated by T.N.D. and R.J.H. and maintained in our laboratory in Paris on a C57BL/6J background. Only males were used for the behavioural, molecular, and electrophysiological studies. Behavioural assays were done blind to genotype with control littermates. All experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) regarding the housing, care, and experimental procedures on mice.

Statistics. Data are shown as mean \pm SEM and analysed using Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA). Statistical analyses were done using Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) for behavioural studies and StatView (SAS Institute, Cary, NC) for *ex vivo* electrophysiology. Full statistical tests are presented in Supplementary Table 1.

Online Content Additional Methods and Extended Data display items are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

- Betancur, C., Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* **1380**, 42-77 (2011).
- Pinto, D. et al., Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**, 368-372 (2010).
- Sanders, S. J. et al., Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* **70**, 863-885 (2011).
- Neale, B. M. et al., Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* **485**, 242-245 (2012).
- O'Roak, B. J. et al., Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* **485**, 246-250 (2012).
- Sanders, S. J. et al., De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* **485**, 237-241 (2012).
- Malosio, M. L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J., and Betz, H., Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* **10**, 2401-2409 (1991).
- Kang, H. J. et al., Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* **478**, 483-489 (2011).
- Flint, A. C., Liu, X., and Kriegstein, A. R., Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* **20**, 43-53 (1998).
- Avila, A. et al., Glycine receptor $\alpha 2$ subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep* **4**, 738-750 (2013).
- Lynch, J. W., Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* **56**, 303-309 (2009).
- Ben-Ari, Y., Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**, 728-739 (2002).
- Demarque, M. et al., Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* **36**, 1051-1061 (2002).
- Scain, A. L. et al., Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci* **30**, 390-403 (2010).
- Spitzer, N. C., Electrical activity in early neuronal development. *Nature* **444**, 707-712 (2006).
- LoTurco, J. J. et al., GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287-1298 (1995).
- Manent, J. B. et al., A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* **25**, 4755-4765 (2005).
- Bortone, D. and Polleux, F., KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* **62**, 53-71 (2009).
- Sanes, D. H. and Chokshi, P., Glycinergic transmission influences the development of dendrite shape. *Neuroreport* **3**, 323-326 (1992).
- Furuya, S. et al., L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11528-11533 (2000).
- Tapia, J. C. et al., Early expression of glycine and GABA(A) receptors in developing spinal cord neurons. Effects on neurite outgrowth. *Neuroscience* **108**, 493-506 (2001).
- Young, T. L. and Cepko, C. L., A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron* **41**, 867-879 (2004).
- Abecasis, G. R. et al., An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491**, 56-65 (2012).
- Legendre, P., The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* **58**, 760-793 (2001).
- Koshino, H. et al., fMRI investigation of working memory for faces in autism: visual coding and underconnectivity with frontal areas. *Cereb Cortex* **18**, 289-300 (2008).
- Sahyoun, C. P. et al., Neuroimaging of the functional and structural networks underlying visuospatial vs. linguistic reasoning in high-functioning autism. *Neuropsychologia* **48**, 86-95 (2010).
- Chao, H. T. et al., Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* **468**, 263-269 (2010).
- Han, S. et al., Autistic-like behaviour in *Scn1a*^{-/-} mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* **489**, 385-390 (2012).
- Yizhar, O. et al., Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* **477**, 171-178 (2011).
- Durand, C. M. et al., Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* **39**, 25-27 (2007).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements We are grateful to the families for their participation. We thank Marika Nosten-Bertrand and Stéphanie Daumas for advice on behavioural analyses, the IFR83 imaging facility, the DNA and cell bank of the Pitié-Salpêtrière Hospital, and the Clinical Investigation Center of the Robert Debré Hospital. This work was supported by a NARSAD Independent Investigator Award from the Brain & Behavior Research Foundation to C.B., the Foundation for Autism Research, Autism Speaks, and INSERM. G.N. and C.G. were supported by the Swedish Science Council and by the Annmari and Per Ahlqvist Foundation; and R.J.H. and T.N.D. by the Medical Research Council (G0500833). M.P. and E.D. were supported by PhD fellowships from the French Ministry of Research. We gratefully acknowledge the CNV resources provided by the Autism Genome Project consortium, funded by Autism Speaks, the Health Research Board of Ireland, the Medical Research Council, Genome Canada/Ontario Genomics Institute, and the Hillbrand Foundation.

Author contributions C.B. designed and coordinated the study; M.P. and A.P. performed sequencing experiments and variant confirmations; E.D. participated in the genetic analyses; B.A., V.G., F.D., G.N., M.R., R.D., C.G. and M.L. participated in subject recruitment and assessment; J.C.M. constructed the plasmid encoding GLRA2; M.P. and S.G. performed site-directed mutagenesis; M.P. and H.L.C. performed the immunohistochemistry; H.L.C. and P.L. performed the *in vitro* electrophysiology studies; V.M.J., M.T. and R.J.H. performed molecular modelling; M.P., C.F. and J.H. performed the zebrafish experiments; T.N.D. and R.J.H. generated *Gla2* knockout mice; M.P. performed the behavioural experiments and analysed the results with C.B.; J.B. and S.O. performed the *ex vivo* electrophysiology studies; B.G. provided key facilities and equipment and consulted on the execution and interpretation of the behavioural and electrophysiological studies; M.P. and C.B. wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.B. (catalina.betancur@inserm.fr).

METHODS

Subjects. Patients were recruited by the Paris Autism Research International Study (PARIS) at specialized clinical centres in France and Sweden³⁰. All patients were evaluated by psychiatrists and diagnosed based on clinical evaluation and DSM-IV criteria. Subjects were assessed with the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) and the Asperger Syndrome Diagnostic Interview³¹; those recruited more recently were also assessed with the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS). At the time of inclusion, patients were screened for genetic disorders associated with autism; investigations included karyotype, molecular genetic testing for fragile X syndrome, and metabolic screening; brain imaging and EEG were performed when possible. In addition, subjects were screened for microdeletion/microduplication syndromes using fluorescent *in situ* hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), and/or chromosomal microarray analysis. Patients with known genetic disorders were excluded from subsequent analysis. Informed consent was obtained from all participating families. The study was approved by the research ethics boards of the collaborating institutions.

The sample of 400 independent males screened for *GLRA2* mutations included 334 probands from simplex families and 66 from multiplex families (with two or more affected siblings); 336 met criteria for autism, 44 for Asperger syndrome, and 20 for pervasive developmental disorder not otherwise specified; 42% had very limited or no language; 62% had intellectual disability (IQ<70), and 8.5% had a history of epilepsy. The mean age at inclusion was 11.8 years (3-39 years). Most patients were Caucasian (90%).

After identifying the *GLRA2 de novo* missense mutation in Patient 2 (c.458G>A), we screened 404 reportedly unaffected fathers from the PARIS cohort for this variant.

Mutation screening. Genomic DNA was extracted from blood leukocytes or B lymphoblastoid cell lines using standard procedures. The nine *GLRA2* coding exons and intron-exon boundaries of *GLRA2* were PCR amplified using specific primers designed with Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu>; Supplementary Table 2). Alternative splicing of exon 3 generates two splice variants, GlyR α 2A and GlyR α 2B, differing by only two amino acids at positions 85 and 86; specific primers were designed to span the two alternative exons 3 for sequence analysis. The PCR reaction was performed with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) in 20 μ l reaction mix (20 ng genomic DNA, 0.5 μ M of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, and 1X *Taq* Polymerase PCR Buffer). Two PCR protocols were used: (i) standard protocol (exons 5, 7, and 8): 95°C for 30 sec, followed by 35 cycles at 95°C for 30 sec, 58°C (exon 7) or 60°C (exons 5 and 8) for 30 sec, 72°C for 30 sec, with a final cycle at 72°C for 10 min; and (ii) touchdown protocol (exons 1, 2, 3, 4, 6, and 9): 95°C for 10 min followed by 20 cycles at 95°C for 30 sec, 65-55°C (exon 1), 62-56°C (exons 2, 3, 6, and 9) or 56-50°C (exon 4) for 30 sec; 72°C for 1 min, followed by 20 cycles at 95°C for 30 sec; 55°C (exon 1), 56°C (exons 2, 3, 6, and 9) or 50°C (exon 4) for 30 sec; 72°C for 1 min, with a final cycle at 72°C for 10 min. PCR products were visualized in a 1% agarose gel and purified using exonuclease I (USB Corporation, Cleveland, OH) and shrimp alkaline phosphatase (USB). Sequence analysis was performed by direct sequencing of the PCR products using BigDye Terminator v3.1 mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and then analysed by capillary electrophoresis on an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems). Where mutations were shown to have arisen *de novo*, we verified maternity and paternity by genotyping both parents and the subject at several microsatellite loci.

Reference sequences. GenBank accession numbers for genomic and protein sequences for *GLRA2* are NM_002063 and NP_001112357, respectively. Note that amino acid sequence numbering is given with the signal peptide; residues are numbered starting at the initiator methionine, in accordance with the nomenclature recommendations of the Human Genome Variation Society (HGVS, <http://www.hgvs.org>). The first amino acid after signal peptide cleavage is residue number 28. Genomic locations are based on GRCh37/hg19.

Real-time quantitative PCR and long-range PCR. qPCR with the Universal Probe Library (UPL) system from Roche (Indianapolis, IN) was used to confirm and map the deletion in Patient 1. Long-range PCR was carried out using the Expand Long Template PCR System from Roche, followed by sequencing of the junction fragment.

Determination of X-inactivation pattern. X chromosome inactivation was determined by evaluating the methylation status of the polymorphic

(CAG)_n repeat located in the first exon of the human androgen receptor (*AR*) gene, as previously described³². Briefly, two digestion reactions were performed. In one reaction, genomic DNA (50 ng) was digested with the methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII* (which cuts the active unmethylated allele) and the *RsaI* restriction enzyme (which cuts active and inactive alleles equally). In the other reaction, DNA was digested with *RsaI* alone as a control. Digested DNA was amplified with primers spanning the (CAG)_n repeat (F: 5'-FAM-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' and R: 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCATC-3'). The resulting products were run on an ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems) and the raw data were imported into GeneMarker software (SoftGenetics) for fluorescent fragment analysis. The peak heights for each allele were normalized and the XCI ratio was then deduced. One female sample with skewed X inactivation ratio (>95:5) and one control male were included in each batch of samples to control for complete digestion and amplification efficiency. X chromosome inactivation was considered skewed if the ratio was $\geq 80:20$.

GLRA2 constructs. *GLRA2* cDNA was generated from human hippocampus poly A⁺ RNA (Clontech, Mountain View, CA) and cloned into pEGFP-N1 vector (Clontech) using *NotI*, which excises the EGFP-coding sequence. Mutations were performed using the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's instructions, and positive clones were identified by DNA sequencing. The *GLRA2* truncated mutant was produced to end at amino acid 310, immediately followed by 6 amino acids (VRNLA*), resulting in a 316 amino acid truncated mutant protein, as predicted in Patient 1 (Extended Data Fig. 3). For the *GLRA2* construct mimicking the mutation in Patient 2, the arginine residue at position 153 was changed to glutamine (R153Q) (Extended Data Fig. 3).

Cell culture and transfection. Chinese hamster ovary (CHO) cells were cultured at 35°C in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 mg/ml glucose and 10% fetal bovine serum. The different *GLRA2* constructs were co-transfected with enhanced green fluorescent protein (EGFP) cDNA using FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol. CHO cells were recorded or immunolabelled 48 h after transfection.

Whole-cell recordings. Whole-cell patch-clamp recordings of transfected CHO cells were performed at room temperature using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) in saline solution containing (in mM): 126 NaCl, 1.2 NaH₂PO₄, 4.5 KCl, 10 glucose, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ and 10 HEPES (pH 7.2). Patch-clamp electrodes (4-6 M Ω) contained an internal solution with the following composition (in mM): 130 CsCl, 4 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 10 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.2). Transfected cells were selected according to their EGFP expression under UV light. Data were low-pass filtered at 2 KHz, digitized at 20 kHz with a Digidata 1322A interface, and acquired using PClamp 10 software (Molecular Devices). Glycine was applied using 0.5 mm diameter quartz tubing positioned 1 mm away from the recording area¹⁴. The quartz tubing was connected using a manifold to reservoirs filled with saline solution or with different concentrations of glycine (solution exchange times \leq 30 ms). Different glycine concentrations were applied to CHO cells expressing wild-type or mutant GlyR α 2 subunits to control possible amplitude rundown. All compounds were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Analyses were performed off-line with PClamp10 software package or Axograph X.1.3.5 software (AxoGraph Scientific, Sydney, Australia).

Immunohistochemistry and confocal microscopy. Transfected CHO cells were immunolabelled using the goat polyclonal antiserum against the N-terminal 18 amino acids of the human GlyR α 2 subunit (1:300; GlyR α 2 N-18: SC-17279; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Cells were fixed in 2% paraformaldehyde, washed in PBS, and incubated in PBS-NH₂Cl (100 mM) for 20 min, followed by blocking in 20 mM PBS with 0.25% fish gelatin for 30 min at room temperature. Cells were subsequently incubated with the first antibody at room temperature for 2 h and then with an anti-goat Alexa Fluor 594 (red) secondary antibody (1:1000; Invitrogen) at room temperature for 2 h. Both antibodies were diluted in the blocking solution. In some experiments, cells were permeabilized with Triton X-100 (0.2% Triton X-100 in PBS-gelatin solution) for 30 min at room temperature, to visualize the deleted construct retained in the cytoplasm. Images were taken using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Molecular modelling of the GlyR $\alpha 2$ homomer. Fold recognition of human GlyR $\alpha 2$ subunit was performed with HHPred³³. The structure of the *Caenorhabditis elegans* glutamate-gated chloride channel α (GluCl) (PDB: 3RIF) was identified as the best template. A profile-profile alignment between the human GlyR $\alpha 2$ subunit and the *C. elegans* GluCl α subunit (chain A) was generated using MUSCLE web server (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle), resulting in 42% sequence identity. Based on this alignment, 50 homology models of human GlyR $\alpha 2$ subunit were built using MODELLER-9v10 (<http://salilab.org/modeller/>) and assessed with the DOPE statistical potential score. The model based on the lowest score (Z score = -0.174) was selected. Additional evaluation using the ProSA web server (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) showed that the model quality (Z score = -4.95) fell within a range typically found for native proteins of similar size, demonstrating the high quality and reliability of the model. Using the Chimera molecular visualization and analysis software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), a glycine molecule was docked into an approximate position within the predicted binding site, using structural information about the binding of glutamate in the GluCl obtained from the crystal structure (PDB: 3RIF), and experimental evidence of residues in GlyR $\alpha 1$ that are known to interact with the glycine ligand³⁴. The substitution R153Q was modelled into the GlyR $\alpha 2$ homology model using the *swapa* command, taking into account the highest rotamer probability (based on the Dunbrack backbone-dependent rotamer library), the highest number of H-bonds, and the lowest clash score.

Zebrafish knockdown and rescue experiments. Zebrafish embryos were raised at 28°C in E3 medium supplemented with 0.2 mM 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Sigma) to prevent pigment formation and staged according to Kimmel *et al.*³⁵. A morpholino oligonucleotide (*glra2* MO: 5'-TTTGACCGAAGGGCGAGTCATTCCT-3'), predicted to specifically block *glra2* translation initiation site without affecting the translation of other zebrafish GlyR α subunits (*glra1*, *glra3*, *glra4a*, and *glra4b*), was designed by GeneTools (Philomath, OR) and injected at 1 pmole per embryo. For rescue experiments, the wild-type, mutated, and deleted versions of human *GLRA2* cDNA were subcloned into the pCS2+ expression vector and *in vitro* transcribed using SP6 mMessage mMachine kit (Ambion Europe, Huntingdon, UK). The resulting mRNAs were injected at 100 pg in one-cell stage wild-type embryos while *glra2* MO was subsequently injected at the two-cell stage. Doubly injected, morphant and control embryos were fixed at 28 h post fertilization in 4% paraformaldehyde for 2 h at room temperature. Whole-mount immunohistochemistry using the primary antibody znp-1 (ZIRC, University of Oregon, OR) at 1:100 was carried out according to standard procedures as previously reported³⁶. Images were acquired using a fluorescence microscope equipped with an Apotome module (Axiovert 200M, Carl Zeiss France, Le Pecq, France) and processed with the NIH ImageJ software. Each experiment was reproduced four times and statistical analyses were performed using the Student's unpaired *t*-test.

Generation of *Gla2* knockout mice. *Gla2* mutant mice were generated by targeted deletion of exon 7 encoding transmembrane domains 1 and 2 (TM1-TM2). The targeting vector was constructed in pEasyFlox to contain loxP sites flanking exon 7 of *Gla2* and a neomycin cassette. The targeted construct was introduced into the 129/SvJae derived PC3 ES cell line for homologous recombination. Correctly targeted ES cells were selected and injected into C57BL/6J blastocysts to obtain *Gla2* chimeric mice. Because the PC3 ES cell line contains a transgene driving expression of cre recombinase under the control of the protamine 1 promoter³⁷, cre-mediated excision of exon 7 and/or the neomycin cassette was induced in the male chimeras germ line during the terminal haploid stages of spermatogenesis. Mice containing the *Gla2* exon 7 deleted allele were obtained by mating chimeric mice with wild-type mice. Targeted disruption of *Gla2* in the progeny was confirmed by PCR and Southern blotting. Mice were genotyped by PCR analysis using two sets of primers (F1: 5'-CACATGAACCCCAACACAAG-3' and R1: 5'-AATGTTGCAACACCAACGA-3'; F2: 5'-TGATCCTTTCTGCTCCAG-3' and 5'-GCTTTCGACAAGACCTTTGG-3'). Mutant mice were backcrossed to C57BL/6J for at least eight generations before experiments. Only males were used for the behavioural, molecular, and electrophysiological studies. All experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) regarding the housing, care, and experimental procedures on mice.

Behavioural assays. Behavioural assays were done blind to genotype with control littermates. Six independent cohorts of WT and *Gla2*^{-/-} mice were tested. The first cohort included 16 WT and 15 *Gla2*^{-/-} littermates, except when noted (Supplementary Table 1). The order of the tests was as follows: spontaneous locomotion, elevated plus maze, light-dark box, open-field test, sociability and preference for social novelty, marble burying, self-grooming/stereotypies, olfactory habituation/dishabituation test, novel object recognition task, novel location recognition task, inverted wire hang, Morris water maze, accelerating rotarod, and hole board. A second (12 mice per genotype) and a third cohort (8 mice per genotype) were tested for nesting and social interaction with juveniles. Three additional independent replication cohorts ($n = 9$ WT, 6 *Gla2*^{-/-}; $n = 7$ WT, 8 *Gla2*^{-/-}; $n = 11$ WT, 11 *Gla2*^{-/-}) were reexamined in the novel object recognition task and the sociability and preference for social novelty test. A detailed description of experimental procedures is provided in Supplementary Methods.

Electrophysiology. Male *Gla2*^{-/-} mice and WT littermates were decapitated and the brain was rapidly removed from the skull. Coronal slices (400 μ m) containing the prelimbic area (1.94-2.8 mm from the bregma) were sectioned with a vibratome (Campden Instruments, Loughborough, UK) in chilled oxygenated (95% O₂/5% CO₂) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing in mM: 124 NaCl, 2 KCl, 26 NaHCO₃, 1.15 KH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, and 11 D-glucose. Slices were allowed to recover in oxygenated ACSF at room temperature for at least 3 h before recording. Experiments were performed in a submersion recording chamber with continuous perfusion (1 ml/min) of warmed ACSF (32°C).

Experiments were conducted in the following order: recording of stable baseline field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) for at least 20 min, delivery of high-frequency stimulation (HFS, 50 pulses at 100 Hz, 5 times with 3 min interval) to induce plasticity, followed by response monitoring for 50 min post-conditioning. The stimulating and recording electrodes were both placed on the surface of layer I-II, as described³⁸. Single stimulations (monophasic constant current square pulses; 100 μ s width) were applied through a bipolar stimulating electrode (teflon-coated tungsten, A-M Systems, WA). Recordings were made with glass micropipettes filled with 3 M NaCl. fEPSPs were evoked at 0.033 Hz, and the response size was set at 60% of the maximum amplitude, which was about 0.7-0.8 mV with 30-40 μ A stimulus intensities. All evoked responses were fed to an amplifier in current-clamp mode and digitized at 10 kHz through a Digidata 1322A interface (Molecular Devices) using Elphy data-acquisition software (CNRS, Gif sur Yvette, France). The initial slope of the EPSP (1 ms period from its onset, mV/ms) was calculated for each individual EPSP as previously described³⁸. Statistical comparisons between genotypes were performed with repeated measures analysis of variance (ANOVA) for the 50 min post-conditioning period.

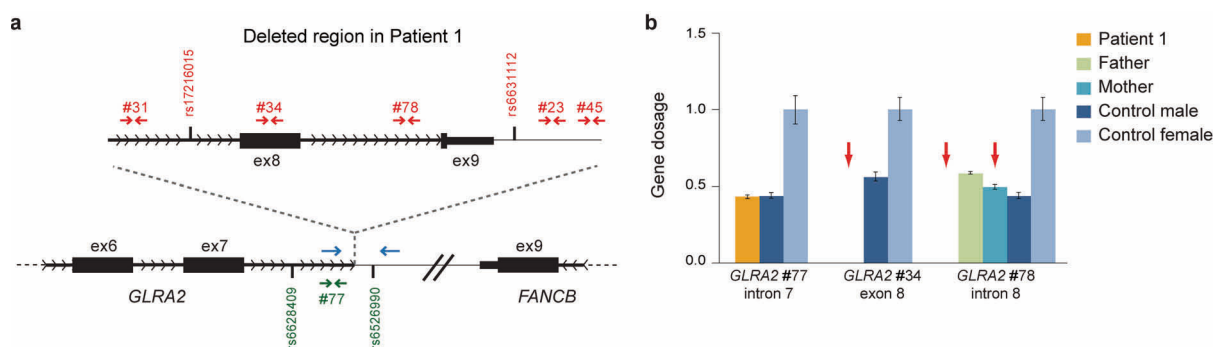
Real-time reverse transcription PCR. RNA samples from prefrontal cortex were obtained from embryonic (E12 and E14), neonatal (P0 and P5), juvenile (P15 and P20), and adult WT and *Gla2*^{-/-} mice. Total RNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen), treated with DNase I (Invitrogen), and used to produce total cDNA with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random primers. 25 ng of total cDNA was used for the qPCR, performed as described above using the UPL system from Roche. Intron-spanning primers were designed using the ProbeFinder v2.04 software (Supplementary Table 3). The gene encoding mouse β -glucuronidase (*Gusb*) was used as control. The relative mRNA expression levels were calculated with a comparative threshold cycle (Ct) method using *Gusb* as control [Δ Ct=Ct(target gene)-Ct(*Gusb*)], and a control sample [$\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct(sample test)- Δ Ct(control sample)]. The relative transcript number was then calculated as 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Statistics. Data are shown as mean \pm SEM and analysed using Student's *t*-test or ANOVA. Statistical analyses were done using Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) for behavioural studies and StatView (SAS Institute, Cary, NC) for *ex vivo* electrophysiology. Full statistical tests are presented in Supplementary Table 1.

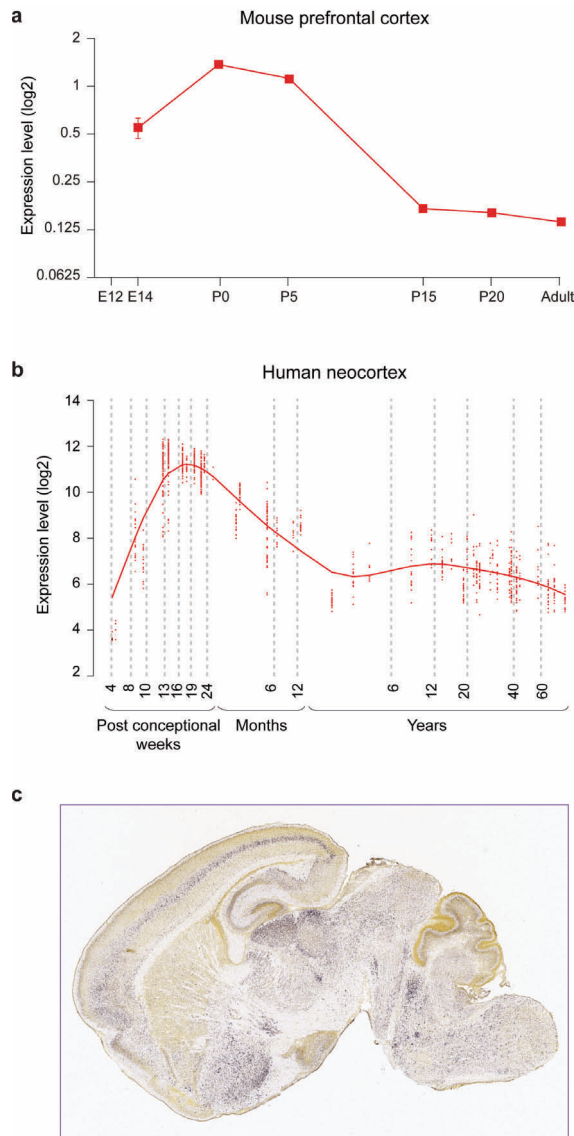
31 Gillberg, C., Gillberg, C., Rastam, M., and Wentz, E., The Asperger Syndrome (and high-functioning autism) Diagnostic Interview (ASDI): a preliminary study of a new structured clinical interview. *Autism* 5, 57-66 (2001).

32 Amos-Landgraf, J. M. et al., X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 79, 493-499 (2006).

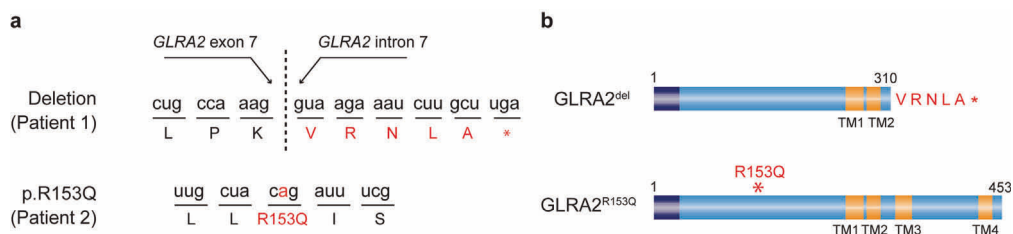
- 33 Soding, J., Biegert, A., and Lupas, A. N., The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* **33**, W244-248 (2005).
- 34 Pless, S. A. et al., A cation-pi interaction at a phenylalanine residue in the glycine receptor binding site is conserved for different agonists. *Mol Pharmacol* **79**, 742-748 (2011).
- 35 Kimmel, C. B. et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310 (1995).
- 36 Fassier, C. et al., Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat Neurosci* **13**, 1380-1387 (2010).
- 37 O'Gorman, S., Dagenais, N. A., Qian, M., and Marchuk, Y., Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14602-14607 (1997).
- 38 Bai, J. et al., Inhibition of dopamine transporter activity impairs synaptic depression in rat prefrontal cortex through over-stimulation of D1 receptors. *Cereb Cortex (Epub ahead of print)* (2012).
- 39 Jakobsson, M. et al., Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature* **451**, 998-1003 (2008).
- 40 Kirov, G. et al., Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia. *Hum Mol Genet* **18**, 1497-1503 (2009).
- 41 Shaikh, T. H. et al., High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications. *Genome Res* **19**, 1682-1690 (2009).
- 42 Altshuler, D. M. et al., Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* **467**, 52-58 (2010).
- 43 Grond-Ginsbach, C. et al., Copy number variation in patients with cervical artery dissection. *Eur J Hum Genet* **20**, 1295-1299 (2012).
- 44 Silversides, C. K. et al., Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS Genet* **8**, e1002843 (2012).
- 45 Krepschi, A. C. et al., Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res* **14**, R24 (2012).
- 46 Iossifov, I. et al., De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* **74**, 285-299 (2012).
- 47 O'Roak, B. J. et al., Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe *de novo* mutations. *Nat Genet* **43**, 585-589 (2011).
- 48 O'Roak, B. J. et al., Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* **338**, 1619-1622 (2012).
- 49 Klassen, T. et al., Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell* **145**, 1036-1048 (2011).
- 50 Lim, E. T. et al., Rare complete knockouts in humans: population distribution and significant role in autism spectrum disorders. *Neuron* **77**, 235-242 (2013).
- 51 Liu, L. et al., Analysis of rare, exonic variation amongst subjects with autism spectrum disorders and population controls. *PLoS Genet* **9**, e1003443 (2013).
- 52 Piton, A. et al., Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* **16**, 867-880 (2011).
- 53 Chahrour, M. H. et al., Whole-exome sequencing and homozygosity analysis implicate depolarization-regulated neuronal genes in autism. *PLoS Genet* **8**, e1002635 (2012).
- 54 Jiang, Y. H. et al., Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* **93**, 249-263 (2013).
- 55 Need, A. C. et al., Exome sequencing followed by large-scale genotyping suggests a limited role for moderately rare risk factors of strong effect in schizophrenia. *Am J Hum Genet* **91**, 303-312 (2012).
- 56 Tarpey, P. S. et al., A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* **41**, 535-543 (2009).
- 57 Rauch, A. et al., Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* **380**, 1674-1682 (2012).
- 58 de Ligt, J. et al., Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* **367**, 1921-1929 (2012).
- 59 Feng, J. et al., Systematic screening for mutations in the glycine receptor $\alpha 2$ subunit gene (GLRA2) in patients with schizophrenia and other psychiatric diseases. *Psychiatr Genet* **11**, 45-48 (2001).
- 60 Grantham, R., Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* **185**, 862-864 (1974).
- 61 Cooper, G. M. et al., Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* **15**, 901-913 (2005).
- 62 Ashkenazy, H. et al., ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **38**, W529-533 (2010).
- 63 Adzhubei, I. A. et al., A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248-249 (2010).
- 64 Calabrese, R. et al., Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat* **30**, 1237-1244 (2009).
- 65 Li, B. et al., Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* **25**, 2744-2750 (2009).
- 66 Mi, H., Muruganujan, A., and Thomas, P. D., PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res* **41**, D377-386 (2013).
- 67 Ng, P. C. and Henikoff, S., SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* **31**, 3812-3814 (2003).



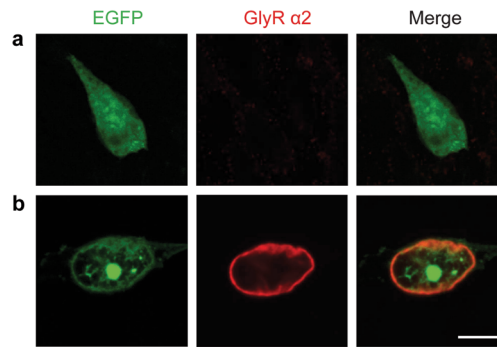
Extended Data Figure 1 | Identification and characterization of a microdeletion of *GLRA2* in ASD. **a**, Schematic representation of the deleted region. Markers rs17216015 to rs6631112 (Human1M-Duo BeadChip, Illumina) corresponding to the chromosomal region 14,693,216-14,836,199 (hg19) were deleted according to the microarray analysis². Specific primers were used to validate and roughly map the deletion by real-time PCR. Deleted and non-deleted probes are indicated in red and green, respectively, with the qPCR UPL probe numbers. The junction across the deletion was amplified by long-range PCR (primers in blue). **b**, Fluorescent probe-based quantitative real-time PCR using primers in exon 8 (*GLRA2* #34) and intron 8 (*GLRA2* #78) of *GLRA2* confirmed the deletion in Patient 1 and his mother, compared to primers in intron 7 (*GLRA2* #77) located outside the deleted region. Data represent mean \pm SEM.



Extended Data Figure 2 | Expression of the gene encoding the GlyR $\alpha 2$ subunit in mouse and human brain. **a**, Real-time reverse transcription PCR on prefrontal cortex mRNAs from wild-type mice showed the relative expression of *Glra2* during embryonic (E12-E14) and postnatal development (P0-adult) ($n=4-6$ mice/developmental stage). Expression of *Glra2* initiated at E14. **b**, The relative expression of the *GLRA2* gene within human cortical areas during pre- and post-natal periods was obtained from the Human Brain Transcriptome database (<http://hbatlas.org>). **c**, Coronal slice showing *Glra2* *in situ* hybridization from P4 mouse brain atlas (Allen Mouse Brain Atlas, <http://www.brain-map.org>).

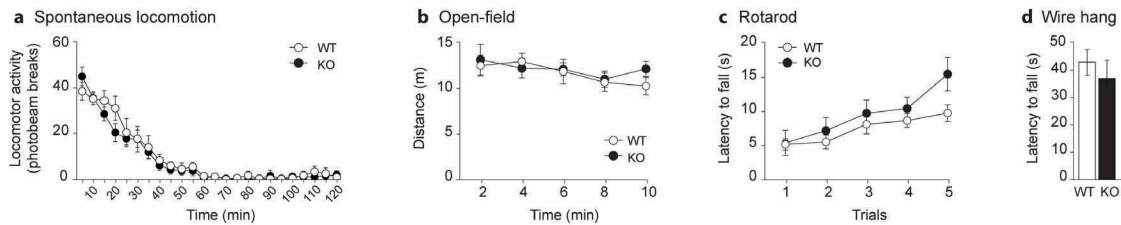


Extended Data Figure 3 | Predicted RNA sequences in Patients 1 and 2 and human GLRA2 constructs used for transfection in CHO cells. **a**, The *GLRA2* deletion removes exons 8 and 9 in Patient 1, causing an aberrant transcript probably leading to translation of intron 7 up to a premature stop codon (VRNLA*). The *GLRA2* *de novo* missense mutation in Patient 2 changes an arginine to a glutamine residue (p.R153Q). **b**, Schematic representation of deleted and mutated *GLRA2* constructs. The truncated mutant was produced to end at amino acid 310, immediately followed by 6 amino acids (VRNLA*), resulting in loss of two transmembrane domains, as predicted in Patient 1. In the mutant construct, Arg153 was mutated to glutamine as in Patient 2. The first and last amino acids are numbered; the signal peptide and the four transmembrane domains are shown in dark blue and orange, respectively.

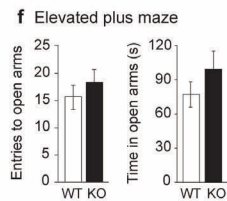
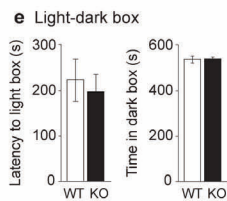


Extended Data Figure 4 | The GLRA2 truncated mutant fails to localize properly in transfected CHO cells. Confocal images showing EGFP expression (green) and N-18 staining of the GlyR $\alpha 2$ subunit (red) in transfected CHO cells expressing the truncated mutant (GLRA2^{del}) under normal conditions (a) or after permeabilization (b). a, No GlyR $\alpha 2$ staining was observed in non-permeabilized CHO cells expressing GLRA2^{del}. b, After permeabilization of the cells with Triton X-100, GLRA2^{del} was detected in the cytoplasm, as shown by the N-18 diffuse staining close to the cell surface. Scale bar: 10 μ m.

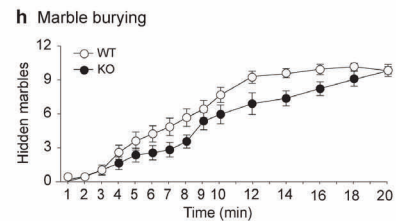
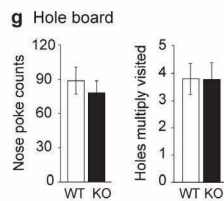
Locomotion and coordination



Anxiety-related behaviour

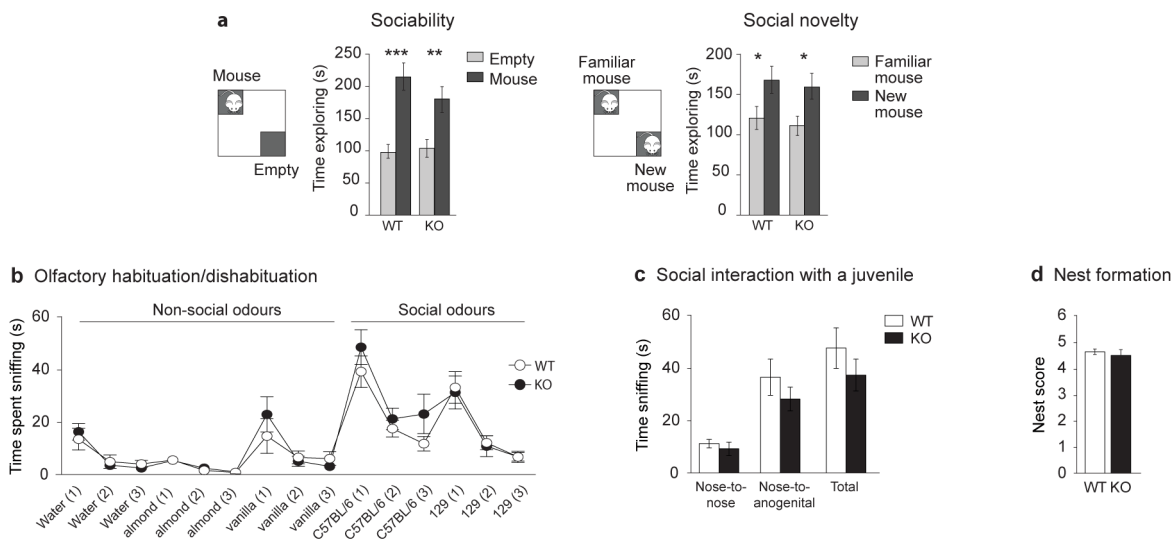


Repetitive behaviour

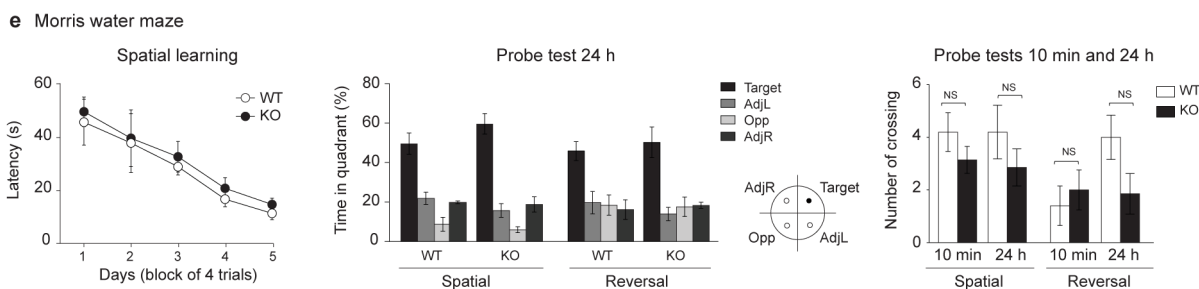


Extended Data Figure 5 | *Gla2* mutant mice showed normal locomotion, coordination, anxiety and repetitive behaviour.

a, Spontaneous locomotion (horizontal and vertical activity) was normal in mutant mice ($n=13$ WT, 15 *Gla2*^{-/-}). No differences between genotypes were observed when analysing horizontal and vertical activity separately (data not shown). b, Distance travelled in the open-field over a 10 min session was similar between genotypes ($n=16$ WT, 15 *Gla2*^{-/-}). c, *Gla2*^{-/-} mice showed normal motor coordination on an accelerating rotarod ($n=11$ WT, 8 *Gla2*^{-/-}). d, Mutant mice exhibited normal performance in the wire hang test ($n=16$ WT, 15 *Gla2*^{-/-}). e, Latency to enter the light side and time spent in the dark chamber were comparable between genotypes in the light-dark box test ($n=16$ WT, 15 *Gla2*^{-/-}). f, Number of entries and cumulative time spent in open arms were normal in *Gla2*^{-/-} mice in the elevated plus maze ($n=11$ WT, 12 *Gla2*^{-/-}). g, Mutant mice tested in the hole board showed similar nose poke counts and number of holes multiply visited compared to the WT mice ($n=9$ WT, 8 *Gla2*^{-/-}). h, Marble burying did not reflect any repetitive or anxiety-like behaviour when quantified by the number of marbles buried during a 20 min test period ($n=16$ WT, 15 *Gla2*^{-/-}).



Learning and memory



Extended Data Figure 6 | *Gla2* mutant mice exhibited normal social behaviour and showed no deficits in the Morris water maze test. **a**, During the social approach task, both WT and *Gla2*^{-/-} showed preference for a caged mouse over an empty box as measured by time spent exploring both cages. In the preference for social novelty task, both genotypes showed normal social memory and preference for a novel stranger mouse ($n=36$ WT, 38 *Gla2*^{-/-}; data pooled from four cohorts). **b**, Olfactory habituation and dishabituation to nonsocial and social odours were measured as time spent sniffing odours presented on a series of cotton swabs. No difference between genotypes was observed ($n=16$ WT, 15 *Gla2*^{-/-}). **c**, Time spent sniffing either nose or anogenital region, and total time spent sniffing both body regions of a male juvenile C57BL/6J were comparable between genotypes ($n=15$ mice/genotype). **d**, *Gla2*^{-/-} mice displayed normal quality scores of nest formation ($n=8$ mice/genotype). **e**, Morris water maze test. Mean escape latencies during training in the hidden platform test indicated similar spatial learning in WT and mutant mice ($n=5$ WT, 7 *Gla2*^{-/-}). Both genotypes showed a significant preference for the target quadrant during a probe trial performed 10 min (**Fig. 4c**) or 24 h after the last training session in the spatial and reversal tasks. The number of platform crossings during probe trials (10 min and 24 h) was also similar for both genotypes in the spatial and reversal tests. AdjL, adjacent left quadrant; Target, target quadrant; AdjR, adjacent right quadrant; Opp, opposite to target quadrant. Data represent mean \pm sem. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Extended Data Table 1 | Whole-genome CNV studies including *GLRA2* in ASD and controls

Study	Number of individuals	Details	Reported CNV including <i>GLRA2</i>	Method and resolution	Comment	Source
Controls						
Jakobsson et al. 2008	485	485 individuals from the Human Genome Diversity Project–CEPH panel (309 M, 176 F)	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Illumina HumanHap550	Analysis restricted to CNVs >10 SNPs	DGV
Kirov et al. 2009	2792	Schizophrenia study 2792 controls from the Wellcome Trust Case Control Consortium (1384 M, 1408 F)	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Affymetrix 500K	Analysis restricted to CNVs >100 kb	Supp. online
Shaikh et al. 2009	2026	2026 healthy individuals from the Children’s Hospital of Philadelphia, 65% Caucasians (gender not available)	No <i>GLRA2</i> deletion; 16 exonic gains	Illumina HumanHap 550	No <i>GLRA2</i> duplications have been reported in over 13000 controls in other studies, suggesting that the gains reported in this study are likely to be artefacts	DGV
Altshuler et al. 2010	1184	1184 HapMap individuals from 11 populations (gender not available)	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Affymetrix SNP array 6.0, Illumina 1M		DGV
Pinto et al. 2010	4570	ASD study, Autism Genome Project consortium 2712 parents and 1858 controls	<i>GLRA2</i> deletion (chrX:14693216-14836199, hg19) in mother of 6323-3 (Patient 1)	Illumina 1M	Minimal CNV size: 5 kb with at least 5 probes	AGP database
Sanders et al. 2011	3120	ASD study, Simons Simplex Collection 872 unaffected sibs (403 M, 469 F) and 2248 parents (1124 M, 1124 F)	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Illumina 1Mv1, Illumina 1Mv3 Duo		Supp. online
Grond-Ginsbach et al. 2012	473	70 cervical artery dissection patients of European ancestry; 403 white Northern Germans collected in the PopGen study	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Affymetrix SNP array 6.0	Analysis restricted to CNVs >100 kb	Supp. online
Silversides et al. 2012	756	340 tetralogy of Fallot and/or pulmonary atresia cases of European ancestry; 416 Ontario Population Genomics Platform control individuals	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Affymetrix SNP array 6.0	Analysis restricted to CNVs >10 kb with ≥5 array probes	Supp. online
Krepischi et al. 2012	168	68 women with breast cancer; 100 controls	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Agilent 180K	Smallest CNV = 7 kb	Supp. online
Total controls	15574					
ASD cases						
Pinto et al. 2010	1132	1132 ASD probands from simplex and multiplex families (Autism Genome Project), including 996 European and 136 from other ancestries	<i>GLRA2</i> deletion (chrX:14693216-14836199, hg19) in 6323-3 (Patient 1)	Illumina 1M	Minimal CNV size: 5 kb with at least 5 probes	Supp. online, AGP database
Sanders et al. 2011	1124	1124 ASD probands from simplex families (Simons Simplex Collection)	No <i>GLRA2</i> deletion or duplication	Illumina 1Mv1, Illumina 1Mv3 Duo		Supp. online
Total ASD cases	2256					

AGP, Autism Genome Project; ASD, autism spectrum disorder; CNV, copy number variant; DGV, Database of Genomic Variants; F, female; M, male; SNP, single nucleotide polymorphism

Extended Data Table 2 | Sequencing of *GLRA2* in controls and cases with ASD or other neurodevelopmental disorders in previous studies

Study	Number of individuals	Males	Females	Approach	Comment
Controls					
Klassen et al. 2011	139 controls	62	77	Targeted sequencing of ion channel genes, including <i>GLRA2</i>	
NHLBI Exome Variant Server ^a	6503 controls	2443	4060	Whole exome sequencing	
1000 Genomes Project, Abecasis et al. 2012	1092 genomes from 14 populations	525	567	Whole-genome and exome sequencing	
NIH ARRA Autism Sequencing Consortium Lim et al. 2013; Liu et al. 2013	870 controls	420	450	Whole exome sequencing	
Total individuals: 8604 (3450 males, 5154 females)					
Total X chromosomes: 13758					
Cases^b					
Piton et al. 2011	142 ASD cases (122 M, 20 F) and 143 schizophrenia cases (95 M, 48 F)	217	68	Targeted sequencing of X-chromosome synaptic genes, including <i>GLRA2</i>	One ASD female carries a <i>GLRA2</i> missense variant (p.R350L), inherited from a healthy mother (see Extended Data Table 3)
Chahrouh et al. 2012	16 probands with ASD	14	2	Whole exome sequencing	One ASD male carries a <i>GLRA2</i> missense variant (p.I421V), also reported in a male control from the EVS
NIH ARRA Autism Sequencing Consortium Lim et al. 2013; Liu et al. 2013	937 cases with ASD	785	152	Whole exome sequencing	
Jiang et al. 2013	32 probands with ASD	25	7	Whole genome sequencing	
Need et al. 2012	166 cases with schizophrenia	N/A	N/A	Whole exome (n = 134) or whole genome sequencing (n = 32)	
Tarpey et al. 2009	208 families with X-linked intellectual disability, with multiple affected individuals	208	0	Targeted sequencing of X-chromosome coding exons	Two affected males carry a <i>GLRA2</i> missense variant (p.I421V), also reported in a male control from the EVS
Rauch et al. 2012	51 trios with sporadic non-syndromic intellectual disability	19	32	Whole exome sequencing	
De Ligt et al. 2012	100 trios with intellectual disability	47	53	Whole exome sequencing	
Klassen et al. 2011	151 cases with idiopathic epilepsy	66	85	Targeted sequencing of ion channel genes, including <i>GLRA2</i>	
Feng et al. 2001	5 patients with ASD, 113 with schizophrenia, 30 with ADHD, 28 with bipolar disorder, 25 with alcoholism, 24 with puerperal psychosis	N/A	N/A	Targeted sequencing of <i>GLRA2</i>	
Total individuals: 2171 (1381 males, 399 females and 391 of unknown gender)					
1132 ASD, 422 schizophrenia, 359 ID, 151 epilepsy					

^a Exome Variant Server, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), accessed November 2013, EVS data release ESP6500SI-V2.

^b Whole-exome sequencing in 777 ASD probands from the Simons Simplex Collection (622 males, 155 females) failed to identify any *de novo* variants in *GLRA2*^{4-6,46-48}; however, because these studies only reported *de novo* variants they cannot be included in this table.

ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; ASD, autism spectrum disorder; EVS, Exome Variant Server; F, female; M, male; N/A, not available; NHLBI, National Heart, Lung, and Blood Institute; SSCP, single-strand conformation polymorphism

Extended Data Table 3 | Loss-of-function and non-synonymous missense variants reported in *GLRA2* in ASD and in the Exome Variant Server

Variant pos (hg19)	rs ID	Variant type	cDNA change	Protein change	Grantham score ^e	GERP ^b Consurf ^c	PolyPhen-2 ^d	SNPs&GO ^g	MutPred ^f	PANTHER ⁹	SIFT ^h	Comment	
Variant identified in Patient 2 (this study)													
X:14599492	N/A	Missense	c.458G>A	p.R153Q	43	5.64	9 (e,f)	Probably damaging	Disease (RI=8)	0.896	-3.3132	Damaging	Not found in 2443 males and 4060 females from EVS nor reported in the literature
Variants reported in ASD not present in the Exome Variant Server													
X:14548195	N/A	Missense	c.16G>C	p.V6L	32	5.47	3 (b)	Possibly damaging	Neutral (RI=2)	0.383	N/A	Tolerated	1 heterozygous ASD female among 343 families, <i>de novo</i> (Iossifov et al. 2012)
X:14708950	N/A	Missense	c.1049G>T	p.R350L	102	5.0	3 (e)	Probably damaging	Disease (RI=6)	0.502	-3.29768	Damaging	1 heterozygous ASD female among 142 patients (122 males, 20 females), inherited from an unaffected mother (Piton et al. 2011)
Variants reported in the Exome Variant Server													
X:14550363	rs144675165	Missense	c.71C>T	p.T24M	81	3.98	1 (b)	Benign	Neutral (RI=2)	0.393	N/A	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 1 male out of 2443
X:14550374	rs138307435	Missense	c.82A>G	p.K28E	56	4.87	1 (e)	Possibly damaging	Neutral (RI=1)	0.422	N/A	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14550384	N/A	Missense	c.92A>T	p.D31V	152	4.87	1 (e)	Possibly damaging	Neutral (RI=4)	0.336	N/A	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14592469	N/A	Missense	c.217G>A	p.V73I	29	5.75	8 (b)	Probably damaging	Disease (RI=1)	0.686	-1.87838	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14625372	N/A	Missense	c.697A>G	p.T233A	58	5.41	7 (e)	Probably damaging	Neutral (RI=2)	0.443	N/A	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14627133	N/A	Missense	c.736G>A	p.V246I	29	5.83	7 (b)	Possibly damaging	Neutral (RI=5)	0.469	-1.65239	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14708965	rs150064102	Missense	c.1064A>G	p.Q355R	43	5.0	3 (e)	Possibly damaging	Neutral (RI=9)	0.295	-0.29526	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14748420	rs144022438	Missense	c.1172C>T	p.A391V	64	3.73	1 (e)	Benign	Neutral (RI=6)	0.489	-1.50148	Tolerated	12 heterozygous females out of 4060 2 males out of 2443
X:14748434	N/A	Missense	c.1186C>A	p.P396T	38	5.5	1 (e)	Benign	Neutral (RI=8)	0.350	-0.91321	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14748441	rs146448798	Missense	c.1193C>T	p.P398L	98	4.63	1 (e)	Possibly damaging	Neutral (RI=7)	0.385	-1.28414	Tolerated	3 heterozygous females out of 4060 not found in 2443 males
X:14748447	N/A	Missense	c.1199C>T	p.P400L	98	4.63	1 (e)	Possibly damaging	Neutral (RI=7)	0.423	-1.25566	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14748507	rs140931950	Missense	c.1259C>T	p.T420M	81	5.5	6 (e)	Probably damaging	Disease (RI=1)	0.392	-3.00602	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 not found in 2443 males
X:14748509	rs200619146	Missense	c.1261A>G	p.I421V	29	4.32	4 (b)	Benign	Neutral (RI=7)	0.566	-0.99275	Tolerated	1 heterozygous female out of 4060 1 male out of 2443

An extensive search for nonsense, frameshift, splice-site, and non-synonymous missense variants in *GLRA2* (NM_002063) was conducted using data from the Exome Variant Server (EVS) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, accessed November 2013) and from the literature. Our patient is the only male carrying a mutation predicted to be deleterious by PolyPhen-2, SNPs&GO, MutPred, PANTHER, and SIFT. In addition, the mutated residue is highly conserved (high GERP and Consurf scores) and is the only one predicted as functional ("P") by Consurf. Note that the three missense variants reported in male controls in EVS are predicted to be benign by the majority of the *in silico* prediction tools, whereas potentially damaging missense variants are only reported in females.

^a The Grantham score measures the degree of amino acid substitution⁶⁰; closely similar pairs have scores <60, strongly dissimilar pairs have scores >100.

^b GERP positive scores represent a substitution deficit and thus indicate that a site may be under evolutionary constraint⁶¹. Scores range from 6.18 to -12.36; scores >2 indicate likely truly constrained sites.

^c Consurf calculates the evolutionary conservation of amino acid positions⁶²; the conservation scores range from 1 to 9, with 9 corresponding to highly conserved residues; residue position/function scores: e = exposed residue, b = buried residue, f = functional residue (highly conserved and exposed), s = structural residue (highly conserved and buried).

^d PolyPhen-2 classifies the functional effect of missense variants into three categories: probably damaging, possibly damaging, and benign⁶³.

^e SNPs&GO classifies the effect of variants as neutral or disease-related; the reliability index (RI) of the prediction ranges from 0 (unreliable) to 10 (reliable)⁶⁴.

^f MutPred classifies amino acid substitution as disease-associated (p > 0.5) or neutral (p < 0.5)⁶⁵.

^g PANTHER estimates the likelihood of a particular nonsynonymous coding SNP to cause a functional impact on the protein⁶⁶. The substitution score (subPSEC) ranges from 0 to about -10; 0 implies a functionally neutral change whereas more negative scores predict more deleterious substitutions; a subPSEC < -3 has been suggested as a useful cutoff value.

^h SIFT predicts whether an amino acid substitution affects protein function based on sequence homology and the physical properties of amino acids and classifies variants into two categories, damaging or tolerated⁶⁷.

Extended Data Table 4 | Sequence variants identified in the *GLRA2* gene in 400 patients with ASD.

Nucleotide change	Variant type	Amino acid change	Location	Frequency in male patients (n=400)
c.203-24C>T	Intronic	-	Intron 2	T=1/C=399
c.271-75A>G	Intronic	-	Intron 3	G=188/A=212
c.271-43G>A	Intronic	-	Intron 3	A=1/G=399
c.285T>C	Silent	p.N95=	Exon 4	C=1/T=399
c.458G>A	Missense	p.R153Q	Exon 4	A=1/G=399
c.494+44A>G (rs2074211)	Intronic	-	Intron 4	G=221/A=179
c.501C>A	Silent	p.T167=	Exon 5	A=1/C=399
c.507C>T (rs111946619)	Silent	p.T169=	Exon 5	T=11/C=389
c.931-19_931-18insTCTC	Intronic	-	Intron 7	CTCTC=2/C=398
c.931-33_931-32insTG	Intronic	-	Intron 7	CTG=1/C=399
c.747C>T (rs2229963)	Silent	p.H249=	Exon 7	T=112/C=288
c.1089C>T (rs78179793)	Silent	p.D363=	Exon 9	T=2/C=398

The mutation in Patient 2 is indicated in bold.

Supplementary Information

SUPPLEMENTARY METHODS

Behavioural assays

Glr2 hemizygous (*Glr2*^{/Y}) males and wild-type (*Glr2*^{+Y}) littermates were housed in groups of three to four per cage (33 x 15 x 13 cm) with free access to food and water in a temperature- and humidity-controlled animal facility maintained on a 12 h light/dark cycle. Behavioural experiments were conducted in dedicated behavioural testing rooms during the standard light phase, usually between 9 AM and 6 PM. One week prior to testing, mice were handled daily for 5 min. Mice were moved from the animal facility to the testing room for at least 1 h prior to behavioural testing.

Spontaneous locomotion. Horizontal (locomotion) and vertical (rearing) activities were measured individually in Plexiglas cages (20 x 15 x 25 cm) with automatic monitoring of photocell beam breaks every 5 min for 2 h (Imetronic, Pessac, France). Mice were tested at 7 weeks of age and again at 19 weeks of age.

Open-field test. The test took place in a white open-field apparatus (110 x 110 x 35 cm) under a light intensity of ~30 lux. Animals were individually placed in the corner of the open-field and were allowed to explore for 10 min. A video tracking system, which included a computer-linked overhead video camera, was used to monitor locomotor activity. Distance travelled was measured every 2 min and total distance over the 10-min session was scored using an image analyser (ViewPoint, Lyon, France).

Accelerating rotarod. Mice were placed on a rotating rod (model LE8200, Bioseb, Chaville, France) that accelerated from 0 to 40 revolutions per minute over a 5-min period. Five trials were performed for each subject, with an inter-trial time of 30 min. The maximum duration of each trial was 5 min. The time to fall off the rod was recorded.

Inverted wire hang task. The task was performed by placing the mouse on the wire bars of a standard mouse cage lid, allowing the mouse to obtain its grip and then swiftly inverting the lid over a cage covered with foam to avoid injury. Latency to fall into the cage was measured over a 60 s maximum test session. Mice that fell in less than 10 s were given a second trial. A clean wire lid was used for each mouse.

Light-dark box. The apparatus consists of a polypropylene chamber (47 x 21.5 x 21.5 cm) unequally divided into two chambers by a partition containing a small opening. The large chamber is brightly illuminated (400 lux), while the small chamber is dark (<10 lux). Mice were placed into the dark side and allowed to move freely between the two chambers for 10 min. Latency to enter the light side, duration, and number of entries to light and dark compartments were determined by an observer. An entry was defined as the mouse placing all four paws into the zone. The apparatus was cleaned with 70% ethanol and water after each subject.

Elevated plus maze. The maze had a central platform, two closed arms with walls 17 cm in height, and two open arms; the arms were 30 cm long and 7 cm large and the maze was elevated 50.5 cm from the floor. Mice were placed on the centre section and allowed to freely explore the maze for 5 min under a light intensity of ~30 lux. Entries and time in each arm were recorded by an overhead video camera linked to a computer. An open or closed arm entry was defined as the mouse placing all four paws into an arm. The maze was cleaned with 70% ethanol and water between each animal.

Hole board. The test was performed as previously described¹ with modifications. The apparatus was made of blue Plexiglas (42 x 42 x 3 cm) with 16 equally spaced holes (2 cm in diameter) arranged in four rows (homemade). Mice were allowed to explore the hole board for 10 min. The behaviour was recorded by a computer-linked overhead video camera. The number of head-dips and the number of holes multiply visited over the 10-min session were scored by a trained observer.

Marble burying. Mice were individually assessed in a clean cage (36.5 x 20.5 x 14 cm) filled with 6 cm bedding material, overlaid with 12 black glass marbles (15 mm in diameter) equidistant in a 4 x 3 arrangement. Testing consisted of a 20 min exploration period, during which the number of marbles buried (>50% marble covered) was scored.

Grooming and stereotypies. Mice were individually assessed in a clean cage (36.5 x 20.5 x 14 cm) with bedding material, under a light intensity of ~30 lux. After 10 min of habituation, animals were video recorded for

10 min and later observed for self-grooming behaviour defined as paw licking, head wash, and body groom, and other spontaneous motor stereotypies such as jumping and bar-biting. No difference between genotypes was observed (data not shown).

Sociability and preference for social novelty. Sociability and preference for social novelty were assayed as previously described², except that the tests were conducted in a square open-field (42 x 42 x 25 cm) with two transparent plastic boxes (13 x 11 x 6.5 cm) with a total of 28 holes (10 mm diameter) in them, allowing visual, olfactory, auditory, and partial tactile contact. During habituation, the test mouse was placed in the empty open-field and allowed to explore for 5 min. Immediately after the habituation period, the subject was briefly confined in a corner of the open-field while the two boxes were placed on opposite corners of the apparatus, with an unfamiliar adult C57BL/6J male (stranger 1) that had no prior contact with the subject mouse in one of the two boxes. The location of the stranger mouse was systematically alternated. The test mouse was then released and allowed to explore during 10 min. Immediately afterwards, mice were tested in a second 10 min session to quantify social preference for a new stranger. A second, unfamiliar adult C57BL/6J male (stranger 2) was placed in the box that had been empty in the first 10 min session. The subject mouse had a choice between the first, already-investigated mouse (stranger 1), and the novel unfamiliar mouse (stranger 2). The behaviour was recorded during the entire test by a computer-linked overhead video camera and an experimenter scored the time spent exploring both boxes in each session. The apparatus was cleaned with 70% ethanol and water between subjects.

Olfactory habituation/dishabituation test. The test was conducted as previously described³. Non-social and social odours were presented on a series of cotton swabs inserted into a clean cage sequentially, in the following order: water, water, water (distilled water); almond, almond, almond (1:100 dilution artificial almond flavouring); vanilla, vanilla, vanilla (1:100 dilution artificial vanilla flavouring); social 1, social 1, social 1 (swiped from the bottom of a cage housing unfamiliar male C57BL/6J mice); and social 2, social 2, social 2 (swiped from the bottom of a second cage housing unfamiliar male 129/SvJ mice). Each test session was conducted in a clean cage containing fresh litter. Each swab was presented for a 2 min period, immediately following the last swab presentation. Time spent sniffing the swab was recorded by an investigator. Sniffing was scored when the nose was within 2 cm of the cotton swab.

Social interaction with juveniles. Adult mice were individually tested in clean cages with fresh litter and paired with an unfamiliar C57BL/6J male juvenile (10-11 weeks old). The test session lasted 10 min. Social behaviour was monitored with a computer-linked overhead video camera and videos were subsequently scored by a trained investigator using Labwatcher (Viewpoint) on measures of nose-to-nose and nose-to-anogenital sniffing.

Nest formation. The test was conducted as previously described⁴. Nesting material (pressed cotton) was placed in the home cage of grouped mice for two days before the experiment to avoid neophobia. On the day of the test, approximately 1 h before the dark phase, mice were transferred to individual testing cages with fresh litter and 2-3 g of pressed cotton in each cage, with food and water available *ad lib*. The nests were assessed the next morning on a rating scale of 1-5, as follows: (1) nesting material not noticeably touched, (2) nesting material partially torn, (3) nesting material mostly shredded but often no identifiable nest site, (4) an identifiable but flat nest, and (5) a (near) perfect nest.

Novel object and novel location recognition tasks. The tasks were performed in a round open-field (40 cm in diameter) containing litter that had been exposed to other mice before testing to provide a constant odour level in the open-field under a light intensity of ~30 lux. Stimuli consisted of coloured animal figurines (4 x 4 x 5 cm) made of resin.

Habituation. Before the experimental sessions, animals were habituated during four days to the apparatus to reduce stress due to the novel environment. On day 1, mice were introduced in the open-field together with their cage mates for 30 min. On days 2, 3, and 4, mice experienced the open-field individually for two 10 min trials with an inter-trial time of 5 h. On day 4, a couple of identical objects that were not used later during the test were placed in the open-field in order to reduce stress due to the appearance of novel objects in the arena.

Novel object recognition task. The test consisted of a familiarization phase followed by a recognition test with a memory delay interval of either 10 min (short-term memory test) or 24 h (long-term memory test). During the

familiarization phase, each mouse received three consecutive 5-min exposures to the open-field containing a pair of identical objects, with an inter-trial time of 5 min. The mouse was placed in a temporary holding cage between trials and objects were cleaned after each trial. The recognition test was run either 10 min or 24 h after the familiarization phase ended. One clean familiar object and one clean novel object were placed in the arena, where the two identical objects had been located during the familiarization phase, and each mouse was returned to the open-field for a 5-min recognition test. The familiarization phase and the recognition test were videotaped and subsequently scored by a trained investigator. Object exploration was defined as any investigative behaviour (sniffing or deliberate contact) within 2 cm of the objects. Memory was operationally defined by the discrimination index (DI) for the novel object, calculated as the time spent exploring the novel object divided by the total time spent exploring both objects [Discrimination Index = (novel object exploration time/total exploration time)×100]. The time spent sniffing two identical objects during the familiarization phase confirmed the lack of a side bias.

Novel location recognition task. This task assesses the ability of mice to recognize a novel spatial arrangement of familiar objects. Procedures were as described in the novel object recognition task, except that identical copies of objects were used in the recognition phase, with one of them moved to a new location in the open-field. Mice were allowed to explore two familiar objects, with one in a new location.

Morris water maze. Procedures were performed as previously described^{5,6}, with minor modifications.

Apparatus. The water maze consists of a circular stainless steel pool (150 cm in diameter, 30 cm in height) filled to a depth of 16 cm with water maintained at 20–22°C and made opaque using a white aqueous emulsion (Acusol OP 301 opacifier, Rohm Ihaas, Paris, France). The escape platform was made of rough stainless steel and measured 9 cm in diameter. A video tracking system, which included a computer-linked overhead video camera and an image analyzer (ViewPoint), was used to monitor activity.

Non-spatial learning (cued version). Initial training consisted of cued navigation to a visible platform during four consecutive days with four trials per day and an inter-trial time of 10 min. The extra-maze cues were hidden with a curtain placed around the water maze during the trials, and the platform location was varied randomly from trial to trial. Mice were placed in one of four starting locations facing the pool wall and allowed to swim until they found the platform. The time taken to reach the platform (latency) was recorded. If the mouse located the platform within 90 s, the mouse was allowed to remain on it for 30 s before being removed to the home cage. Mice that failed to find the platform within 90 s were manually guided to the platform and allowed to remain on it for 30 s.

Spatial learning. In the hidden-platform task, the platform was submerged 1 cm below the surface of the water and mice had to navigate using extra-maze cues that were placed on the walls of the testing room to find the platform. The location of the platform was fixed over a series of four trials per day during five consecutive days, with an inter-trial time of 10 min. Mice were placed into the pool at one of the four starting locations and allowed to swim until they found the platform, or for a maximum of 90 s. Mice that failed to find the platform within 90 s were guided to it. The animal then remained on the platform for 30 s before being removed from the pool. The time taken to reach the platform was recorded. Two probe trials were conducted, 10 min and 24 h after the last trial on day 5, to assess short-term and long-term memory. In the probe tests, the platform was removed and mice were allowed to swim for 60 s. Latency to reach the supposed platform location, percent time spent in the quadrant, and platform crossing were recorded.

Spatial reversal learning. To investigate the flexibility of cognitive processes in *Glr2*^{-Y} mice, the spatial reversal water maze test was performed. After the last probe trial in the spatial learning test, the escape platform was moved from the original position to the opposite quadrant. Four trials per day were performed during two consecutive days followed by two probe tests without the platform, 10 min and 24 h after the last trial.

SUPPLEMENTARY NOTE

Clinical Description

Patient 1: 142 kb deletion of *GLRA2*, maternal

Patient 1, an 11 year 4 month old male, is the only child of healthy non-consanguineous parents of European origin, with negative family history of psychiatric or cognitive disorders. He was born at 38 weeks of gestation after an uneventful pregnancy and delivery. Birth weight was 3,200 g. He walked at 12 months; speech

development was delayed, with first words at 24 months and first phrases at 60 months. He had recurrent otitis media, requiring placement of pressure equalization tubes at 36 months. There was no history of epilepsy.

Manifestations of autism were initially noted at the age of 2 years. When evaluated at 10 years 9 months, he had functional language and he met criteria for autism according to the ADI-R (social: 21, communication verbal: 16, repetitive behaviours: 7, abnormality before age 36 months: 2). Cognitive evaluation with the Wechsler Intelligence Scale for Children-Third Edition (WISC-III) showed a verbal IQ of 93, a performance IQ of 75, and a full-scale IQ of 82. The Kaufman Assessment Battery for Children results were: sequential processing scale 122, simultaneous processing scale 114, mental processing composite 120, and nonverbal scale 113.

On physical examination at the age of 11 years 4 months, his weight was 28 kg (-1.3 SD), height 144 cm (+0.3 SD), and head circumference 55 cm (+0.7 SD). The physical exam was normal, with no dysmorphic features; his neurological exam was normal except for difficulties with motor coordination and clumsy gestures. He had bilateral myopia.

Clinical work-up included normal karyotype, negative *FMR1* trinucleotide expansion, and normal metabolic screening (plasma and urine amino acid chromatography, blood lactate, pyruvate, ketone bodies, uric acid, ammonia, serum transferrin glycosylation, very long chain fatty acids, and urine organic acid chromatography). He also had normal results for multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) testing for subtelomeric rearrangements, imbalances and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region, and selected microdeletion/microduplication syndromes. CNV analysis with the Illumina Infinium 1M single SNP microarray in the child and his parents⁷ revealed the maternally-inherited *GLRA2* deletion; no other clinically-relevant CNVs were detected.

The mother of Patient 1, who also carried the *GLRA2* deletion, had a normal, non-skewed X chromosome inactivation ratio (58:42).

Patient 2: *GLRA2* missense mutation (p.R153Q), de novo

Patient 2 is a male born preterm at 8 months to non-consanguineous European parents. Both parents were healthy. There was a family history of autism in a sister (see below) and two cousins (second and third degree), descendants of male relatives of the mother. Birth weight was 2,300 g. He presented poor sucking in the newborn period, sat up at 12 months and walked at 18 months. Autism features and hyperactivity were noted at the age of 1 year. He had severe language delay, with first words at 4 years and first phrases at 5 years of age. As an adult he talks a great deal about subjects that interest him without real communication. Generalized tonic-clonic seizures started at 18 years, he is treated with antiepileptic drugs and has about one seizure per year, except for a seizure-free period of several years in his thirties.

He met criteria for autism according to the ADI-R (social: 18, communication verbal: 25, repetitive behaviours: 7, abnormality before age 36 months: 5). Cognitive evaluation with the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) at the age of 43 years revealed mild ID: verbal IQ 63, performance IQ 67, full scale IQ 63. When last evaluated at the age of 45 years, he had no dysmorphic features, his head circumference was 54 cm (-1.5 SD) and the physical exam was normal. He lives by himself in a sheltered home environment and cares for all of his personal needs.

He had normal results for G-banding chromosome analysis at 550-850 band resolution, *FMR1* trinucleotide expansion, metabolic investigations, FISH testing for subtelomeric rearrangements and MLPA testing for imbalances and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region, and selected microdeletion/microduplication syndromes. No clinically-relevant CNVs were detected with the Illumina Infinium 1M single SNP microarray⁷. Magnetic resonance imaging of the brain was normal.

One of the patient's older sisters has a diagnosis of autism and mild ID. She is more severely affected than her brother; she spoke her first words at 14 months but at 16 months underwent a developmental regression and lost all language until the age of 9 years, when she started to speak in full sentences. Due to behavioural problems she was placed in an institution for the mentally handicapped, where she rapidly regressed and her language deteriorated; after a psychotic episode she spent several years in a psychiatric hospital. She has no history of seizures. The etiological screening performed thus far (like in her brother) has been negative. She does not carry the *GLRA2* mutation (p.R153Q) identified in her brother.

Supplementary Table 1 | Statistical analyses.

Zebrafish experiments					
Experiment	# of embryos	Parameter	Statistical test	Significance	Figure
Morphants	8–15 (3 experiments)	Number of branches	Student's t-test	Control vs MO ^{az2} : p=0.00019	—
Rescue WT	8–15 (4 experiments)	Number of branches	Student's t-test	Control vs MO ^{az2} : p=0.0027 MO ^{az2} vs (MO ^{az2} + mRNA ^{az2}): p= 0.014 Control vs (MO ^{az2} + mRNA ^{az2}): p= 0.91	Fig. 3
Rescue mutation (R153Q)	8–15 (4 experiments)	Number of branches	Student's t-test	Control vs MO ^{az2} : p= 0.0009 MO ^{az2} vs (MO ^{az2} + mRNA ^{az2R153Q}): p=1.00 Control vs (MO ^{az2} + mRNA ^{az2R153Q}): p=0.0006	
Rescue deletion	8 (4 experiments)	Number of branches	Student's t-test	Control vs MO ^{az2} : p= 0.000046 MO ^{az2} vs (MO ^{az2} + mRNA ^{az2del}): p=0.47 Control vs (MO ^{az2} + mRNA ^{az2del}): p=0.014	
Behavioural experiments					
Test	# of mice	Parameter	Statistical test	Significance	Figure
Spontaneous locomotion	WT = 13 KO = 15	Total locomotor activity (horizontal plus vertical) (photobeam breaks)	Two-way ANOVA	Genotype, F _(1,26) =0.45, p=0.51 Time, F _(23,598) =58.77, p<0.0001 Genotype x Time, F _(23,598) =0.82, p=0.71	Extended Data Fig. 5a
		Horizontal activity (photobeam breaks)	Two-way ANOVA	Genotype, F _(1,26) =0.29, p=0.59 Time, F _(23,598) =52.95, p<0.0001 Genotype x Time, F _(23,598) =1.23, p=0.22	—
		Vertical activity (photobeam breaks)	Two-way ANOVA	Genotype, F _(1,26) =0.50, p=0.49 Time, F _(23,598) =49.12, p<0.0001 Genotype x Time, F _(23,598) =0.53, p=0.96	—
Open field	WT = 16 KO = 15	Distance (m)	Two-way ANOVA	Genotype, F _(1,29) =0.17, p=0.69 Time, F _(4,116) =2.24, p=0.07 Genotype x Time, F _(4,116) =0.66, p=0.62	Extended Data Fig. 5b
		Total distance (m)	Student's t-test	p=0.69	—
Rotarod	WT = 11 KO = 8	Latency to fall (s)	Two-way ANOVA	Genotype, F _(1,17) =2.27, p=0.15 Trial, F _(4,68) =10.79, p<0.0001 Genotype x Trial, F _(4,68) =1.39, p=0.25	Extended Data Fig. 5c
Wire hang	WT = 16 KO = 15	Latency to fall (s)	Student's t-test	p=0.46	Extended Data Fig. 5d
Light-dark box	WT = 16 KO = 15	Number of transitions	Student's t-test	p=0.44	—
		Time in dark box (s)	Student's t-test	p=0.86	Extended Data Fig. 5e
		Latency to light box (s)	Student's t-test	p=0.68	—
Elevated plus maze	WT = 11 KO = 12	Time in open arms (s)	Student's t-test	p=0.26	Extended Data Fig. 5f
		Entries to open arms	Student's t-test	p=0.48	
Holeboard	WT = 9 KO = 8	Nose poke counts	Student's t-test	p=0.52	Extended Data Fig. 5g
		Holes multiply visited	Student's t-test	p=0.97	
Marble burying	WT = 16 KO = 15	Hidden marbles	Two-way ANOVA	Genotype, F _(1,29) =3.77, p=0.06 Time, F _(14,406) =136.53, p<0.0001 Genotype x Time, F _(14,406) =2.06, p=0.01	Extended Data Fig. 5h
Sociability and preference for social novelty	WT = 36 KO = 38 (4 pooled cohorts)	Time exploring (s) Sociability	Student's t-test	WT (empty vs stranger 1): p<0.0001 KO (empty vs stranger 1): p=0.002	Extended Data Fig. 6a
		Time exploring (s) Social novelty	Student's t-test	WT (stranger 2 vs stranger 1): p=0.03 KO (stranger 2 vs stranger 1): p=0.02	
Olfactory habituation/dishabituation	WT = 16 KO = 15	Time spent sniffing (s)	Two-way ANOVA	Genotype, F _(1,29) =0.48, p=0.50 Trial, F _(14,406) =25.50, p<0.0001 Genotype x Trial, F _(14,406) =0.86, p=0.60	Extended Data Fig. 6b

Test	# of mice	Parameter	Statistical test	Significance	Figure
Social interaction with a juvenile	WT = 8 KO = 7	Time sniffing nose-to-nose (s)	Student's t-test	p=0.52	Extended Data Fig. 6c
		Time sniffing nose-to-anogenital (s)	Student's t-test	p=0.35	
		Total time sniffing (s)	Student's t-test	p=0.32	
Nest formation	WT = 8 KO = 8	Nest score	Student's t-test	p=0.66	Extended Data Fig. 6d
Novel object recognition	WT = 11 KO = 12	Exploration time (s) Probe test 10 min	Student's t-test	WT (novel vs familiar): p=0.002 KO (novel vs familiar): p=0.09	Fig. 4a
		Discrimination index Probe test 10 min	Student's t-test	p=0.0097	
	WT = 16 KO = 15	Exploration time (s) Probe test 24 h	Student's t-test	WT (novel vs familiar): p=0.022 KO (novel vs familiar): p=0.167	
		Discrimination index Probe test 24 h	Student's t-test	p=0.0195	
Novel location recognition	WT = 9 KO = 10	Exploration time (s) Probe test 10 min	Student's t-test	WT (novel vs familiar): p=0.012 KO (novel vs familiar): p=0.009	Fig. 4b
		Discrimination index Probe test 10 min	Student's t-test	p=0.46	
Morris water maze Cued version	WT = 5 KO = 7	Latency (s)	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,10)}=0.22$, p=0.65 Trial, $F_{(15,150)}=26.67$, p<0.0001 Genotype x Trial, $F_{(15,150)}=0.60$, p=0.87	—
		Escape latency (s) Training	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,10)}=0.42$, p=0.53 Day, $F_{(4,40)}=10.63$, p<0.0001 Genotype x Day, $F_{(4,40)}=0.01$, p=0.10	Extended Data Fig. 6e
Morris water maze Spatial learning	WT = 5 KO = 7	Time in quadrant (s) Probe test 10 min	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,10)}=0.63$, p=0.45 Quadrant, $F_{(3,30)}=38.47$, p<0.0001 Genotype x Quadrant, $F_{(3,30)}=0.22$, p=0.88	Fig. 4c
			One-way ANOVA, Tukey's post hoc	WT: $F_{(3,16)}=53.72$, p<0.0001 Tukey: Target vs AdjL, p<0.001 Target vs Opp, p<0.001 Target vs AdjR, p<0.001 KO: $F_{(3,24)}=23.54$, p<0.0001 Tukey: Target vs AdjL, p<0.001 Target vs Opp, p<0.001 Target vs AdjR, p<0.001	
		Platform crossing Probe test 10 min	Student's t-test	p=0.25	Extended Data Fig. 6e
		Latency (s) Probe test 10 min	Student's t-test	p=0.21	—
		Time in quadrant (s) Probe test 24 h	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,10)}=0.017$, p=0.90 Quadrant, $F_{(3,30)}=43.25$, p<0.0001 Genotype x Quadrant, $F_{(3,30)}=1.27$, p=0.30	Extended Data Fig. 6e
			One-way ANOVA, Tukey's post hoc	WT: $F_{(3,16)}=23.32$, p<0.0001 Tukey: Target vs AdjL, p<0.001 Target vs Opp, p<0.001 Target vs AdjR, p<0.001 KO: $F_{(3,24)}=40.01$, p<0.0001 Tukey: Target vs AdjL, p<0.001 Target vs Opp, p<0.001 Target vs AdjR, p<0.001	
		Platform crossing Probe test 24 h	Student's t-test	p=0.29	Extended Data Fig. 6e
Latency (s) Probe test 24 h	Student's t-test	p=0.26	—		

Test	# of mice	Parameter	Statistical test	Significance	Figure
Morris water maze Spatial reversal learning	WT = 5 KO = 7	Escape latency (s) Training	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,10)}=0.76$, $p=0.40$ Trial, $F_{(7,70)}=4.52$, $p=0.0003$ Genotype x Trial, $F_{(7,70)}=0.95$, $p=0.47$	—
		Time in quadrant (s) Probe test 10 min	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,10)}=0.026$, $p=0.88$ Quadrant, $F_{(3,30)}=10.00$, $p<0.0001$ Genotype x Quadrant, $F_{(3,30)}=0.49$, $p=0.69$	Fig. 4c
			One-way ANOVA, Tukey's post hoc	WT: $F_{(3,16)}=7.44$, $p=0.0024$ Tukey: Target vs AdjL, $p<0.01$ Target vs Opp, $p<0.01$ Target vs AdjR, $p<0.05$ KO: $F_{(3,24)}=7.62$, $p=0.001$ Tukey: Target vs AdjL, $p<0.05$ Target vs Opp, $p<0.01$ Target vs AdjR, $p<0.001$	
		Platform crossing Probe test 10 min	Student's t-test	$p=0.60$	Extended Data Fig. 6e
		Latency (s) Probe test 10 min	Student's t-test	$p=0.91$	—
		Time in quadrant (s) Probe test 24 h	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,10)}=0.14$, $p=0.71$ Quadrant, $F_{(3,30)}=13.14$, $p<0.0001$ Genotype x Quadrant, $F_{(3,30)}=0.27$, $p=0.85$	Extended Data Fig. 6e
			One-way ANOVA, Tukey's post hoc	WT: $F_{(3,16)}=7.39$, $p=0.0025$ Tukey: Target vs AdjL, $p<0.05$ Target vs Opp, $p<0.01$ Target vs AdjR, $p<0.01$ KO: $F_{(3,24)}=11.53$, $p<0.0001$ Tukey: Target vs AdjL, $p<0.001$ Target vs Opp, $p<0.001$ Target vs AdjR, $p<0.001$	
		Platform crossing Probe test 24 h	Student's t-test	$p=0.09$	Extended Data Fig. 6e
		Latency (s) Probe test 24 h	Student's t-test	$p=0.10$	—
		Ex vivo electrophysiology			
Experiment	# of slices	Parameter	Statistical test	Significance	Figure
Long-term potentiation	WT = 14 KO = 10	Field excitatory postsynaptic potentials (% baseline)	Two-way ANOVA	Genotype, $F_{(1,22)}=5.488$, $p=0.0286$ Time, $F_{(99,2178)}=205.00$, $p<0.0001$ Genotype x Time, $F_{(99,2178)}=1.281$, $p=0.03$	Fig. 4d

Supplementary Table 2 | Primers used for *GLRA2* sequencing

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
Exon1-F	TCGGGATATTTCCACAAGC	188
Exon1-R	TCCAGAGCACAGATAAATACACAA	
Exon2-F	GCGTTAGCTCTCAAGGGATG	237
Exon2-R	GAAGATTTCTCAAAGGCTTAACG	
Exon3-F	TCTAGCCAATTGCACAGATGTT	555
Exon3-R	CAGAAAACCATTAACATCAAATG	
Exon4-F	TTCTCCCTTTGTCCCCTCT	517
Exon4-R	AAACAAGAAACCACAAAAGTCAAA	
Exon5-F	GCCCTGAGTTGGAGCTTAGA	350
Exon5-R	CATTAGGATGTTGGGGGTTG	
Exon6-F	TGACTGAGCGTATGTCTGCTTT	357
Exon6-R	GCCTGGTAAATATGCAGCAA	
Exon7-F	TGGTTCAGTTGGAGAAGAGTTG	523
Exon7-R	CAGCTTCTGTCTCTTATTGC	
Exon8-F	GGTATTTTGCTGCTCACACC	360
Exon8-R	GGCTTCTTGCTTATTGTGTGC	
Exon9-F	TCTGTCCATGAATAATTGAGTTG	555
Exon9-R	CCCTCCCTCAATCTTCTCT	

Supplementary Table 3 | Primers used for real-time reverse transcription PCR of *Glr2* in the mouse cortex

Primer	Sequence (5'-3')	UPL probe number
Glr2-85F	TTAGGGACAAACCACTTCAGG	#85
Glr2-85R	GGTCTGCGAGGGATGTTTT	
Glr2-53F	GACTACACAGAGTTCAGGTTCCAG	#53
Glr2-53R	TCCAGATGTCAATTGCTTTCA	
Control primers		
Gusb-31F	GAGGATCAACAGTGCCCAT	#31
Gusb-31R	AGCCTCAAAGGGGAGGTG	

Supplementary references

- 1 Kamei, J. et al., Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test. *Eur J Pharmacol* **489**, 77-87 (2004).
- 2 Moy, S. S. et al., Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* **3**, 287-302 (2004).
- 3 Silverman, J. L. et al., Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. *Brain Res* **1380**, 120-137 (2011).
- 4 Deacon, R. M., Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* **1**, 1117-1119 (2006).
- 5 Altafaj, X. et al., Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 1915-1923 (2001).
- 6 Chan, C. S. et al., Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* **23**, 7107-7116 (2003).
- 7 Pinto, D. et al., Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**, 368-372 (2010).

L'identification de gènes et loci impliqués dans les TSA s'est faite par des approches multiples et complémentaires, basées sur la recherche de variants rares, qui ont démontré l'extrême hétérogénéité génétique à la base de la pathologie. Les causes connues de TSA permettent à ce jour d'expliquer l'apparition des troubles chez ~25 % des cas ; cependant chaque cause n'explique à elle seule qu'une faible proportion de patients. Les variants *de novo* jouent un rôle considérable dans l'étiologie. Les gènes et loci impliqués sont très nombreux et l'on observe aussi bien des formes autosomiques (dominantes ou récessives) que des mutations dans des gènes liés au chromosome X (maternellement transmises à des garçons ou dominantes exprimées chez les filles). Les fonctions des gènes mis en cause sont extrêmement diverses, on trouve des gènes codant des protéines synaptiques telles que des molécules d'adhésion cellulaire ou des canaux ioniques, des régulateurs épigénétiques ou des acteurs de voies de signalisation cellulaire comme les voies mTOR et RAS/MAPK.

L'utilisation des puces à ADN a provoqué une avancée remarquable dans nos connaissances des causes génétiques des TSA, en démontrant un rôle significatif des CNV rares. De nombreux CNV *de novo* et/ou hérités, souvent associés à une expressivité variable et/ou une pénétrance faible, ont ainsi été identifiés. L'analyse de ces remaniements constitue une source importante de gènes candidats et a permis d'impliquer de nombreux gènes et loci pour la première fois dans l'autisme.

1. Analyse des CNV rares

Quelle approche génétique utiliser ?

Le succès d'une approche génétique donnée dépend directement de l'architecture génétique de la pathologie investiguée, c'est-à-dire du nombre de gènes et loci impliqués, ainsi que de la fréquence de leurs allèles à risque. Pour les troubles neurodéveloppementaux comme l'autisme, le débat autour de la nature même de l'architecture génétique s'est focalisé pendant longtemps autour de deux modèles : le modèle de « maladie commune, variants communs » et celui de « maladie commune, variants rares ». Les approches ayant été utilisées pour tester ces hypothèses sont les études de liaison et d'association d'une part et les études de remaniements chromosomiques, de CNV et de mutations rares à effet fort d'autre part. Nous nous focaliserons dans cette discussion sur l'analyse de CNV. Dans le cas de l'autisme, si l'on considère ce qui était connu avant l'utilisation des puces ainsi que les données obtenues depuis l'utilisation de cette technique, l'étiologie sous-jacente correspond à un modèle de « maladie commune, variants rares ».

Quels CNV contribuent aux TSA ?

L'utilisation des connaissances obtenues dans le domaine de la génétique de la **déficience intellectuelle** a grandement facilité l'identification de CNV pathogènes dans les TSA, révélant un chevauchement étiologique jusqu'alors insoupçonné par la plupart des chercheurs du domaine de l'autisme. Des bases de données publiques telles qu'ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium*) (Kaminsky et coll., 2011) et DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) (Firth et coll., 2009) regroupent les CNV de milliers de patients avec déficience intellectuelle étudiés dans des laboratoires cliniques. En comparaison, la taille des cohortes de patients avec TSA n'est pas assez élevée pour atteindre la significativité statistique dans la plupart des cas de CNV rares, soit parce qu'ils sont très rares chez les cas, soit parce qu'ils sont parfois trouvés chez des témoins. Une approche intéressante consiste donc à procéder à l'analyse des CNV en deux temps : (i) en recherchant d'abord des CNV cliniquement pertinents dans des cohortes de grande taille de laboratoires cliniques, constituées de patients avec des troubles neurodéveloppementaux variés (incluant des cas de TSA) ; (ii) après quoi ces CNV sont recherchés dans des cohortes plus petites de patients présentant des TSA et correctement caractérisés phénotypiquement (Moreno-De-Luca et coll., 2013). De manière similaire, il y a un fort chevauchement entre l'étiologie de

l'épilepsie et celle des TSA, c'est pourquoi les informations obtenues à partir des analyses génétiques dans des cohortes de patients épileptiques sont informatives pour l'analyse des CNV dans les TSA.

Les études de CNV dans la population générale ont montré la richesse non suspectée du génome humain en polymorphismes structuraux. La plupart des CNV identifiés chez les cas sont fréquents et n'ont apparemment pas de rôle dans la pathologie, c'est pourquoi leur analyse est intrinsèquement compliquée. Ainsi, les CNV rares ont recueilli le plus d'attention. Pour les identifier, la comparaison des CNV identifiés chez les cas avec ceux trouvés chez des témoins est un point clef de l'analyse. Pour trier les CNV identifiés chez les patients et sélectionner les remaniements rares, des bases de données publiques sont disponibles, qui regroupent les résultats de CNV identifiés chez des milliers d'individus apparemment sains. C'est le cas de la base de données des variants génomiques DGV (*Database of Genomic Variants*, <https://projects.tcag.ca/variation/>), qui contient environ 4 millions de variants à partir de 37 études publiées. Théoriquement, pour identifier les remaniements intéressants chez un patient, il serait donc possible de comparer tous les CNV identifiés chez celui-ci avec les CNV référencés dans les bases de données, pour pouvoir exclure de l'analyse les CNV fréquemment trouvés chez des individus normaux et ne considérer que les CNV restants. Cependant, les informations de ces bases de données sont fonction de nombreux facteurs comme les différentes micropuces et les algorithmes utilisés, les contrôles de qualité effectués et les taux de faux positifs obtenus (Lee et coll., 2007 ; de Leeuw et coll., 2012). En effet, dans la plupart des études réalisées chez des témoins, seule une fraction minime des CNV référencés a été validée par des techniques indépendantes.

La **qualité des données** disponibles dans ces bases dépend directement des puces utilisées pour identifier les remaniements. Certaines puces aCGH utilisant des BACs ont une faible résolution. Celles-ci ont tendance à surestimer la taille des CNV, puisque dans une situation où un remaniement chevauche 50 % d'une sonde, la région entière correspondant au BAC est considérée comme touchée par le CNV. Les puces à oligonucléotides à haute densité apportent des définitions plus précises de la taille et de la localisation des CNV, mais les taux de faux positifs peuvent être plus élevés, en particulier pour les CNV de petite taille. Il est donc très probable qu'une proportion non négligeable d'informations des bases de données soit erronée, rendant ces outils incomplets et imprécis et mettant en garde contre une interprétation fonctionnelle des CNV s'appuyant uniquement sur eux. Avec l'augmentation constante de données référencées dans les bases publiques, une inspection rigoureuse et standardisée de ces informations est à présent nécessaire ; la validation par des techniques indépendantes étant la manière la plus sûre de confirmer un CNV.

Idéalement, les CNV devraient toujours être détectés et analysés de la même manière dans des cohortes de témoins et de patients de très grande taille pour pouvoir faire des comparaisons, ce qui implique d'utiliser le même type de puces (même résolution), les mêmes contrôles de qualité et les mêmes algorithmes pour l'analyse. La **Figure 34** illustre l'approche utilisée par l'*Autism Genome Project* (AGP) pour identifier des CNV rares chez 1 275 sujets atteints de TSA, leurs parents et 1 981 témoins, génotypés avec la même plateforme.

Comprendre les corrélations génotype-phénotype

Il est clair qu'il y a un manque d'informations à ce jour permettant une compréhension plus approfondie des relations génotype-phénotype dans les TSA pour de nombreux CNV identifiés, particulièrement ceux à pénétrance incomplète et expressivité variable. Le problème est dû en partie à la rareté des remaniements eux-mêmes, pouvant être partiellement résolu par l'analyse d'un plus grand nombre de patients. Le deuxième point important correspond aux informations cliniques détaillées des patients et des témoins. L'hétérogénéité clinique et génétique des TSA nécessite de constituer des cohortes toujours plus grandes et d'obtenir une caractérisation approfondie des individus porteurs d'anomalies ayant une pertinence clinique potentielle. L'identification de plusieurs familles indépendantes dans lesquelles le remaniement ségrége avec le phénotype est un bon indicateur de la pathogénicité d'un CNV rare à effet fort. Dans le cas des CNV rares à pénétrance incomplète et/ou expressivité variable, une évaluation précise de leur prévalence dans des cohortes de très

grande taille de cas et de témoins est nécessaire pour déterminer si le variant en question apparaît à une fréquence significativement plus élevée chez les individus atteints. L'analyse de grandes cohortes de patients caractérisés phénotypiquement et de leur famille, ainsi que de milliers d'individus témoins dont le phénotype est connu, est indispensable. L'identification des CNV rares nécessite donc des efforts collaboratifs, comme dans le cas du consortium international *Autism Genome Project* (AGP), pour accroître la puissance des études en augmentant le nombre d'individus étudiés et faciliter la compréhension des corrélations génotype-phénotype.

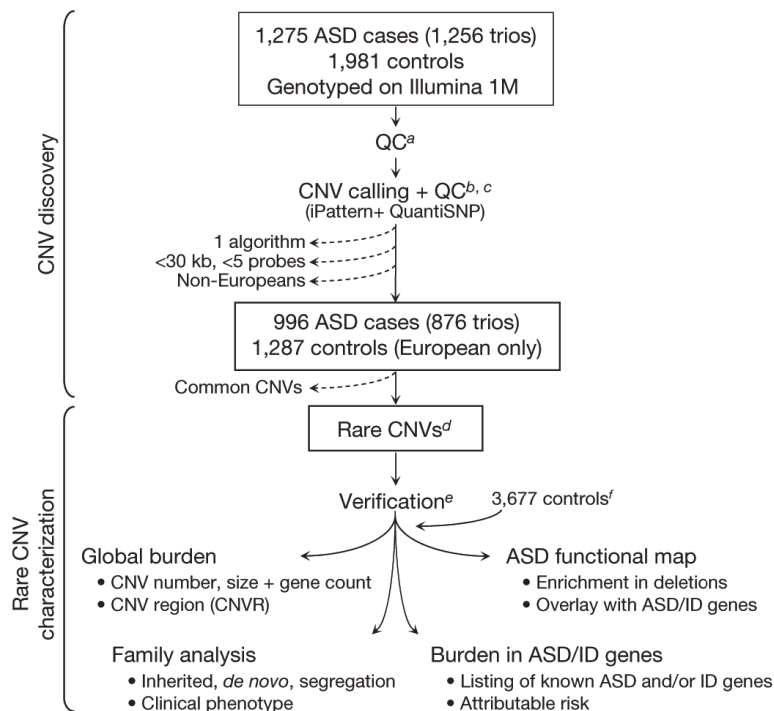


Figure 34. Identification et caractérisation des CNV.

Etapes employées par l'*Autism Genome Project* pour l'identification des CNV rares. Les lignes pointillées indiquent les CNV exclus des analyses. *a*, Contrôles de qualité des SNP. *b, c*, Contrôles de qualité des CNV. *d*, CNV rares ayant une taille ≥ 30 kb et présents dans l'échantillon de cas et témoins à une fréquence $< 1\%$. *e*, Vérification informatique de tous les CNV et validation par des méthodes indépendantes pour au moins 40 % des CNV identifiés chez les cas. *f*, 3 677 témoins additionnels pour tester des loci identifiés à partir des premières analyses. ID, *intellectual disability* (déficience intellectuelle), QC, *quality control* (contrôle de qualité) (figure tirée de Pinto et coll., 2010).

Comprendre les conséquences fonctionnelles des CNV nécessite d'abord d'obtenir des informations précises sur leur **taille**. Malgré l'utilisation des puces à haute résolution, la délimitation des points de cassure et de l'architecture précise des remaniements peut être compliquée par la richesse en séquences répétées des régions où surviennent les CNV récurrents ; certains variants structuraux peuvent même apparaître suite à des altérations complexes impliquant plusieurs points de cassure, ce qui complique grandement leur cartographie.

Il faut ensuite identifier le(s) **gène(s) et/ou élément(s) régulateur(s) responsables du phénotype** observé. Cette tâche s'avère difficile lorsque les remaniements sont de grande taille et touchent de nombreux gènes. Dans le cas de syndromes génétiques causés par des remaniements récurrents, l'identification des gènes responsables du phénotype à partir de patients ayant des manifestations phénotypiques similaires mais des CNV de taille atypique, partiellement chevauchants, permet de délimiter une région minimale critique. De plus, certains CNV peuvent avoir des effets à distance, c'est-à-dire qu'ils peuvent affecter des éléments fonctionnels situés en dehors de l'intervalle génomique où ils se produisent.

Les difficultés d'interprétation des CNV sont aussi dues à une connaissance incomplète des **gènes haploinsuffisants** (pour qui la dose de protéine divisée par deux est nuisible) et des **gènes sensibles au dosage**

(pour qui l'augmentation et la diminution de la quantité de protéine est préjudiciable), qui peuvent pourtant moduler l'effet d'un CNV. Des algorithmes permettant de prédire la probabilité d'haploinsuffisance d'un gène donné peuvent aider à établir des priorités parmi les gènes touchés par un remaniement afin d'identifier ceux exerçant un rôle délétère (Huang et coll., 2010).

Pour expliquer la pénétrance incomplète et l'expressivité variable associée à certains CNV, on peut imaginer que des mécanismes **de modulation de l'expression des gènes** — causés par une/des mutation(s) additionnelle(s) dans d'autres gènes ou éléments régulateurs, ou encore liés à des modifications de l'épigénome — pourraient être impliqués (Weischenfeldt et coll., 2013). En réajustant l'expression des gènes touchés par le CNV, ou en masquant les effets délétères via des interactions génétiques (**Figure 35**), l'impact d'un remaniement pourrait être modulé. Cette hypothèse expliquerait donc l'observation de phénotypes variables chez certains patients portant le même CNV. Il faudra déterminer par des analyses fonctionnelles, des analyses du transcriptome et des réseaux protéiques, dans quelle mesure ces mécanismes influencent l'impact des CNV, ainsi que leur niveau d'implication dans les phénomènes de pénétrance incomplète et expressivité variable.

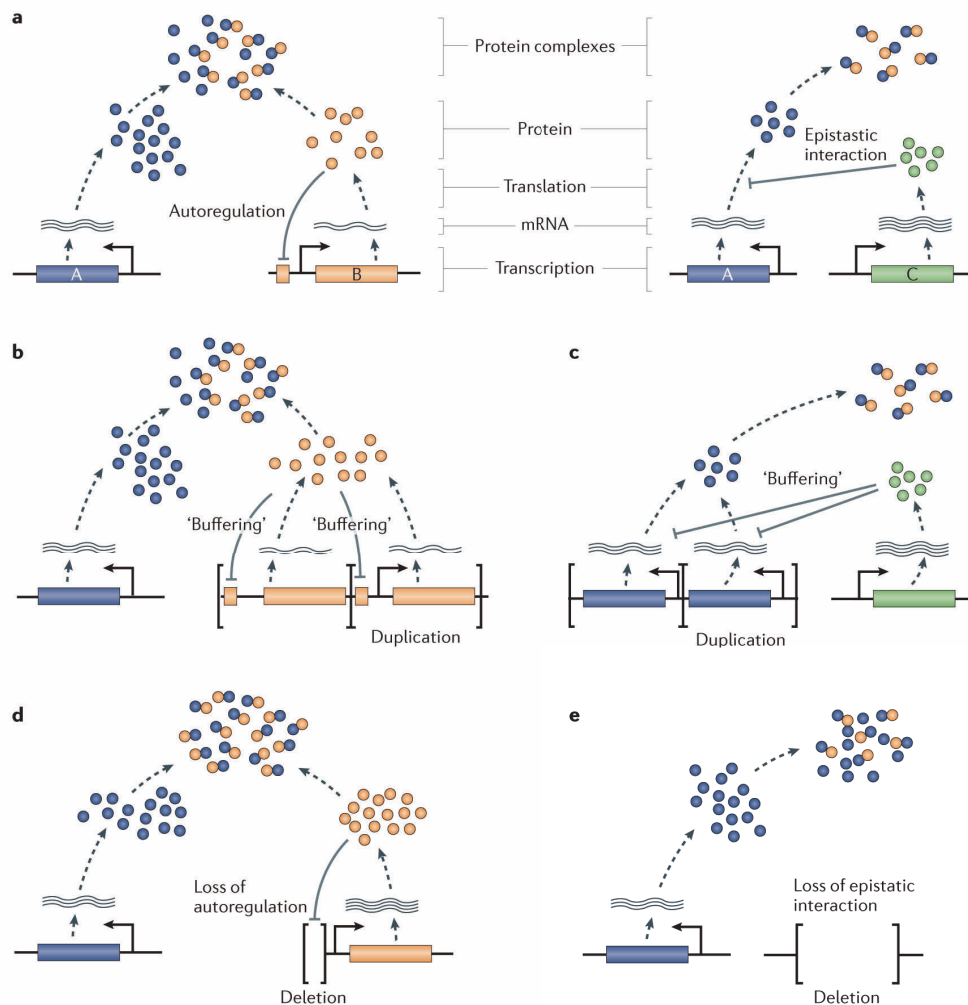


Figure 35. Du génotype au phénotype : effets modulateurs et boucles de rétroaction.

a, Dans une situation normale, les processus allant du gène à la protéine sont régulés au niveau de la transcription et de la traduction. De plus il peut y avoir des boucles de rétroaction régulatrices ; ici la protéine B régule sa propre transcription et la protéine C régule la traduction de la protéine A qui interagit avec B dans un complexe protéique. Ces mécanismes de régulation permettent de moduler l'altération du dosage d'un gène suite à un remaniement. **b**, L'autorégulation de la transcription de B par sa propre protéine réajuste l'augmentation de B causée par la duplication. **c**, La régulation de la traduction de A par la protéine C limite les effets de la duplication de A. **d**, Alternativement, le dosage d'un facteur limitant peut être augmenté par une perte d'autoregulation suite à la déletion d'un élément régulateur. **e**, Le dosage d'un facteur peut au contraire être augmenté par la perte d'un régulateur épistatique (figure tirée de Weischenfeldt et coll., 2013).

Héritabilité manquante ?

Les connaissances actuelles sur les bases génétiques des TSA permettent d'identifier une étiologie chez ~25 % des cas, alors que la contribution génétique dans la pathologie est estimée à ~80 %. Où est cette héritabilité manquante ? Plusieurs explications sont envisageables.

Notre connaissance de l'impact phénotypique des CNV est encore minime, ce qui aboutit malheureusement à la classification de nombre d'entre eux comme remaniements de « **signification clinique inconnue** ». Pourtant, parmi ceux-là, une proportion non négligeable est probablement impliquée dans les TSA. Même si les progrès techniques nous ont permis d'atteindre très rapidement des niveaux inespérés de résolution et d'efficacité, notre compréhension de la contribution des CNV à l'autisme reste encore incomplète.

Les remaniements connus actuellement sont, pour beaucoup, des **événements récurrents** associés à une pénétrance forte ; ils correspondent aux CNV les plus grands et les plus délétères, c'est-à-dire les plus faciles à identifier. Cependant, parmi les événements récurrents, un grand nombre étant associés à une pénétrance incomplète et/ou une expressivité variable, plus difficiles à impliquer dans la pathologie, reste probablement encore non identifié. Comme pour d'autres maladies, les causes les plus fréquentes et/ou associées aux effets les plus forts sont d'abord trouvées ; ensuite seulement, sont identifiés les cas atypiques, associés à des effets plus variables et dont l'implication dans la maladie est moins évidente au premier abord. Reste ensuite à approfondir nos connaissances des **CNV non récurrents**, encore plus rares et plus difficiles à trouver, puisque associés à des taux de mutation très faibles. En outre, jusqu'à aujourd'hui les études se sont concentrées sur les CNV relativement grands (>30 kb). Par conséquent, on connaît encore peu de choses sur la contribution des **petits remaniements** <30 kb, dont un très grand nombre jouant un rôle pathogène reste encore à identifier.

L'étude des CNV a confirmé l'extrême hétérogénéité génétique de l'étiologie des TSA. Ces recherches ont posé les bases pour entreprendre maintenant l'analyse des données obtenues par des approches de **séquençage de l'exome/génome entier**. L'ère du séquençage à haut débit est à présent lancée et promet d'augmenter grandement nos connaissances des gènes et loci impliqués dans l'autisme. L'impact des CNV rares, *de novo* ou hérités, associés à des effets forts (pénétrance élevée) ou à une pénétrance incomplète et/ou une expressivité variable, est probablement similaire à celle de variants de séquences rares. C'est pourquoi les connaissances obtenues jusqu'ici vont servir de guide pour l'interprétation des données obtenues dans le futur. Les premières études de SNV se sont d'ailleurs concentrées sur les variations *de novo*. Toutefois, leur interprétation clinique ainsi que l'identification de variants hérités agissant comme facteurs de risque va dépendre de la puissance statistique et de la taille des cohortes utilisées pour les recherches. La caractérisation fonctionnelle des variants identifiés reste néanmoins une étape indispensable, permettant de valider leur implication dans la pathologie. Les données du séquençage de l'exome ou du génome pourraient aussi être d'une grande aide dans l'identification des **formes oligogéniques** de TSA, dues aux mutations de plusieurs gènes. Ce mode de transmission, bien que souvent suspecté, n'a encore jamais été démontré dans les TSA.

Les données de séquençage de l'exome ou du génome peuvent être aussi utilisées pour identifier des CNV. En particulier, de nouveaux algorithmes permettant l'identification de petits CNV (<30 kb) ont déjà commencé à porter leurs fruits dans le domaine des TSA (Krumm et coll., 2013 ; Poultney et coll., 2013). Il est donc envisageable que, dans un futur proche, le séquençage de l'exome/génome remplace les micropuces comme technique de recherche recommandée en première intention dans l'exploration étiologique des TSA.

2. Identification des CNV pathogènes et recherche de gènes candidats

Identification d'une délétion de GLRA2 (Xp22.2)

Lors de l'analyse par micropuces réalisée sur les familles de la cohorte PARIS, au sein du consortium international AGP, l'ensemble des CNV rares identifiés a été minutieusement analysé et trié selon un ordre de priorité biologiquement pertinent :

- CNV *de novo*,
- Liés au chromosome X et maternellement transmis à des garçons,
- De très grande taille,
- Affectant des loci déjà impliqués dans les TSA et/ou la déficience intellectuelle,
- Affectant des gènes candidats par leur fonction,
- Retrouvés chez plusieurs patients indépendants et absents chez les témoins.

Parmi les CNV sélectionnés puis validés par des techniques indépendantes, la microdélétion localisée en Xp22.2 affectant le gène *GLRA2* a suscité un grand intérêt pour plusieurs raisons.

La délétion est localisée sur le **chromosome X**, identifiée chez un garçon (Patient 1) avec un autisme non syndromique, un retard de langage et un QI bas de 75 et héritée de la mère saine. Les mutations de gènes du chromosome X chez des individus de sexe masculin sont particulièrement intéressantes puisque, contrairement aux gènes des autosomes, la question de la dominance ou de la récessivité ne se pose pas chez ces individus. De plus, comme discuté précédemment, de nombreux gènes du chromosome X sont des causes de déficience intellectuelle et de TSA (pour revues, voir Ropers, 2010 ; Betancur, 2011).

Cette délétion est très **rare**, elle n'a été trouvée ni chez d'autres patients (n=1 131) de la cohorte AGP, ni chez les parents (n=2 712), ni chez les témoins (n=1 858) de l'étude (Pinto et coll., 2010). Elle n'a pas non plus été identifiée chez d'autres patients (n=1 359), leurs parents ou 2 800 témoins inclus dans la deuxième étape de l'étude d'AGP (Pinto et coll., soumis). Une recherche approfondie dans les bases de données ainsi que dans la littérature a confirmé la singularité de cette délétion puisqu'elle est absente chez 1 124 cas sporadiques de TSA (*Simons Simplex Collection*, Sanders et coll., 2011) et chez plus de 11 000 témoins (Jakobsson et coll., 2008 ; Kirov et coll., 2009 ; Shaikh et coll., 2009 ; Altshuler et coll., 2010 ; Sanders et coll., 2011 ; Grond-Ginsbach et coll., 2012 ; Krepischi et coll., 2012 ; Silversides et coll., 2012).

La délétion affecte les deux derniers exons du **gène *GLRA2* (glycine receptor alpha 2)**, codant la sous-unité $\alpha 2$ du récepteur de glycine (GlyR). Elle a très probablement un effet perte de fonction sur la protéine puisqu'elle élimine ses deux derniers domaines transmembranaires, empêchant ainsi son ancrage à la membrane plasmique. Chez les vertébrés, *GLRA2* appartient à une famille de gènes très conservée, constituée de quatre membres, *GLRA1*, *GLRA2*, *GLRA3* et *GLRA4*, codant les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ des GlyR ; chez l'homme, *GLRA4* est un pseudogène. En revanche, un seul gène code la sous-unité β des GlyR (**Figure 36**).

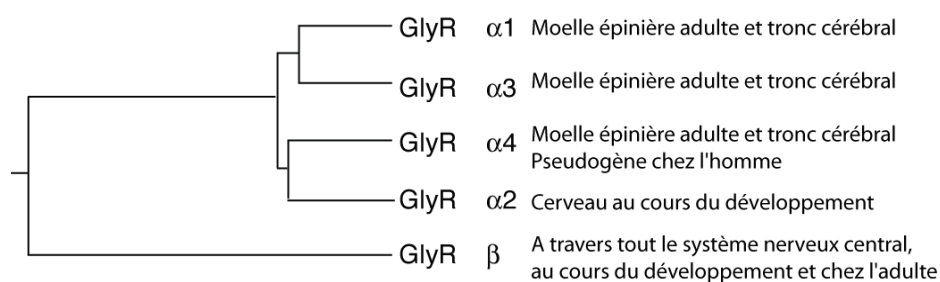


Figure 36. Arbre phylogénétique des sous-unités des récepteurs de glycine chez les mammifères.

Les relations entre les différentes sous-unités sont indiquées, ainsi que leur site principal d'expression dans le système nerveux central (figure adaptée de Laube et coll., 2002).

Les sous-unités α ont des motifs d'expression spatio-temporels très différents. Alors que la sous-unité β est exprimée à travers tout le système nerveux central, au cours de la vie embryonnaire et de la vie adulte, les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont principalement présentes dans la moelle épinière et le tronc cérébral chez l'adulte, bien que la sous-unité $\alpha 3$ soit aussi exprimée dans le cerveau. Au contraire, la sous-unité $\alpha 2$ est la plus abondante dans le cerveau au cours du développement puis pendant la période postnatale, stades où la

prolifération, la migration et la différenciation neuronale puis la synaptogenèse ont lieu. Ces différences de profils d'expression suggèrent un rôle spécifique des GlyR $\alpha 2$ dans le développement neuronal.

Alors que les GlyR ont une fonction inhibitrice dans les neurones adultes, leur action est inversée au cours du développement. Dans les neurones immatures, à cause de la concentration intracellulaire élevée en ions chlorure et du potentiel d'équilibre Cl^- positif, l'ouverture des GlyR entraîne une sortie d'ions Cl^- , une dépolarisation et donc un courant exciteur. La sortie d'ions Cl^- est accompagnée d'une entrée d'ions calcium dans la cellule, connus pour réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans divers processus de maturation neuronale (pour revue, voir Spitzer, 2006). Ainsi, au cours du développement, en provoquant l'apparition de courants spontanés excitateurs dans les réseaux neuronaux, l'activation des GlyR $\alpha 2$ a probablement des effets neurotrophiques indirects, via des mouvements de calcium intracellulaire. Cette action des GlyR immatures a été montrée dans plusieurs régions du système nerveux central, comme le cervelet (Furuya et coll., 2000), la moelle épinière (Tapia et coll., 2000 ; Tapia et coll., 2001) et le cortex (Avila et coll., 2013), ainsi que dans la rétine (Young et Cepko, 2004). En particulier, une étude récente réalisée à des stades précoces du développement dans le cortex de souris déficientes pour *Gla2* a montré une altération de la migration des interneurons en l'absence de ce gène (Avila et coll., 2013). De plus, les récepteurs GABA_A, dont l'action est très similaire à celle des GlyR, ont été impliqués dans les processus de prolifération, différenciation et migration neuronale (LoTurco et coll., 1995 ; Nguyen et coll., 2001 ; Manent et coll., 2005 ; Bortone et Polleux, 2009).

Enfin, le gène *GLRA2* n'a encore été impliqué dans aucune maladie alors que les défauts de transmission glycinergique causés par des mutations *GLRA1* sont la première cause d'hyperekplexie, une maladie caractérisée par une rigidité musculaire à la naissance et un réflexe de tressaillement exagéré provoqué par un stimulus inattendu (Harvey et coll., 2008). La sous-unité $\alpha 3$ est, quant à elle, impliquée dans les mécanismes de la douleur inflammatoire (Harvey et coll., 2004b) et dans la régulation du rythme respiratoire (Manzke et coll., 2010).

L'ensemble de ces résultats montre comment l'étude des CNV permet d'identifier des gènes candidats dont l'implication dans la pathologie nécessite d'être validée par des approches génétiques et fonctionnelles.

Identification d'une mutation faux sens de novo dans *GLRA2*

Afin d'identifier d'autres patients avec des mutations de *GLRA2*, nous avons séquencé 400 cas de sexe masculin de la cohorte PARIS. Plusieurs variants introniques ou silencieux ont été identifiés, ainsi qu'une mutation **de novo** faux sens, localisée dans l'exon 4 de *GLRA2* (c.458G>A), qui change l'arginine en position 153 de la protéine en une glutamine (**p.R153Q**). La mutation a été trouvée chez un individu (Patient 2) ayant un autisme non syndromique, une déficience intellectuelle légère (QI=63), un retard de langage sévère et une épilepsie qui a débuté à l'adolescence. Il appartient à une famille à cas multiples, puisque l'une de ses grandes sœurs a aussi un diagnostic d'autisme et une déficience intellectuelle légère, mais ne porte pas la mutation p.R153Q. Cependant, les cas d'**hétérogénéité génétique intrafamiliale** ne sont pas rares parmi les familles à cas multiples avec TSA et/ou déficience intellectuelle (Mandel et Chelly, 2004 ; Weiss et coll., 2008 ; Pinto et coll., 2010 ; Tabet et coll., 2012).

La mutation n'a pas été retrouvée chez 404 pères de la cohorte PARIS, ni chez 13 758 chromosomes X témoins de la littérature (Abecasis et coll., 2010 ; Klassen et coll., 2011 ; Lim et coll., 2013 ; Liu et coll., 2013), ou d'une base de données recueillant les variations de séquence identifiées chez des témoins appelée *Exome Variant Server* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), ce qui indique son extrême rareté. Plusieurs arguments sont en faveur d'un effet délétère de cette mutation :

- Elle touche un acide aminé **conservé** au cours de l'évolution, inchangé dans les séquences protéiques de *GLRA2* chez les vertébrés, ainsi que parmi les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ chez l'homme. Ceci suggère qu'il y

aurait une pression de sélection à cette position dans la protéine et donc un rôle fonctionnel important de cet acide aminé.

- L'étude *in silico* de cette mutation prédit un effet **délétère** (PolyPhen-2, SNPs&GO, MutPred, PANTHER et SIFT). De plus, la substitution de l'acide aminé équivalent dans la protéine homologue GLRA1 (R119A) entraîne une diminution drastique de l'affinité du récepteur pour la glycine et la taurine, indiquant donc que cet acide aminé a un rôle important pour la liaison du ligand au récepteur (Grudzinska et coll., 2005).
- L'analyse *in silico* d'autres variants faux sens de *GLRA2* trouvés dans la littérature ainsi que dans la base de données *Exome Variant Server* (Piton et coll., 2011 ; Iossifov et coll., 2012) a montré que tous les variants rares potentiellement délétères sont présents chez des femmes, alors que ceux identifiés chez des hommes sont bénins. Ces résultats suggèrent que la perte de fonction de ce gène chez les individus de sexe masculin serait probablement pathogène.

3. Analyses fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*

3.1 Perte de fonction des mutations de *GLRA2*

Le principal défi de l'analyse des variants rares est précisément leur singularité, c'est-à-dire le fait que la grande majorité des variations génétiques n'est observée que chez quelques patients, certaines étant parfois uniques. En conséquence, puisqu'un variant à lui seul n'est pas, dans la plupart des cas, une preuve suffisante de pathogénicité, un ensemble d'approches variées et complémentaires est nécessaire pour comprendre son impact fonctionnel et l'impliquer définitivement dans la pathologie. Nous avons utilisé une combinaison d'analyses fonctionnelles, *in vitro* et *in vivo*, pour démontrer expérimentalement la pathogénicité des variants de *GLRA2* identifiés chez des patients atteints de TSA.

Expériences *in vitro*

Les expériences réalisées *in vitro* ont été choisies selon la fonction du gène. Puisque *GLRA2* code une sous-unité d'un récepteur, nous avons étudié la localisation cellulaire et la fonction des récepteurs délétés et mutés, par des expériences d'immunohistochimie et d'électrophysiologie sur cellules transfectées avec les formes de *GLRA2* portant les mutations identifiées. Cette même approche s'est avérée efficace pour l'étude des effets fonctionnels de mutations du gène *GLRA1* chez des patients atteints d'hyperekplexie (Chung et coll., 2010). Notre analyse *in vitro* des mutations de *GLRA2* a permis de démontrer les effets perte de fonction des deux variations génétiques identifiées chez des patients avec TSA. Alors que l'effet de la délétion était prévisible, celui de la mutation faux sens était en revanche plus inattendu.

Des expériences d'immunohistochimie ont montré que la forme du récepteur portant la sous-unité $\alpha 2$ délétée n'est pas exprimée à la membrane plasmique et reste dans le cytoplasme, probablement à cause de la perte des deux derniers domaines transmembranaires. Le récepteur composé de sous-unités $\alpha 2$ portant la mutation faux sens est, quant à lui, présent à la surface cellulaire. Cependant, des analyses électrophysiologiques ont montré que ce dernier est quasiment insensible à la glycine ajoutée dans le milieu extracellulaire, indiquant que son efficacité est dramatiquement réduite. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus sur la protéine homologue *GLRA1*, qui, lorsqu'elle porte une substitution de l'acide aminé équivalent (R119A), forme un récepteur dont l'affinité pour la glycine est fortement diminuée (Grudzinska et coll., 2005). Par ailleurs, l'application de glycine à haute concentration n'induit aucun courant sur les cellules exprimant la forme délétée de *GLRA2* puisque le récepteur n'est pas présent à la surface cellulaire. L'ensemble des résultats obtenus montre que des mécanismes différents sont à la base de la perte de fonction des récepteurs délétés et mutés : la délétion empêche son ancrage à la membrane alors que la mutation le rend inactif en présence de concentrations physiologiques de glycine.

Analyses chez le poisson zèbre

Des analyses réalisées chez le *poisson zèbre* nous ont permis de confirmer que les mutations de *GLRA2* ont aussi des effets perte de fonction *in vivo*. Nous avons tout d'abord observé une morphologie anormale des axones des motoneurons spinaux avec des branchements multiples et aberrants suite à l'inactivation ciblée de *glra2* chez l'embryon de poisson. Ensuite, l'injection du transcrit humain sauvage de *GLRA2* chez les morphants a restauré le phénotype normal, alors que celle des transcrits délétés ou mutés n'a eu aucun effet. Ces expériences démontrent que les effets observés chez les morphants sont bien spécifiques de l'inactivation de *glra2* et confirment que les deux mutations de ce gène identifiées chez nos patients avec TSA ont des effets perte de fonction.

Le poisson zèbre est un modèle puissant pour l'étude du système nerveux central et de ses fonctions (pour revues, voir Kabashi et coll., 2010 ; Burne et coll., 2011). En effet, il combine certaines caractéristiques pratiques des modèles d'animaux invertébrés (petite taille, utilisation facile, existence d'outils génétiques) et des modèles de mammifères, en particulier le fait qu'une partie de son architecture neuronale soit relativement similaire à celle de l'homme. Un intérêt majeur de ce modèle réside dans la transparence des embryons et des larves au cours du développement et jusqu'à une semaine après la fertilisation. De plus, des outils génétiques efficaces existent, comme les oligonucléotides antisens qui permettent d'inactiver spécifiquement un gène donné. L'utilisation du poisson zèbre, non pas en tant que modèle comportemental mais plutôt comme un outil pour l'étude des mécanismes à la base de maladies neurodéveloppementales, est assez récente et s'est déjà avérée très utile. Il peut être également utilisé pour rechercher les gènes contribuant aux phénotypes associés aux CNV récurrents. C'est le cas par exemple pour la région 16p11.2 proximale qui contient 29 gènes, dont les homologues ont été étudiés chez le poisson zèbre pour identifier ceux qui contribuent aux phénotypes associés aux remaniements de cette région génomique (Blaker-Lee et coll., 2012 ; Golzio et coll., 2012).

3.2 Caractérisation des souris déficientes pour *Glr2*

Comportement et plasticité synaptique

Les souris mâles déficientes pour *Glr2* (*Glr2*^{Y/-}) ont une apparence normale et une espérance de vie identique à celle des souris sauvages. Une analyse comportementale détaillée a montré qu'elles n'ont aucun défaut d'activité et de coordination motrice et présentent un comportement normal dans les tests d'anxiété, d'interactions sociales et de comportements répétés. Cependant, les souris *Glr2*^{Y/-} ont un déficit dans le test de reconnaissance d'objet (mémorisation d'un objet familier par rapport à un objet nouveau), alors qu'elles réussissent les tâches d'apprentissage et de mémoire spatiale (piscine de Morris et test de reconnaissance spatiale d'objet). Ces résultats indiquent que les souris déficientes pour *Glr2* ont des défauts partiels **d'apprentissage et de mémoire**. De plus, des expériences d'électrophysiologie sur tranches de cortex préfrontal des souris adultes ont révélé des défauts de potentialisation à long terme, indiquant un défaut de **plasticité synaptique corticale** chez les souris mutantes.

Plusieurs observations peuvent être faites à partir de ces résultats. Tout d'abord, au niveau cognitif, le déficit subtil observé chez les souris *Glr2*^{Y/-} est concordant avec celui décrit chez les patients porteurs des mutations de *GLRA2* qui ont une déficience intellectuelle légère. De plus, le phénotype des souris rappelle celui des individus atteints de TSA, qui présentent des troubles cognitifs plus ou moins sévères mais des fonctions visuo-spatiales normales. Nous n'avons pas observé de déficit chez les souris *Glr2*^{Y/-} dans les tests d'interactions sociales et de comportements répétés. Comme dans notre cas, de nombreux modèles de souris déficientes pour des gènes impliqués dans les TSA ne présentent pas de tels défauts (Jiang et Ehlers, 2013). Etant donnée la variabilité de l'expression phénotypique de la plupart des gènes impliqués dans les TSA et la

déficience intellectuelle, il serait illusoire d'espérer trouver chez tous les modèles animaux des phénotypes anormaux dans les trois domaines comportementaux atteints chez l'homme.

Le fait que les souris *Glr2*^{Y/-} soient performantes dans les tests de mémoire spatiale et déficientes dans le test de reconnaissance d'objet indique que leurs fonctions hippocampiques ne semblent pas affectées et suggère plutôt une **altération corticale**. De nombreuses recherches ont révélé un rôle central du cortex périrhinal dans la reconnaissance d'objet ainsi que dans les processus de la mémoire et de la consolidation (Warburton et Brown, 2010 ; Brown et coll., 2012), alors que l'implication de l'hippocampe reste controversée (Brown et Aggleton, 2001). Il semblerait que cette dernière structure soit impliquée dans la discrimination de la localisation des objets plutôt que dans leur reconnaissance (Barker et Warburton, 2011). La contribution relative du cortex préfrontal, périrhinal et de l'hippocampe reste mal connue et dépend du type d'information, par exemple la familiarité de l'objet, sa localisation spatiale et à quel moment il a été rencontré. Il semblerait que l'interaction entre les différentes structures soit nécessaire pour gérer les processus complexes de la mémoire de reconnaissance (Warburton et Brown, 2010 ; Vann et Albasser, 2011).

Une démonstration directe du rôle des interneurons du cortex préfrontal dans la mémoire de reconnaissance d'objet a été apportée par des expériences de transplantation chez la souris. Il a d'abord été montré que des injections répétées de phéncyclidine, un antagoniste des récepteurs NMDA, induisent une diminution de la préférence de l'animal pour le nouvel objet dans le test de reconnaissance d'objet (Hashimoto et coll., 2005). Ensuite, des expériences de transplantation de cellules de l'éminence ganglionnaire médiane dans le cortex préfrontal ont montré que la plupart des cellules transplantées se différencient en interneurons GABAergiques et deviennent fonctionnelles dans les circuits neuronaux hôtes chez l'adulte (Tanaka et coll., 2011). De façon intéressante, lorsque la transplantation est réalisée avant l'administration de phéncyclidine, aucun déficit n'est observé dans le test de reconnaissance d'objet (Tanaka et coll., 2011). Ces résultats montrent l'implication du cortex préfrontal, en particulier des interneurons inhibiteurs, dans les processus de la reconnaissance d'objet.

Pour mieux comprendre les déficits des souris *Glr2*^{Y/-}, elles ont été testées dans l'*odor span task* (Young et coll., 2007), un test faisant appel aux fonctions corticales (Cui et coll., 2011 ; Rushforth et coll., 2011). Il s'agit d'une tâche non spatiale qui évalue la capacité de mémoire de travail de l'animal. Dans ce test, les souris sont entraînées à creuser dans des coupelles contenant de la sciure avec une odeur (vanille, cannelle, etc.) pour trouver une récompense alimentaire. Le test commence avec une seule coupelle contenant une récompense : la souris doit creuser, trouver la récompense et se souvenir de la première odeur. Une fois la récompense récupérée, une deuxième coupelle contenant une autre odeur (et une récompense) est ajoutée. La souris doit donc creuser dans la deuxième coupelle pour trouver la récompense, puis une troisième coupelle est ajoutée, etc. A chaque réponse correcte, une coupelle avec une nouvelle odeur est ajoutée (jusqu'à douze odeurs). Le test permet d'évaluer le nombre d'odeurs (*span*) qui peuvent être retenues par la souris et fournit ainsi une mesure de sa capacité de mémoire de travail. Les souris déficientes pour *Glr2* n'ont montré aucun déficit dans l'*odor span task*, comparées aux souris sauvages (résultats non montrés). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- On peut tout d'abord proposer que la reconnaissance d'odeurs et la reconnaissance d'objets ne sollicitent pas les mêmes structures cérébrales ni les mêmes capacités naturelles des rongeurs, particulièrement performants dans les tâches faisant appel à leur odorat. Cette différence expliquerait les résultats discordants obtenus dans les tests de reconnaissance d'objet et d'*odor span*.
- Une hypothèse alternative impliquerait les processus de la motivation. Lors du test d'*odor span*, les souris sont maintenues pendant plusieurs jours à 85 % de leur poids initial et sont récompensées par de la nourriture si elles réussissent la tâche. La motivation de l'animal est donc beaucoup plus forte par rapport au test de reconnaissance d'objet. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que dans cette situation de motivation accrue, les souris *Glr2*^{Y/-} arriveraient à surmonter leur déficit d'apprentissage et de mémoire.

La **dopamine** pourrait en être responsable puisqu'elle intervient dans les processus de la motivation et la récompense. La communication entre les différentes régions cérébrales est une composante clef des processus sous-tendant la cognition, l'apprentissage et la mémoire (pour revues, voir Brown et Aggleton, 2001 ; Battaglia et coll., 2011). Cette communication se manifeste par des **oscillations synchronisées** entre les structures, régulées en partie par les interneurons. Chez un modèle de souris du syndrome de DiGeorge (microdélétion 22q11.2) (Zafeiriou et coll., 2013), il a été montré que les défauts d'apprentissage sont positivement corrélés à des altérations des oscillations entre le cortex préfrontal et l'hippocampe (Sigurdsson et coll., 2010). En outre, ces échanges d'information entre les différentes régions cérébrales s'adaptent aux situations et les oscillations varient en fonction des tâches comportementales (Benchenane et coll., 2010). En particulier, la synchronisation des oscillations entre le cortex et l'hippocampe est renforcée par une libération de dopamine lorsque la motivation est forte, c'est-à-dire en prévision d'une récompense (Figure 37). Cet effet se ferait en partie par une action sur la transmission inhibitrice (Tierney et coll., 2008). Ces résultats vont dans le sens de notre hypothèse selon laquelle le déficit cognitif des souris *Gla2*^{Y/-} dans le test de reconnaissance d'objet et les défauts de plasticité synaptique corticale seraient surmontés dans un contexte de forte motivation, grâce à une libération de dopamine dans le cortex préfrontal.

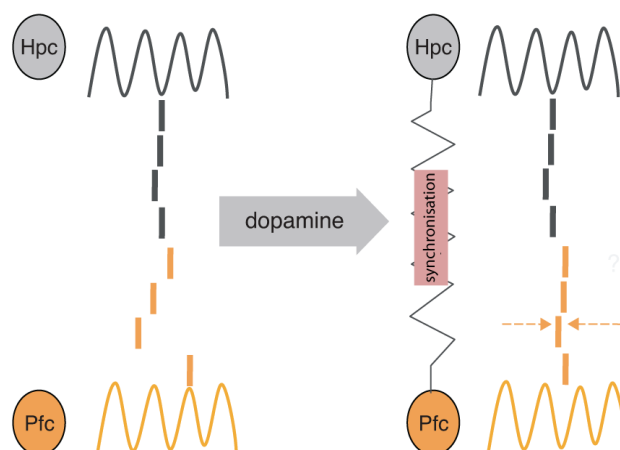


Figure 37. Implication de la dopamine dans la communication entre les différentes structures cérébrales.

La libération de dopamine augmente la synchronisation des oscillations entre le cortex préfrontal (Pfc) et l'hippocampe (Hpc) (figure adaptée de Benchenane et coll., 2011).

Neuropathologie

L'étude de modèles de souris invalidées pour des gènes impliqués dans les TSA est cruciale pour comprendre les anomalies au niveau cellulaire et moléculaire, ainsi que les mécanismes physiopathologiques impliqués. Il a été montré récemment que les souris déficientes pour *Gla2* (les mêmes que celles utilisées pour nos expériences) ont des défauts de **migration des interneurons** dans le cortex au cours du développement (Avila et coll., 2013). Des expériences de gain et de perte de fonction de *GLRA2* par électroporation de différentes constructions sur des tranches de cerveaux d'embryons de souris de 13,5 jours de développement (E13,5) ont montré que la surexpression de *GLRA2* facilite la migration des interneurons de l'éminence ganglionnaire médiane vers le cortex, alors que le blocage de l'expression du gène a des effets inverses. De plus, l'inhibition des GlyR α 2 par l'application de strychnine sur des cultures de cerveaux embryonnaires (E15,5) réduit la vitesse de migration des interneurons. Des flux de calcium intracellulaires sont observés dans les neurones immatures suite à l'activation des GlyR, qui provoquent la phosphorylation de la myosine et la contraction des fibres d'actomyosine impliquées dans les mouvements cellulaires. Enfin, à partir de tranches de cerveaux (E15,5) de souris déficientes pour *Gla2*, les auteurs ont montré une diminution de la migration des interneurons dans les couches profondes du cortex (Avila et coll., 2013). Les facteurs trophiques et les facteurs de transcription ont longtemps été considérés comme les acteurs principalement responsables des

processus de développement neuronal, incluant la migration des interneurons. Cependant, l'action des neurotransmetteurs dans ces processus est à présent bien acceptée, notamment pour la sérotonine, le GABA et le glutamate, bien que le rôle de la glycine et des GlyR ait été moins documenté (Nguyen et coll., 2001). Les résultats obtenus par Avila et coll. (2013) montrent que les GlyR α 2 sont exprimés par les interneurons au cours du développement cortical et que leur activation régule la migration de ces cellules.

Chez les souris déficientes pour *Glr2* on peut faire deux hypothèses :

- Les défauts de migration des interneurons observés au cours du développement dans le cortex entraînent *in fine* un mauvais positionnement de ces cellules ;
- Il s'agit plutôt d'un retard de migration des interneurons qui parviennent malgré tout à atteindre leur position finale.

Une étude antérieure sur des souris déficientes pour *Glr2*, différentes de celles utilisées dans notre étude, n'a pas rapporté de défauts majeurs de la structure du cortex (Young-Pearse et coll., 2006). De plus, des analyses d'immunohistochimie, réalisées chez nos souris après la période de migration neuronale (sept jours après la naissance, P7) (**Figure 38**) n'ont pas indiqué de défauts de positionnement des interneurons positifs à la somatostatine, suggérant plutôt un retard de la migration des interneurons dans le cortex des souris *Glr2*^{Y/-}. Toutefois, il existe de nombreux sous-types d'interneurons et une étude plus approfondie de ces populations neuronales, à différents stades de développement, est nécessaire. Quoi qu'il en soit, une anomalie de la migration des interneurons corticaux à un stade de développement où ils jouent un rôle primordial dans la mise en place des réseaux de neurones, peut avoir des conséquences fonctionnelles et entraîner des déficits cognitifs.

Comme mentionné précédemment, il serait intéressant de déterminer quels **interneurons** exactement sont affectés chez les souris *Glr2*^{Y/-}. En effet, la synchronisation neuronale au sein des réseaux corticaux repose sur un nombre relativement faible, mais extrêmement varié, d'interneurons (Xu et coll., 2003). Malgré cette forte hétérogénéité, les interneurons d'un même sous-type sont homogènes : ils ont la même origine, la même morphologie et les mêmes caractéristiques électriques. On peut tout de même diviser la majorité des interneurons en deux groupes : les interneurons positifs à la parvalbumine et ceux positifs à la somatostatine. Les conséquences fonctionnelles d'un déficit d'inhibition glycinergique dépendent de la classe d'interneurons touchés, c'est pourquoi une analyse précise des sous-types d'interneurons affectés chez les souris *Glr2*^{Y/-} pourrait clarifier les mécanismes physiopathologiques impliqués.

La mise en place incorrecte des interneurons au cours du développement peut aussi entraîner un déséquilibre de la **balance excitation/inhibition (E/I)** dans les circuits de neurones. Des altérations profondes de la fonction des interneurons ou du système inhibiteur GABAergique induisent un déséquilibre fort et une hyperexcitabilité pathologique qui aboutit souvent à l'apparition de phénotypes sévères, incluant la plupart du temps une épilepsie (Noebels, 2003 ; Colasante et coll., 2008 ; Friocourt et coll., 2008 ; Poduri et Lowenstein, 2011). Cependant, il est probable que des perturbations plus subtiles de la neurotransmission inhibitrice (et de la balance E/I) provoquent l'apparition de troubles neurodéveloppementaux moins sévères. On peut imaginer que des défauts de la neurotransmission glycinergique soient moins dramatiques pour le système comparés à des altérations de la neurotransmission GABAergique, ce qui entraînerait des phénotypes moins sévères. Cependant, on ne peut pas exclure que des mécanismes de compensation par le système GABAergique aient lieu chez les souris *Glr2*^{Y/-}, empêchant ainsi un dérèglement sévère du réseau neuronal.

L'ensemble de ces résultats pourrait apporter une base cellulaire aux **défauts de plasticité synaptique** observés dans le cortex des souris *Glr2*^{Y/-}. Ces résultats indiquent que des altérations de la neurotransmission glycinergique entraînent des défauts de plasticité synaptique dans le cortex préfrontal, une région impliquée dans les TSA (Ohnishi et coll., 2000 ; Casanova et coll., 2002 ; Courchesne et coll., 2007 ; Koshino et coll., 2008 ; Sahyoun et coll., 2010).

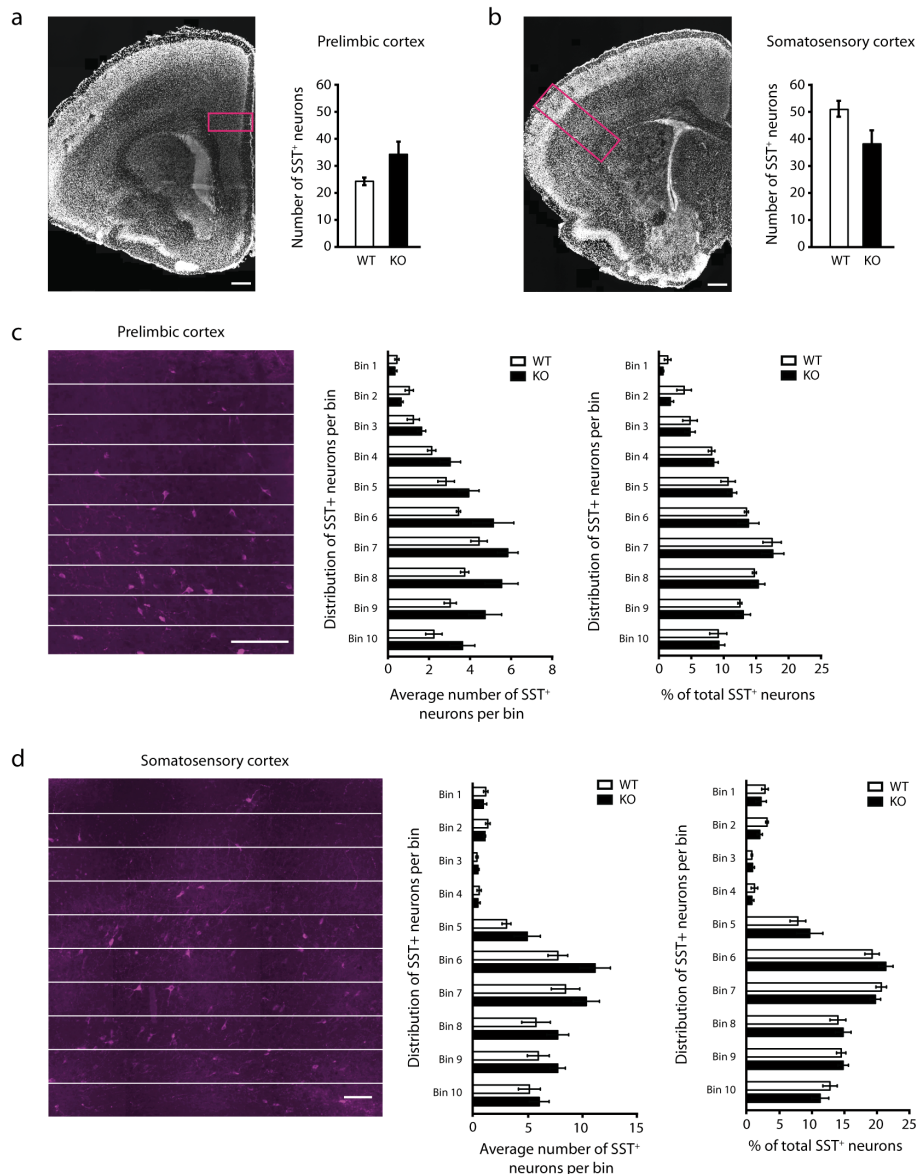


Figure 38. Distribution normale des interneurons positifs à la somatostatine (SST) dans le cortex des souris *Glra2*^{-/-}.

a, b, Images représentatives de coupes coronales de cerveaux de souris sauvages (P7) ; les rectangles montrent l'aire analysée dans le cortex prélimbique (**a**) et somatosensoriel (**b**) ; les barres d'échelle représentent 300 μ m. Le nombre total d'interneurons SST⁺ est identique chez les souris sauvages et *Glra2*^{-/-} dans le cortex prélimbique ($24,1 \pm 1,4$ cellules SST⁺ chez les souris sauvages et $34 \pm 4,7$ cellules SST⁺ chez les souris *Glra2*^{-/-} ; moyenne \pm sem à partir de 4 cerveaux de souris par génotype, 2-5 coupes par cerveau) et dans le cortex somatosensoriel ($50,3 \pm 4,6$ cellules SST⁺ pour les souris sauvages et $39,1 \pm 5,6$ cellules SST⁺ pour les souris *Glra2*^{-/-}). **c, d**, Images représentatives des sections analysées dans les coupes coronales de cerveaux montrant la distribution des cellules SST⁺ dans le cortex prélimbique (**c**) et somatosensoriel (**d**) ; les barres d'échelle représentent 100 μ m ; le nombre moyen d'interneurons SST⁺ par tranche et la distribution (%) sont indiqués.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les GlyR semblent jouer un rôle important dans la communication entre la **glie** et les neurones. Premièrement, lorsqu'ils sont localisés à des sites extra-synaptiques, ils peuvent être activés de façon tonique par la glycine ou la taurine libérée par les cellules gliales environnantes (Deleuze et coll., 2005 ; Scain et coll., 2010). Il a été proposé que la libération de glycine par les cellules progénitrices des cellules gliales au cours du développement pourrait être impliquée dans les processus de maturation neuronale (Scain et coll., 2010). Inversement, il a été démontré que les GlyR sont aussi exprimés par certaines cellules gliales, en particulier la macroglie (pour revue, voir Van den Eynden et coll., 2009). Leur activation sur les cellules progénitrices des oligodendrocytes suite à la libération de glycine par les neurones environnants provoque l'apparition de flux de calcium intracellulaires. Cette communication entre les neurones et les cellules progénitrices des oligodendrocytes aurait probablement un rôle important au

cours du développement. On peut donc penser que le phénotype des souris déficientes pour *Gra2* serait dû en partie à la perte de ce gène tant dans les neurones que dans les cellules non neuronales, comme les cellules gliales.

C'est en effet le cas pour le syndrome de Rett (pour revue, voir Guy et coll., 2011). On a longtemps pensé que ce syndrome n'était causé que par la perte de la fonction de MECP2 dans les cellules neuronales (Luikenhuis et coll., 2004). Cependant, bien que les neurones défectueux sous-tendent clairement les phénotypes anormaux du syndrome de Rett, la perte de *Mecp2* dans les cellules gliales, spécifiquement les astrocytes, a des effets négatifs additionnels sur les neurones (Ballas et coll., 2009). Chez les souris déficientes pour *Mecp2*, la réexpression du gène dans les cellules gliales aboutit à une amélioration significative de leur phénotype ainsi qu'à des effets positifs sur la morphologie et la fonction des neurones mutants *in vivo* (Lioy et coll., 2011). Ainsi, un nouveau rôle de la glie, en tant que composante majeure de la neuropathologie sous-jacente de syndromes neurodéveloppementaux comme le syndrome de Rett, est en train d'émerger. Dans le cas de *Gra2* il n'est donc pas exclu que la perte de la protéine dans la glie radiaire contribue au phénotype des souris, en plus de défauts neuronaux comme les défauts de migration récemment démontrés dans le cortex (Avila et coll., 2013).

4. Perspectives thérapeutiques

Pour le moment, les thérapies pharmacologiques utilisées chez les patients atteints de TSA et d'autres troubles neurodéveloppementaux ciblent des manifestations comme l'épilepsie, les troubles du sommeil, l'agitation ou l'agressivité. Cependant, l'identification de nouveaux gènes impliqués dans les TSA fournit de nouvelles opportunités de développer des molécules qui visent à rétablir directement le déséquilibre biologique résultant d'une anomalie génétique. Dans le cas du syndrome de Rett et du syndrome de l'X fragile, les recherches sont actives et ont déjà apporté des résultats remarquables et inattendus. Chez les modèles murins de ces deux syndromes, une morphologie anormale des épines dendritiques, accompagnée d'un dysfonctionnement des neurones ont été observés ; cependant, aucune perte neuronale n'a lieu. Dans ce cas, la question se pose de savoir si les neurones viables mais défectueux peuvent être réparés, ou si les dommages causés pendant le développement sont irrévocables. Il y a donc deux issues possibles : (i) La restauration de l'expression de la protéine déficiente pourrait corriger la fonction des neurones défectueux et donc rétablir un phénotype normal. (ii) La protéine serait essentielle pour le développement neuronal durant une fenêtre de temps limité, après quoi les dommages causés en son absence seraient irréversibles. Pour tester ces hypothèses, plusieurs stratégies ont été utilisées chez les souris déficientes pour *Mecp2* :

- la réexpression du gène *Mecp2* dans les neurones de souris conditionnelles adultes (Guy et coll., 2007),
- la transplantation de moelle osseuse chez des souris déficientes pour *Mecp2* (Derecki et coll., 2012),
- la thérapie génique par injection de virus permettant la réexpression de *MECP2* dans tout le système nerveux central (Garg et coll., 2013),
- la restauration de la protéine dans les cellules gliales spécifiquement (Lioy et coll., 2011),
- la surexpression du BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), une neurotrophine impliquée dans le développement du cerveau et sa plasticité (Chang et coll., 2006).

De façon remarquable, ces différentes approches ont toutes pu améliorer de manière significative certains phénotypes anormaux observés chez les souris déficientes pour *Mecp2*, incluant la durée de vie, les défauts locomoteurs et les déficits électrophysiologiques. Le facteur de croissance BDNF ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, il ne peut pas être utilisé comme traitement chez les patients ; cependant, d'autres facteurs de croissance, comme l'IGF1 (*insulin-like growth factor 1*), peuvent traverser la barrière. L'utilisation d'IGF1 sur un modèle de souris du syndrome de Rett a apporté des résultats concluants (Tropea et coll., 2009), suggérant qu'il pouvait être utilisé chez des patients. Depuis, des études de phase I chez des patients ont été

validées (Pini et coll., 2012) et une étude de phase II est en cours. L'IGF1 s'est aussi avéré utile pour corriger les déficits électrophysiologiques des souris déficientes pour *SHANK3* (Bozdagi et coll., 2013) et un essai clinique est en cours au Mount Sinai à New York sur des patients atteints du syndrome de Phelan-McDermid.

L'ensemble de ces données chez des modèles animaux du syndrome de Rett et de plusieurs autres troubles neurodéveloppementaux associés aux TSA indique que des processus physiopathologiques dans le cerveau mature contribuent de manière significative aux phénotypes neurologiques. Ces résultats suggèrent que la période pour une intervention thérapeutique efficace dans les TSA pourrait être plus longue qu'on ne le pensait et offrent un espoir inattendu.

En conclusion, l'utilisation d'études génétiques et fonctionnelles nous a permis de démontrer que des mutations du gène *GLRA2* ayant des effets perte de fonction sont associées aux TSA, à un retard de langage et à une déficience intellectuelle légère. Nos résultats offrent de nouvelles perspectives quant au rôle biologique de ce gène et suggèrent l'implication de la neurotransmission glycinergique dans la physiopathologie des TSA.

A

- Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061-1073
- Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU (2002) PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5, 34-40
- Al-Farsi YM, Al-Sharbaty MM, Al-Farsi OA, Al-Shafae MS, Brooks DR, Waly MI (2011) Brief report: Prevalence of autistic spectrum disorders in the Sultanate of Oman. *J Autism Dev Disord* 41, 821-825
- Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, Yu F, Bonnen PE, de Bakker PI, Deloukas P, Gabriel SB et al. (2010) Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467, 52-58
- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth ed. (Washington, DC, American Psychiatric Association)
- American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (Washington, DC,)
- Amiet C, Gourfinkel-An I, Bouzamondo A, Tordjman S, Baulac M, Lechat P, Mottron L, Cohen D (2008) Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis. *Biol Psychiatry* 64, 577-582
- Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Sykes N, Pagnamenta AT et al. (2010) A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet* 19, 4072-4082
- Anney R, Klei L, Pinto D, Almeida J, Bacchelli E, Baird G, Bolshakova N, Bolte S, Bolton PF, Bourgeron T et al. (2012) Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 21, 4781-4792
- Aroeira RI, Ribeiro JA, Sebastiao AM, Valente CA (2011) Age-related changes of glycine receptor at the rat hippocampus: from the embryo to the adult. *J Neurochem* 118, 339-353
- Ascano M, Jr., Mukherjee N, Bandaru P, Miller JB, Nusbaum JD, Corcoran DL, Langlois C, Munschauer M, Dewell S, Hafner M et al. (2012) FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* 492, 382-386
- Asperger H (1944) Die "Autistischen Psychopathen" im Kindesalter. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 117, 76-136
- Atladdottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET (2010) Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 40, 1423-1430
- August GJ, Stewart MA, Tsai L (1981) The incidence of cognitive disabilities in the siblings of autistic children. *Br J Psychiatry* 138, 416-422
- Auyeung B, Baron-Cohen S, Ashwin E, Knickmeyer R, Taylor K, Hackett G (2009a) Fetal testosterone and autistic traits. *Br J Psychol* 100, 1-22
- Auyeung B, Baron-Cohen S, Ashwin E, Knickmeyer R, Taylor K, Hackett G, Hines M (2009b) Fetal testosterone predicts sexually differentiated childhood behavior in girls and in boys. *Psychol Sci* 20, 144-148
- Avila A, Vidal PM, Dear TN, Harvey RJ, Rigo JM, Nguyen L (2013) Glycine receptor $\alpha 2$ subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep* 4, 738-750

B

- Baer K, Waldvogel HJ, Faull RL, Rees MI (2009) Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. *Front Mol Neurosci* 2, 25
- Baieli S, Pavone L, Meli C, Fiumara A, Coleman M (2003) Autism and phenylketonuria. *J Autism Dev Disord* 33, 201-204
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M (1995) Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25, 63-77
- Baird TD, August GJ (1985) Familial heterogeneity in infantile autism. *J Autism Dev Disord* 15, 315-321
- Ballas N, Liou DT, Grunseich C, Mandel G (2009) Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nat Neurosci* 12, 311-317
- Barker GR, Warburton EC (2011) When is the hippocampus involved in recognition memory? *J Neurosci* 31, 10721-10731
- Barnevik-Olsson M, Gillberg C, Fernell E (2010) Prevalence of autism in children of Somali origin living in Stockholm: brief report of an at-risk population. *Dev Med Child Neurol* 52, 1167-1168
- Baron-Cohen S (2002) The extreme male brain theory of autism. *Trends Cogn Sci* 6, 248-254
- Battaglia FP, Benchenane K, Sirota A, Pennartz CM, Wiener SI (2011) The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn Sci* 15, 310-318
- Becker CM, Betz H, Schroder H (1993) Expression of inhibitory glycine receptors in postnatal rat cerebral cortex. *Brain Res* 606, 220-226
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* 18, 467-486
- Béna F, Bruno DL, Eriksson M, van Ravenswaaij-Arts C, Stark Z, Dijkhuizen T, Gerkes E, Gimelli S, Ganesamoorthy D, Thureson AC et al. (2013) Molecular and clinical characterization of 25 individuals with exonic deletions of NRXN1 and comprehensive review of the literature. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 162B, 388-403
- Benchenane K, Peyrache A, Khamassi M, Tierney PL, Gioanni Y, Battaglia FP, Wiener SI (2010) Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal-prefrontal network upon learning. *Neuron* 66, 921-936
- Benchenane K, Tiesinga PH, Battaglia FP (2011) Oscillations in the prefrontal cortex: a gateway to memory and attention. *Curr Opin Neurobiol* 21, 475-485
- Berg AT, Plioplys S (2012) Epilepsy and autism: is there a special relationship? *Epilepsy Behav* 23, 193-198
- Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D et al. (2010) Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet* 42, 489-491
- Betancur C, Sakurai T, Buxbaum JD (2009) The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci* 32, 402-412
- Betancur C (2011) Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* 1380, 42-77
- Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, Fransen van de Putte DE, Anderlid BM, Lundin J, Lapunzina P, Perez Jurado LA, Delle Chiaie B et al. (2009) Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet* 52, 77-87

- Bisgaard AM, Kirchoff M, Nielsen JE, Kibaek M, Lund A, Schwartz M, Christensen E (2009) Chromosomal deletion unmasking a recessive disease: 22q13 deletion syndrome and metachromatic leukodystrophy. *Clin Genet* 75, 175-179
- Bishop DV, Jacobs PA, Lachlan K, Wellesley D, Barnicoat A, Boyd PA, Fryer A, Middlemiss P, Smithson S, Metcalfe K et al. (2011) Autism, language and communication in children with sex chromosome trisomies. *Arch Dis Child* 96, 954-959
- Blaker-Lee A, Gupta S, McCammon JM, De Rienzo G, Sive H (2012) Zebrafish homologs of genes within 16p11.2, a genomic region associated with brain disorders, are active during brain development, and include two deletion dosage sensor genes. *Dis Model Mech* 5, 834-851
- Blasi F, Bacchelli E, Pesaresi G, Carone S, Bailey AJ, Maestrini E (2006) Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4 in individuals with autism from the IMGSA collection. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B, 220-221
- Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Purmann C, Blaszczyk K, Saeed S, Hamilton-Shield J, Clayton-Smith J, O'Rahilly S et al. (2010) Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature* 463, 666-670
- Bolton P, Macdonald H, Pickles A, Rios P, Goode S, Crowson M, Bailey A, Rutter M (1994) A case-control family history study of autism. *J Child Psychol Psychiatry* 35, 877-900
- Bolton PF, Dennis NR, Browne CE, Thomas NS, Veltman MW, Thompson RJ, Jacobs P (2001) The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q with special reference to the autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet* 105, 675-685
- Bonati MT, Russo S, Finelli P, Valsecchi MR, Cogliati F, Cavalleri F, Roberts W, Elia M, Larizza L (2007) Evaluation of autism traits in Angelman syndrome: a resource to unfold autism genes. *Neurogenetics* 8, 169-178
- Bondy AS, Frost LA (1998) The picture exchange communication system. *Semin Speech Lang* 19, 373-388; quiz 389; 424
- Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC (2004) Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429, 523-530
- Bortone D, Polleux F (2009) KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62, 53-71
- Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein DL, Takahashi N, Kajiura Y, Yang M, Katz AM, Scattoni ML et al. (2010) Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol Autism* 1, 15
- Bozdagi O, Tavassoli T, Buxbaum JD (2013) Insulin-like growth factor-1 rescues synaptic and motor deficits in a mouse model of autism and developmental delay. *Mol Autism* 4, 9
- Brown MW, Aggleton JP (2001) Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2, 51-61
- Brown MW, Barker GR, Aggleton JP, Warburton EC (2012) What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia* 50, 3122-3140
- Brugha TS, McManus S, Bankart J, Scott F, Purdon S, Smith J, Bebbington P, Jenkins R, Meltzer H (2011) Epidemiology of autism spectrum disorders in adults in the community in England. *Arch Gen Psychiatry* 68, 459-465
- Budreck EC, Scheiffele P (2007) Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci* 26, 1738-1748
- Burne T, Scott E, van Swinderen B, Hilliard M, Reinhard J, Claudianos C, Eyles D, McGrath J (2011) Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? *Mol Psychiatry* 16, 7-16
- Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR et al. (2011) Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet* 130, 517-528
- Busselberg D, Bischoff AM, Becker K, Becker CM, Richter DW (2001) The respiratory rhythm in mutant oscillator mice. *Neurosci Lett* 316, 99-102

C

- Canitano R (2007) Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 16, 61-66
- Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA (2003) Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 28, 205-211
- Carta E, Chung SK, James VM, Robinson A, Gill JL, Remy N, Vanbellinghen JF, Drew CJ, Cagdas S, Cameron D et al. (2012) Mutations in the GlyT2 gene (SLC6A5) are a second major cause of startle disease. *J Biol Chem* 287, 28975-28985
- Casanova MF, Buxhoeveden DP, Switala AE, Roy E (2002) Minicolumnar pathology in autism. *Neurology* 58, 428-432
- Centers for Disease Control (CDC) (2012) Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ* 61, 1-19
- Centonze D, Rossi S, Mercaldo V, Napoli I, Ciotti MT, De Chiara V, Musella A, Prosperetti C, Calabresi P, Bernardi G et al. (2008) Abnormal striatal GABA transmission in the mouse model for the fragile X syndrome. *Biol Psychiatry* 63, 963-973
- Chahrour M, Zoghbi HY (2007) The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422-437
- Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R (2006) The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49, 341-348
- Chao HT, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrour M, Yoo J, Neul JL, Gong S, Lu HC, Heintz N et al. (2010) Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 468, 263-269
- Chapman E, Baron-Cohen S, Auyeung B, Knickmeyer R, Taylor K, Hackett G (2006) Fetal testosterone and empathy: evidence from the empathy quotient (EQ) and the "reading the mind in the eyes" test. *Soc Neurosci* 1, 135-148
- Charman T, Baird G (2002) Practitioner review: Diagnosis of autism spectrum disorder in 2- and 3-year-old children. *J Child Psychol Psychiatry* 43, 289-305
- Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R (2001) Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327-331
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307, 1324-1328
- Chocholska S, Rossier E, Barbi G, Kehrer-Sawatzki H (2006) Molecular cytogenetic analysis of a familial interstitial deletion Xp22.2-22.3 with a highly variable phenotype in female carriers. *Am J Med Genet A* 140, 604-610
- Christian SL, Brune CW, Sudi J, Kumar RA, Liu S, Karamohamed S, Badner JA, Matsui S, Conroy J, McQuaid D et al. (2008) Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 63, 1111-1117

- Chung SK, Vanbellinghen JF, Mullins JG, Robinson A, Hantke J, Hammond CL, Gilbert DF, Freilinger M, Ryan M, Krueger MC et al. (2010) Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia. *J Neurosci* 30, 9612-9620
- Chung SK, Bode A, Cushion TD, Thomas RH, Hunt C, Wood SE, Pickrell WO, Drew CJ, Yamashita S, Shiang R et al. (2013) GLRB is the third major gene of effect in hyperekplexia. *Hum Mol Genet* 22, 927-940
- Colasante G, Collombat P, Raimondi V, Bonanomi D, Ferrai C, Maira M, Yoshikawa K, Mansouri A, Valtorta F, Rubenstein JL et al. (2008) Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons. *J Neurosci* 28, 10674-10686
- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P et al. (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704-712
- Constantino JN, Todd RD (2005) Intergenerational transmission of subthreshold autistic traits in the general population. *Biol Psychiatry* 57, 655-660
- Constantino JN, Todorov A, Hilton C, Law P, Zhang Y, Molloy E, Fitzgerald R, Geschwind D (2013) Autism recurrence in half siblings: strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Mol Psychiatry* 18, 137-138
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V et al. (2011) A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 43, 838-846
- Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, Morgan J (2007) Mapping early brain development in autism. *Neuron* 56, 399-413
- Cui Y, Jin J, Zhang X, Xu H, Yang L, Du D, Zeng Q, Tsien JZ, Yu H, Cao X (2011) Forebrain NR2B overexpression facilitating the prefrontal cortex long-term potentiation and enhancing working memory function in mice. *PLoS One* 6, e20312
- Curia G, Papouin T, Seguela P, Avoli M (2009) Downregulation of tonic GABAergic inhibition in a mouse model of fragile X syndrome. *Cereb Cortex* 19, 1515-1520

D

- Danglot L, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2004) Morphologically identified glycinergic synapses in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 27, 394-403
- Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW et al. (2011) FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 146, 247-261
- Dawson G, Rogers S, Munson J, Smith M, Winter J, Greenson J, Donaldson A, Varley J (2010) Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: the Early Start Denver Model. *Pediatrics* 125, e17-23
- Dawson G, Jones EJ, Merkle K, Venema K, Lowy R, Faja S, Kamara D, Murias M, Greenson J, Winter J et al. (2012) Early behavioral intervention is associated with normalized brain activity in young children with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 51, 1150-1159
- de Kovel CG, Trucks H, Helbig I, Mefford HC, Baker C, Leu C, Kluck C, Muhle H, von Spiczak S, Ostertag P et al. (2010) Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* 133, 23-32
- de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth HV, Kuhn RM, Ledbetter DH, Martin CL, van Ravenswaaij-Arts CM et al. (2012) Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat* (Epub ahead of print)
- Deleuze C, Alonso G, Lefevre IA, Duvoid-Guillou A, Hussay N (2005) Extrasynaptic localization of glycine receptors in the rat supraoptic nucleus: further evidence for their involvement in glia-to-neuron communication. *Neuroscience* 133, 175-183
- Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2002) Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* 36, 1051-1061
- Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, Bouteiller D, Gennetier A, Delorme R, Chaste P, Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S, Benyahia B et al. (2009) Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry* 66, 349-359
- Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SB, Guyenet PG, Kipnis J (2012) Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 484, 105-109
- Devlin B, Melhem N, Roeder K (2011) Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings. *Brain Res* 1380, 78-84
- Dichter GS, Felder JN, Bodfish JW (2009) Autism is characterized by dorsal anterior cingulate hyperactivation during social target detection. *Soc Cogn Affect Neurosci* 4, 215-226
- Doornbos M, Sikkema-Raddatz B, Ruijvenkamp CA, Dijkhuizen T, Bijlsma EK, Gijsbers AC, Hilhorst-Hofstee Y, Hordijk R, Verbruggen KT, Kerstjens-Frederikse WS et al. (2009) Nine patients with a microdeletion 15q11.2 between breakpoints 1 and 2 of the Prader-Willi critical region, possibly associated with behavioural disturbances. *Eur J Med Genet* 52, 108-115
- Dudanova I, Tabuchi K, Rohlmann A, Sudhof TC, Missler M (2007) Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation. *J Comp Neurol* 502, 261-274
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H et al. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39, 25-27

E-F

- Ekstrom AB, Hakenas-Plate L, Samuelsson L, Tulinius M, Wentz E (2008) Autism spectrum conditions in myotonic dystrophy type 1: a study on 57 individuals with congenital and childhood forms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B, 918-926
- Etherton MR, Blaiss CA, Powell CM, Sudhof TC (2009) Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 17998-18003
- Ey E, Yang M, Katz AM, Woldeyohannes L, Silverman JL, Leblond CS, Faure P, Torquet N, Le Sourd AM, Bourgeron T et al. (2012) Absence of deficits in social behaviors and ultrasonic vocalizations in later generations of mice lacking neuroligin4. *Genes Brain Behav* (Epub ahead of print)
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6, 215-229

- Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, Joseph-George AM, Mackay S, Whitten K, Noble B et al. (2010) Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet* 47, 195-203
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP (2009) DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* 84, 524-533
- Fiszman ML, Borodinsky LN, Neale JH (1999) GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 115, 1-8
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20, 43-53
- Flipsen-ten Berg K, van Hasselt PM, Eleveld MJ, van der Wijst SE, Hol FA, de Vroede MA, Beemer FA, Hochstenbach PF, Poot M (2007) Unmasking of a hemizygous WFS1 gene mutation by a chromosome 4p deletion of 8.3 Mb in a patient with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Eur J Hum Genet* 15, 1132-1138
- Folstein S, Rutter M (1977) Genetic influences and infantile autism. *Nature* 265, 726-728
- Fombonne E (2003) Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord* 33, 365-382
- Fombonne E, Zakarian R, Bennett A, Meng L, McLean-Heywood D (2006) Pervasive developmental disorders in Montreal, Quebec, Canada: prevalence and links with immunizations. *Pediatrics* 118, e139-150
- Fombonne E (2009) Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res* 65, 591-598
- Fombonne E, Quirke S, Hagen A (2011) Epidemiology of pervasive developmental disorders, In Autism Spectrum Disorders, Amaral DG, Dawson G, Geschwind DH, eds. (Oxford University Press)
- Friocourt G, Kanatani S, Tabata H, Yozu M, Takahashi T, Antypa M, Raguene O, Chelly J, Ferec C, Nakajima K et al. (2008) Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. *J Neurosci* 28, 5794-5805
- Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci* 31, 257-264
- Furuya S, Tabata T, Mitoma J, Yamada K, Yamasaki M, Makino A, Yamamoto T, Watanabe M, Kano M, Hirabayashi Y (2000) L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11528-11533

G

- Gamsiz ED, Viscidi EW, Frederick AM, Nagpal S, Sanders SJ, Murtha MT, Schmidt M, Triche EW, Geschwind DH, State MW et al. (2013) Intellectual disability is associated with increased runs of homozygosity in simplex autism. *Am J Hum Genet* 93, 103-109
- Garcia-Alcocer G, Mejia C, Berumen LC, Miledi R, Martinez-Torres A (2008) Developmental expression of glycine receptor subunits in rat cerebellum. *Int J Dev Neurosci* 26, 319-322
- Gardener H, Spiegelman D, Buka SL (2011) Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics* 128, 344-355
- Garg SK, Liou DT, Cheval H, McGann JC, Bissonnette JM, Murtha MJ, Foust KD, Kaspar BK, Bird A, Mandel G (2013) Systemic delivery of MeCP2 rescues behavioral and cellular deficits in female mouse models of Rett syndrome. *J Neurosci* 33, 13612-13620
- Gauthier J, Bonnel A, St-Onge J, Karemera L, Laurent S, Mottron L, Fombonne E, Joober R, Rouleau GA (2005) NLGN3/NLGN4 gene mutations are not responsible for autism in the Quebec population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132B, 74-75
- Gauthier J, Spiegelman D, Piton A, Lafreniere RG, Laurent S, St-Onge J, Lapointe L, Hamdan FF, Cossette P, Mottron L et al. (2009) Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B, 421-424
- Gauthier J, Champagne N, Lafreniere RG, Xiong L, Spiegelman D, Brustein E, Lapointe M, Peng H, Cote M, Noreau A et al. (2010) De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 7863-7868
- Gauthier J, Siddiqui TJ, Huashan P, Yokomaku D, Hamdan FF, Champagne N, Lapointe M, Spiegelman D, Noreau A, Lafreniere RG et al. (2011) Truncating mutations in NRXN2 and NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Hum Genet* 130, 563-573
- Gécz J, Shoubridge C, Corbett M (2009) The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. *Trends Genet* 25, 308-316
- Geschwind DH (2008) Autism: many genes, common pathways? *Cell* 135, 391-395
- Gillberg C, Cederlund M, Lamberg K, Zeijlon L (2006) Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord* 36, 429-435
- Gillott A, Furniss F, Walter A (2001) Anxiety in high-functioning children with autism. *Autism* 5, 277-286
- Gilman SR, Iossifov I, Levy D, Ronemus M, Wigler M, Vitkup D (2011) Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron* 70, 898-907
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C et al. (2010) A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* 42, 203-209
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, Filipink RA, McConnell JS, Angle B, Meschino WS et al. (2012) Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 367, 1321-1331
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP et al. (2009) Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 459, 569-573
- Goldstein S, Schwabach AJ (2004) The comorbidity of Pervasive Developmental Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: results of a retrospective chart review. *J Autism Dev Disord* 34, 329-339
- Golzio C, Willer J, Talkowski ME, Oh EC, Taniguchi Y, Jacquemont S, Raymond A, Sun M, Sawa A, Gusella JF et al. (2012) KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature* 485, 363-367
- Gomot M, Belmonte MK, Bullmore ET, Baron-Cohen S (2008) Brain hyper-reactivity to auditory novel targets in children with high-functioning autism. *Brain* 131, 2479-2488
- Gong X, Jiang YW, Zhang X, An Y, Zhang J, Wu Y, Wang J, Sun Y, Liu Y, Gao X et al. (2012) High proportion of 22q13 deletions and SHANK3 mutations in Chinese patients with intellectual disability. *PLoS One* 7, e34739
- Gotham K, Risi S, Pickles A, Lord C (2007) The Autism Diagnostic Observation Schedule: revised algorithms for improved diagnostic validity. *J Autism Dev Disord* 37, 613-627
- Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, Nations LD, Schmidt MA, Chung RH, Jaworski JM, Salyakina D, Konidari I, Whitehead PL et al. (2012) Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet* 21, 3513-3523

- Grond-Ginsbach C, Chen B, Pjontek R, Wiest T, Jiang Y, Burwinkel B, Tchatchou S, Krawczak M, Schreiber S, Brandt T et al. (2012) Copy number variation in patients with cervical artery dissection. *Eur J Hum Genet* 20, 1295-1299
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45, 727-739
- Gu W, Zhang F, Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1, 4
- Guha S, Rees E, Darvasi A, Ivanov D, Ikeda M, Bergen SE, Magnusson PK, Cormican P, Morris D, Gill M et al. (2013) Implication of a rare deletion at distal 16p11.2 in schizophrenia. *JAMA Psychiatry* 70, 253-260
- Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Layet V, Rosier A, Briault S, Bonnet-Brilhault F et al. (2009) Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry* 66, 947-956
- Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001) A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27, 322-326
- Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A (2007) Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315, 1143-1147
- Guy J, Cheval H, Selfridge J, Bird A (2011) The role of MeCP2 in the brain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 631-652

H

- Haas RH (2010) Autism and mitochondrial disease. *Dev Disabil Res Rev* 16, 144-153
- Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K et al. (2011) Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry* 68, 1095-1102
- Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin DT, Yoshizawa Y, Higashi K, Park AR, Spiegelman D, Dobrzaniecka S, Piton A et al. (2011) Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet* 88, 306-316
- Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A et al. (2009) Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet* 46, 223-232
- Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, Lingenfelter SE, Pearce BR, Lundgren J, Owen MJ et al. (2004a) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J Neurosci* 24, 5816-5826
- Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM et al. (2004b) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887
- Harvey RJ, Topf M, Harvey K, Rees MI (2008) The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends Genet* 24, 439-447
- Hashimoto K, Fujita Y, Shimizu E, Iyo M (2005) Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol. *Eur J Pharmacol* 519, 114-117
- Haverkamp S (2012) Glycine receptor diversity in the mammalian retina (Webvision, Salt Lake City, UT)
- Hehir-Kwa JY, Rodriguez-Santiago B, Vissers LE, de Leeuw N, Pfundt R, Buitelaar JK, Perez-Jurado LA, Veltman JA (2011) De novo copy number variants associated with intellectual disability have a paternal origin and age bias. *J Med Genet* 48, 776-778
- Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wassle H (2007) Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *J Comp Neurol* 500, 693-707
- Hilf RJ, Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452, 375-379
- Hinton VJ, Cyrulnik SE, Fee RJ, Batchelder A, Kiefel JM, Goldstein EM, Kaufmann P, De Vivo DC (2009) Association of autistic spectrum disorders with dystrophinopathies. *Pediatr Neurol* 41, 339-346
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K (2002) A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 4, 45-61
- Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC (2010) The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiol Dis* 38, 181-191
- Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurler ME (2010) Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genet* 6, e1001154
- Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF (2002) Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 7746-7750
- Hultman CM, Sandin S, Levine SZ, Lichtenstein P, Reichenberg A (2011) Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Mol Psychiatry* 16, 1203-1212
- Hung AY, Futai K, Sala C, Valtschanoff JG, Ryu J, Woodworth MA, Kidd FL, Sung CC, Miyakawa T, Bear MF et al. (2008) Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J Neurosci* 28, 1697-1708
- Hussman JP (2001) Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. *J Autism Dev Disord* 31, 247-248

I

- ICD-10 (1992) The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines (Geneva, World Health Organization)
- Ingason A, Kirov G, Giegling I, Hansen T, Isles AR, Jakobsen KD, Kristinsson KT, le Roux L, Gustafsson O, Craddock N et al. (2011) Maternally derived microduplications at 15q11-q13: implication of imprinted genes in psychotic illness. *Am J Psychiatry* 168, 408-417
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (1998) A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 7, 571-578
- International Schizophrenia Consortium (2008) Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 455, 237-241
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee YH, Narzisi G, Leotta A et al. (2012) De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285-299
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB et al. (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet* 98, 161-167
- Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss RM, Myers RM, Ridker PM, Chasman DI et al. (2009) Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet* 84, 148-161

J

- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9, 331-343
- Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC et al. (2006) Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* 43, 843-849
- Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F, Harewood L, Walters RG, Kutalik Z, Martinet D, Shen Y, Valsesia A, Beckmann ND et al. (2011) Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 478, 97-102
- Jakobsson M, Scholz SW, Scheet P, Gibbs JR, VanLiere JM, Fung HC, Szpiech ZA, Degnan JH, Wang K, Guerreiro R et al. (2008) Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature* 451, 998-1003
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C et al. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34, 27-29
- Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K, Granon S, Boretius S, Varoqueaux F, Ramanantsoa N, Gallego J, Ronnenberg A, Winter D et al. (2008) Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 1710-1715
- Jiang YH, Ehlers MD (2013) Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron* 78, 8-27

K

- Kabashi E, Champagne N, Brusteian E, Drapeau P (2010) In the swim of things: recent insights to neurogenetic disorders from zebrafish. *Trends Genet* 26, 373-381
- Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren ST et al. (2011) An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med* 13, 777-784
- Kanne SM, Abbacchi AM, Constantino JN (2009) Multi-informant ratings of psychiatric symptom severity in children with autism spectrum disorders: the importance of environmental context. *J Autism Dev Disord* 39, 856-864
- Kanner L (1943) Autistic disturbance of affective contact. *Nervous Child* 2, 217-250
- Kent L, Emerton J, Bhadravathi V, Weisblatt E, Pasco G, Willatt LR, McMahon R, Yates JR (2008) X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency) is associated with increased risk of attention deficit hyperactivity disorder, autism and social communication deficits. *J Med Genet* 45, 519-524
- Kielinen M, Rantala H, Timonen E, Linna SL, Moilanen I (2004) Associated medical disorders and disabilities in children with autistic disorder: a population-based study. *Autism* 8, 49-60
- Kim SH, Lord C (2010) Restricted and repetitive behaviors in toddlers and preschoolers with autism spectrum disorders based on the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS). *Autism Res* 3, 162-173
- Kim SH, Lord C (2012) New autism diagnostic interview-revised algorithms for toddlers and young preschoolers from 12 to 47 months of age. *J Autism Dev Disord* 42, 82-93
- Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC, Cheon KA, Kim SJ, Kim YK, Lee H et al. (2011) Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry* 168, 904-912
- Kirov G, Grozeva D, Norton N, Ivanov D, Mantripragada KK, Holmans P, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC (2009) Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia. *Hum Mol Genet* 18, 1497-1503
- Klassen T, Davis C, Goldman A, Burgess D, Chen T, Wheeler D, McPherson J, Bourquin T, Lewis L, Villasana D et al. (2011) Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy. *Cell* 145, 1036-1048
- Klei L, Sanders SJ, Murtha MT, Hus V, Lowe JK, Willsey AJ, Moreno-De-Luca D, Yu TW, Fombonne E, Geschwind D et al. (2012) Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Mol Autism* 3, 9
- Knickmeyer R, Baron-Cohen S, Raggatt P, Taylor K (2005) Foetal testosterone, social relationships, and restricted interests in children. *J Child Psychol Psychiatry* 46, 198-210
- Kondrashov A (2012) Genetics: The rate of human mutation. *Nature* 488, 467-468
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Wong WS et al. (2012) Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471-475
- Koshino H, Kana RK, Keller TA, Cherkassky VL, Minshew NJ, Just MA (2008) fMRI investigation of working memory for faces in autism: visual coding and underconnectivity with frontal areas. *Cereb Cortex* 18, 289-300
- Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM, Costa SS, Lisboa BC, Brentani H, Santos TM, Goncalves A, Nobrega AF, Pearson PL et al. (2012) Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res* 14, R24
- Krumm N, O'Roak BJ, Karakoc E, Mohajeri K, Nelson B, Vives L, Jacquemont S, Munson J, Bernier R, Eichler EE (2013) Transmission Disequilibrium of Small CNVs in Simplex Autism. *Am J Hum Genet* 93, 595-606
- Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH, Jr., Dobyns WB et al. (2008) Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* 17, 628-638

L

- Laje G, Morse R, Richter W, Ball J, Pao M, Smith AC (2010) Autism spectrum features in Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C, 456-462
- Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H (2002) Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* 23, 519-527
- Laumonier F, Bonnet-Brilhaut F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P et al. (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74, 552-557
- Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, Picker J (2008) Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet* 16, 614-618

- Lazoff T, Zhong L, Piperni T, Fombonne E (2010) Prevalence of pervasive developmental disorders among children at the English Montreal School Board. *Can J Psychiatry* 55, 715-720
- Le Corronc H, Rigo JM, Branchereau P, Legendre P (2011) GABA(A) receptor and glycine receptor activation by paracrine/autocrine release of endogenous agonists: more than a simple communication pathway. *Mol Neurobiol* 44, 28-52
- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR (2007) Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 39, S48-54
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58, 760-793
- Leonard H, Wen X (2002) The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8, 117-134
- Leonard H, Glasson E, Nassar N, Whitehouse A, Bebbington A, Bourke J, Jacoby P, Dixon G, Malacova E, Bower C et al. (2011) Autism and intellectual disability are differentially related to sociodemographic background at birth. *PLoS One* 6, e17875
- Levy D, Ronemus M, Yamrom B, Lee YH, Leotta A, Kendall J, Marks S, Lakshmi B, Pai D, Ye K et al. (2011) Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron* 70, 886-897
- Lichtenstein P, Carlstrom E, Rastam M, Gillberg C, Anckarsater H (2010) The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *Am J Psychiatry* 167, 1357-1363
- Lim ET, Raychaudhuri S, Sanders SJ, Stevens C, Sabo A, MacArthur DG, Neale BM, Kirby A, Ruderfer DM, Fromer M et al. (2013) Rare complete knockouts in humans: population distribution and significant role in autism spectrum disorders. *Neuron* 77, 235-242
- Lioy DT, Garg SK, Monaghan CE, Raber J, Foust KD, Kaspar BK, Hirrlinger PG, Kirchhoff F, Bissonnette JM, Ballas N et al. (2011) A role for glia in the progression of Rett's syndrome. *Nature* 475, 497-500
- Liu L, Sabo A, Neale BM, Nagaswamy U, Stevens C, Lim E, Bodea CA, Muzny D, Reid JG, Banks E et al. (2013) Analysis of rare, exonic variation amongst subjects with autism spectrum disorders and population controls. *PLoS Genet* 9, e1003443
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8, 1179-1187
- Longo N, Ardon O, Vanzo R, Schwartz E, Pasquali M (2011) Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157, 72-78
- Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 24, 659-685
- Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook EH, Jr., Leventhal BL, DiLavore PC, Pickles A, Rutter M (2000) The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord* 30, 205-223
- Lord C, Risi S, Pickles A (2004) Trajectory of Language Development in Autistic Spectrum Disorders, In *Developmental language disorders: From phenotypes to etiologies*, Rice ML, Warren SF, eds. (Mahwah, NJ, US, Lawrence Erlbaum Associates Publishers), pp. 7-29
- Lord C, Petkova E, Hus V, Gan W, Lu F, Martin DM, Ousley O, Guy L, Bernier R, Gerds J et al. (2012) A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 69, 306-313
- Losh M, Childress D, Lam K, Piven J (2008) Defining key features of the broad autism phenotype: a comparison across parents of multiple- and single-incidence autism families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B, 424-433
- Lotter V (1966) Epidemiology of autistic conditions in young children. *Soc Psychiatry* 1, 124-135
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15, 1287-1298
- Lovaas OI (1987) Behavioral treatment and normal educational and intellectual functioning in young autistic children. *J Consult Clin Psychol* 55, 3-9
- Luikenhuis S, Giacometti E, Beard CF, Jaenisch R (2004) Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6033-6038
- Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 1, e49
- Luyster R, Gotham K, Guthrie W, Coffing M, Petrak R, Pierce K, Bishop S, Esler A, Hus V, Oti R et al. (2009) The Autism Diagnostic Observation Schedule-toddler module: a new module of a standardized diagnostic measure for autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 39, 1305-1320
- Lynch JW (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56, 303-309

M

- Macarov M, Zeigler M, Newman JP, Strich D, Sury V, Tennenbaum A, Meiner V (2007) Deletions of VCX-A and NLGN4: a variable phenotype including normal intellect. *J Intellect Disabil Res* 51, 329-333
- MacArthur DG, Balasubramanian S, Frankish A, Huang N, Morris J, Walter K, Jostins L, Habegger L, Pickrell JK, Montgomery SB et al. (2012) A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science* 335, 823-828
- Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt J, Thorsen P, Olsen J, Melbye M (2002) A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *N Engl J Med* 347, 1477-1482
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *Embo J* 10, 2401-2409
- Mandel JL, Chelly J (2004) Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 12, 689-693
- Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A (2005) A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 25, 4755-4765
- Manent JB, Represa A (2007) Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *Neuroscientist* 13, 268-279
- Mangin JM, Guyon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D, Legendre P (2002) Functional glycine receptor maturation in the absence of glycinergic input in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *J Physiol* 542, 685-697
- Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P (2003) Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J Physiol* 553, 369-386

- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A et al. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747-753
- Manzke T, Niebert M, Koch UR, Caley A, Vogelgesang S, Hulsmann S, Ponimaskin E, Muller U, Smart TG, Harvey RJ et al. (2010) Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor alpha3 controls breathing in mice. *J Clin Invest* 120, 4118-4128
- Marin O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13, 107-120
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y et al. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82, 477-488
- Marshall CR, Scherer SW (2012) Detection and characterization of copy number variation in autism spectrum disorder. *Methods Mol Biol* 838, 115-135
- Matzenbach B, Maulet Y, Sefton L, Courtier B, Avner P, Guenet JL, Betz H (1994) Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant. *J Biol Chem* 269, 2607-2612
- Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 560-564
- McDonald-McGinn DM, Fahiminiya S, Revil T, Nowakowska BA, Suhl J, Bailey A, Mlynarski E, Lynch DR, Yan AC, Bilaniuk LT et al. (2013) Hemizygous mutations in SNAP29 unmask autosomal recessive conditions and contribute to atypical findings in patients with 22q11.2DS. *J Med Genet* 50, 80-90
- Mesibov GB, Shea V (2010) The TEACCH program in the era of evidence-based practice. *J Autism Dev Disord* 40, 570-579
- Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, Zheng H, Malhotra D, Jin X, Jian M, Liu G, Greer D, Bhandari A et al. (2012) Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell* 151, 1431-1442
- Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, Moeschler JB, Gropman AL, Ashwal S (2011) Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 77, 1629-1635
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ et al. (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86, 749-764
- Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK et al. (2011) Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 470, 59-65
- Mine J, Taketani T, Otsubo S, Kishi K, Yamaguchi S (2013) A 14-year-old girl with hyperekplexia having GLRB mutations. *Brain Dev* 35, 660-663
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Sudhof TC (2003) Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423, 939-948
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-955
- Mochel F, Missirian C, Reynaud R, Moncla A (2008) Normal intelligence and social interactions in a male patient despite the deletion of NLGN4X and the VCX genes. *Eur J Med Genet* 51, 68-73
- Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P et al. (2007) Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 81, 1289-1297
- Moreno-De-Luca D, Sanders SJ, Willsey AJ, Mulle JG, Lowe JK, Geschwind DH, State MW, Martin CL, Ledbetter DH (2013) Using large clinical data sets to infer pathogenicity for rare copy number variants in autism cohorts. *Mol Psychiatry* 18, 1090-1095
- Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, Hill RS, Mukaddes NM, Balkhy S, Gascon G, Hashmi A et al. (2008) Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* 321, 218-223
- Mouridsen SE, Rich B, Isager T (1999) Epilepsy in disintegrative psychosis and infantile autism: a long-term validation study. *Dev Med Child Neurol* 41, 110-114
- Mouridsen SE, Rich B, Isager T (2011) A longitudinal study of epilepsy and other central nervous system diseases in individuals with and without a history of infantile autism. *Brain Dev* 33, 361-366
- Muller E, Le-Corronc H, Legendre P (2008) Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Front Mol Neurosci* 1, 3

N-O

- Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V et al. (2012) Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485, 242-245
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305, 187-202
- Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K (2001) Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci* 21, 5139-5146
- Noebels JL (2003) The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci* 26, 599-625
- Numis AL, Major P, Montenegro MA, Muzykewicz DA, Pulsifer MB, Thiele EA (2011) Identification of risk factors for autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 76, 981-987
- O'Roak BJ, Vives L, Fu W, Egertson JD, Stanaway IB, Phelps IG, Carvill G, Kumar A, Lee C, Ankenman K et al. (2012a) Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338, 1619-1622
- O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD et al. (2012b) Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485, 246-250
- Ohnishi T, Matsuda H, Hashimoto T, Kunihiro T, Nishikawa M, Uema T, Sasaki M (2000) Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. *Brain* 123 (Pt 9), 1838-1844
- Okabe A, Kilb W, Shimizu-Okabe C, Hangaru IL, Fukuda A, Luhmann HJ (2004) Homogenous glycine receptor expression in cortical plate neurons and Cajal-Retzius cells of neonatal rat cerebral cortex. *Neuroscience* 123, 715-724
- Olmos-Serrano JL, Paluszkiwicz SM, Martin BS, Kaufmann WE, Corbin JG, Huntsman MM (2010) Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* 30, 9929-9938
- Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, Bryson S, Carver LJ, Constantino JN, Dobkins K et al. (2011) Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics* 128, e488-495

P

- Paluszkiwicz SM, Martin BS, Huntsman MM (2011) Fragile X syndrome: the GABAergic system and circuit dysfunction. *Dev Neurosci* 33, 349-364
- Park JH, Wacholder S, Gail MH, Peters U, Jacobs KB, Chanock SJ, Chatterjee N (2010) Estimation of effect size distribution from genome-wide association studies and implications for future discoveries. *Nat Genet* 42, 570-575
- Parner ET, Thorsen P, Dixon G, de Klerk N, Leonard H, Nassar N, Bourke J, Bower C, Glasson EJ (2011) A comparison of autism prevalence trends in Denmark and Western Australia. *J Autism Dev Disord* 41, 1601-1608
- Pebrel-Richard C, Debost-Légrand A, Eymard-Pierre E, Greze V, Kemeny S, Gay-Bellile M, Gouas L, Tchirkov A, Vago P, Goumy C et al. (2013) An unusual clinical severity of 16p11.2 deletion syndrome caused by unmasked recessive mutation of CLN3. *Eur J Hum Genet* (Epub ahead of print)
- Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, Lascola CD, Fu Z, Feng G (2011) Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472, 437-442
- Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST (2007) The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 109-129
- Penagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A et al. (2011) Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell* 147, 235-246
- Phelan K, McDermid HE (2012) The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol Syndromol* 2, 186-201
- Pini G, Scusa MF, Congiu L, Benincasa A, Morescalchi P, Bottiglioni I, Di Marco P, Borelli P, Bonuccelli U, Della-Chiesa A et al. (2012) IGF1 as a potential treatment for Rett syndrome: safety assessment in six Rett patients. *Autism Res Treat* 2012, 679801
- Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS et al. (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466, 368-372
- Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, Lafreniere RG, Yang Y, Henrion E, Laurent S, Noreau A, Thibodeau P, Karempera L et al. (2011) Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 16, 867-880
- Pizzarelli R, Cherubini E (2013) Developmental regulation of GABAergic signalling in the hippocampus of neuroigin 3 R451C knock-in mice: an animal model of Autism. *Front Cell Neurosci* 7, 85
- Poduri A, Lowenstein D (2011) Epilepsy genetics--past, present, and future. *Curr Opin Genet Dev* 21, 325-332
- Poultney CS, Goldberg AP, Drapeau E, Kou Y, Harony-Nicolas H, Kajiwara Y, De Rubeis S, Durand S, Stevens C, Rehnstrom K et al. (2013) Identification of Small Exonic CNV from Whole-Exome Sequence Data and Application to Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet* 93, 607-619
- Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, Sklar P (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460, 748-752

R

- Radyushkin K, Hammerschmidt K, Boretius S, Varoqueaux F, El-Kordi A, Ronnenberg A, Winter D, Frahm J, Fischer J, Brose N et al. (2009) Neuroigin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav* 8, 416-425
- Ramocki MB, Tavayev YJ, Peters SU (2010) The MECP2 duplication syndrome. *Am J Med Genet A* 152A, 1079-1088
- Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ, Dean JC (2005) Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol* 47, 551-555
- Rees MI, Lewis TM, Kwok JB, Mortier GR, Govaert P, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ (2002) Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum Mol Genet* 11, 853-860
- Rees MI, Harvey K, Ward H, White JH, Evans L, Duguid IC, Hsu CC, Coleman SL, Miller J, Baer K et al. (2003) Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J Biol Chem* 278, 24688-24696
- Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P, Beatty S, Graham GE, Armstrong L, Shiang R et al. (2006) Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet* 38, 801-806
- Reichow B, Wolery M (2009) Comprehensive synthesis of early intensive behavioral interventions for young children with autism based on the UCLA young autism project model. *J Autism Dev Disord* 39, 23-41
- Reiss J, Gross-Hardt S, Christensen E, Schmidt P, Mendel RR, Schwarz G (2001) A mutation in the gene for the neurotransmitter receptor-clustering protein gephyrin causes a novel form of molybdenum cofactor deficiency. *Am J Hum Genet* 68, 208-213
- Richler J, Bishop SL, Kleinke JR, Lord C (2007) Restricted and repetitive behaviors in young children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 37, 73-85
- Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kahler AK, Akterin S, Bergen SE, Collins AL, Crowley JJ, Fromer M et al. (2013) Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet* 45, 1150-1159
- Risi S, Lord C, Gotham K, Corsello C, Chrysler C, Szatmari P, Cook EH, Jr., Leventhal BL, Pickles A (2006) Combining information from multiple sources in the diagnosis of autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45, 1094-1103
- Ritvo ER, Freeman BJ, Mason-Brothers A, Mo A, Ritvo AM (1985) Concordance for the syndrome of autism in 40 pairs of afflicted twins. *Am J Psychiatry* 142, 74-77
- Rivet TT, Matson JL (2011) Review of gender differences in core symptomatology in autism spectrum disorders. *Res Autism Spect Dis* 5, 957-976
- Robinson EB, Lichtenstein P, Anckarsater H, Happe F, Ronald A (2013) Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 5258-5262
- Ronald A, Hoekstra RA (2011) Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156B, 255-274
- Ropers HH (2010) Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11, 161-187
- Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA, Girirajan S, Eichler EE, Shaffer LG, Ballif BC (2010) Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodev Disord* 2, 26-38
- Ross JL, Roeltgen DP, Kushner H, Zinn AR, Reiss A, Bardsley MZ, McCauley E, Tartaglia N (2012) Behavioral and social phenotypes in boys with 47,XXY syndrome or 47,XXY Klinefelter syndrome. *Pediatrics* 129, 769-778

- Rubenstein JL, Merzenich MM (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2, 255-267
- Rushforth SL, Steckler T, Shoab M (2011) Nicotine improves working memory span capacity in rats following sub-chronic ketamine exposure. *Neuropsychopharmacology* 36, 2774-2781

S

- Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, Glaze DG, German JR, Bird LM, Barbieri-Welge R, Bichell TJ, Beaudet AL, Bacino CA (2006) Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 43, 512-516
- Sahyoun CP, Belliveau JW, Soulieres I, Schwartz S, Mody M (2010) Neuroimaging of the functional and structural networks underlying visuospatial vs. linguistic reasoning in high-functioning autism. *Neuropsychologia* 48, 86-95
- Samadi SA, Mahmoodzadeh A, McConkey R (2012) A national study of the prevalence of autism among five-year-old children in Iran. *Autism* 16, 5-14
- Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta AR, Thomson SA et al. (2011) Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* 70, 863-885
- Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, DiLullo NM, Parikshak NN, Stein JL et al. (2012) De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 485, 237-241
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467
- Sato D, Lionel AC, Leblond CS, Prasad A, Pinto D, Walker S, O'Connor I, Russell C, Drmic IE, Hamdan FF et al. (2012) SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet* 90, 879-887
- Sato K, Kiyama H, Tohyama M (1992) Regional distribution of cells expressing glycine receptor alpha 2 subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res* 590, 95-108
- Scain AL, Le Corronc H, Allain AE, Muller E, Rigo JM, Meyrand P, Branchereau P, Legendre P (2010) Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci* 30, 390-403
- Scharfman HE (2007) The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7, 348-354
- Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium (2011) Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 43, 969-976
- Schmeisser MJ, Ey E, Wegener S, Bockmann J, Stempel AV, Kuebler A, Janssen AL, Udvardi PT, Shibani E, Spilker C et al. (2012) Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature* 486, 256-260
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J et al. (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445-449
- Seida JK, Ospina MB, Karkhaneh M, Hartling L, Smith V, Clark B (2009) Systematic reviews of psychosocial interventions for autism: an umbrella review. *Dev Med Child Neurol* 51, 95-104
- Selby L, Zhang C, Sun QQ (2007) Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci Lett* 412, 227-232
- Sergeeva OA, Haas HL (2001) Expression and function of glycine receptors in striatal cholinergic interneurons from rat and mouse. *Neuroscience* 104, 1043-1055
- Shaikh TH, Gai X, Perin JC, Glessner JT, Xie H, Murphy K, O'Hara R, Casalunovo T, Conlin LK, D'Arcy M et al. (2009) High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications. *Genome Res* 19, 1682-1690
- Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R et al. (2008) A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet* 40, 322-328
- Shattuck PT (2006) The contribution of diagnostic substitution to the growing administrative prevalence of autism in US special education. *Pediatrics* 117, 1028-1037
- Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgeman C, Sobeih MM, Caronna EB, Miller KJ, Frazier JA, Silverstein I, Picker J et al. (2010) Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 125, e727-735
- Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dudbridge F, Holmans PA, Whittemore AS, Mowry BJ et al. (2009) Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460, 753-757
- Shimajima K, Sugawara M, Shichiji M, Mukaida S, Takayama R, Imai K, Yamamoto T (2011) Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J Hum Genet* 56, 561-565
- Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, Pursley A et al. (2010) Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 47, 332-341
- Sigurdsson T, Stark KL, Karayiorgou M, Gogos JA, Gordon JA (2010) Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature* 464, 763-767
- Sikora DM, Pettit-Kekel K, Penfield J, Merrens LS, Steiner RD (2006) The near universal presence of autism spectrum disorders in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A* 140, 1511-1518
- Silversides CK, Lionel AC, Costain G, Merico D, Migita O, Liu B, Yuen T, Rickaby J, Thiruvahindrapuram B, Marshall CR et al. (2012) Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS Genet* 8, e1002843
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* 279, 41422-41435
- Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G (2008) Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47, 921-929
- Snow AV, Lecavalier L, Houts C (2009) The structure of the Autism Diagnostic Interview-Revised: diagnostic and phenotypic implications. *J Child Psychol Psychiatry* 50, 734-742
- Soemedi R, Wilson IJ, Bentham J, Darlay R, Topf A, Zelenika D, Cosgrove C, Setchfield K, Thornborough C, Granados-Riveron J et al. (2012) Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet* 91, 489-501
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702

- South M, Ozonoff S, McMahon WM (2005) Repetitive behavior profiles in Asperger syndrome and high-functioning autism. *J Autism Dev Disord* 35, 145-158
- Specht CG, Grunewald N, Pascual O, Rostgaard N, Schwarz G, Triller A (2011) Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *Embo J* 30, 3842-3853
- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444, 707-712
- Stankiewicz P, Kulkarni S, Dharmadhikari AV, Sampath S, Bhatt SS, Shaikh TH, Xia Z, Pursley AN, Cooper ML, Shinawi M et al. (2012) Recurrent deletions and reciprocal duplications of 10q11.21q11.23 including CHAT and SLC18A3 are likely mediated by complex low-copy repeats. *Hum Mutat* 33, 165-179
- State MW (2010) The genetics of child psychiatric disorders: focus on autism and Tourette syndrome. *Neuron* 68, 254-269
- Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietilainen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE et al. (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455, 232-236
- Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietilainen OP, Mors O, Mortensen PB et al. (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460, 744-747
- Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G, Bohman M (1989) A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry* 30, 405-416
- Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, Stephan DA, Morton DH (2006) Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med* 354, 1370-1377
- Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L, MacLean JE (1998) Genetics of autism: overview and new directions. *J Autism Dev Disord* 28, 351-368
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L et al. (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 39, 319-328

T

- Tabet AC, Pilorge M, Delorme R, Amsellem F, Pinaud JM, Leboyer M, Verloes A, Benzacken B, Betancur C (2012) Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother. *Eur J Hum Genet* 20, 540-546
- Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Sudhof TC (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318, 71-76
- Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H (1992) Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* 9, 1155-1161
- Tanaka DH, Toriumi K, Kubo K, Nabeshima T, Nakajima K (2011) GABAergic precursor transplantation into the prefrontal cortex prevents phencyclidine-induced cognitive deficits. *J Neurosci* 31, 14116-14125
- Tapia JC, Cardenas AM, Nualart F, Mentis GZ, Navarrete R, Aguayo LG (2000) Neurite outgrowth in developing mouse spinal cord neurons is modulated by glycine receptors. *Neuroreport* 11, 3007-3010
- Tapia JC, Mentis GZ, Navarrete R, Nualart F, Figueroa E, Sanchez A, Aguayo LG (2001) Early expression of glycine and GABA(A) receptors in developing spinal cord neurons. Effects on neurite outgrowth. *Neuroscience* 108, 493-506
- Tierney PL, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM, Gioanni Y (2008) Dopamine modulates temporal dynamics of feedforward inhibition in rat prefrontal cortex in vivo. *Cereb Cortex* 18, 2251-2262
- Tropea D, Giacometti E, Wilson NR, Beard C, McCurry C, Fu DD, Flannery R, Jaenisch R, Sur M (2009) Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2029-2034
- Tsai L, Stewart MA, August G (1981) Implication of sex differences in the familial transmission of infantile autism. *J Autism Dev Disord* 11, 165-173
- Tuchman R, Rapin I (2002) Epilepsy in autism. *Lancet Neurol* 1, 352-358

U-V

- Ullmann R, Turner G, Kirchoff M, Chen W, Tonge B, Rosenberg C, Field M, Vianna-Morgante AM, Christie L, Krepischi-Santos AC et al. (2007) Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* 28, 674-682
- Urraca N, Cleary J, Brewer V, Pivnick EK, McVicar K, Thibert RL, Schanen NC, Esmer C, Lampton D, Reiter LT (2013) The interstitial duplication 15q11.2-q13 syndrome includes autism, mild facial anomalies and a characteristic EEG signature. *Autism Res* 6, 268-279
- Vaags AK, Lionel AC, Sato D, Goodenberger M, Stein QP, Curran S, Ogilvie C, Ahn JW, Drmic I, Senman L et al. (2012) Rare deletions at the neurexin 3 locus in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 90, 133-141
- van Blarikom W, Tan IY, Aldenkamp AP, van Gennep AT (2006) Epilepsy, intellectual disability, and living environment: a critical review. *Epilepsy Behav* 9, 14-18
- van Blarikom W, Tan IY, Aldenkamp AP, van Gennep AT (2009) Living environment of persons with severe epilepsy and intellectual disability: a prospective study. *Epilepsy Behav* 14, 484-490
- van Bon BW, Mefford HC, Menten B, Koolen DA, Sharp AJ, Nillesen WM, Innis JW, de Ravel TJ, Mercer CL, Fichera M et al. (2009) Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *J Med Genet* 46, 511-523
- Van den Eynden J, Ali SS, Horwood N, Carmans S, Brone B, Hellings N, Steels P, Harvey RJ, Rigo JM (2009) Glycine and glycine receptor signalling in non-neuronal cells. *Front Mol Neurosci* 2, 9
- van den Pol AN (1997) GABA immunoreactivity in hypothalamic neurons and growth cones in early development in vitro before synapse formation. *J Comp Neurol* 383, 178-188
- Vann SD, Albasser MM (2011) Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 21, 440-445
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Sudhof TC, Brose N (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51, 741-754
- Veenstra-Vanderweele J, Christian SL, Cook EH, Jr. (2004) Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 379-405
- Veltman JA, Brunner HG (2010) Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes. *Nat Genet* 42, 192-193

- Veltman MW, Thompson RJ, Craig EE, Dennis NR, Roberts SE, Moore V, Brown JA, Bolton PF (2005) A paternally inherited duplication in the Prader-Willi/Angelman syndrome critical region: a case and family study. *J Autism Dev Disord* 35, 117-127
- Vincent JB, Kolozsvari D, Roberts WS, Bolton PF, Gurling HM, Scherer SW (2004) Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: no mutations in 196 autism probands. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129B, 82-84
- Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, van Lier B, Arts P, Wieskamp N, del Rosario M et al. (2010) A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 42, 1109-1112
- Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, Blencowe BJ, Geschwind DH (2011) Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* 474, 380-384
- Voineagu I (2012) Gene expression studies in autism: moving from the genome to the transcriptome and beyond. *Neurobiol Dis* 45, 69-75

W

- Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, de Smith AJ, Martinet D, Andersson J, Falchi M, Chen F, Andrieux J, Lobben S et al. (2010) A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 463, 671-675
- Wang F, Xiao C, Ye JH (2005) Taurine activates excitatory non-synaptic glycine receptors on dopamine neurones in ventral tegmental area of young rats. *J Physiol* 565, 503-516
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM et al. (2009) Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459, 528-533
- Warburton EC, Brown MW (2010) Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 48, 2262-2272
- Warren Z, McPheeters ML, Sathe N, Foss-Feig JH, Glasser A, Veenstra-Vanderweele J (2011) A systematic review of early intensive intervention for autism spectrum disorders. *Pediatrics* 127, e1303-1311
- Watanabe E, Akagi H (1995) Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord. *Neurosci Res* 23, 377-382
- Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korbel JO (2013) Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nat Rev Genet* 14, 125-138
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T et al. (2008) Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 358, 667-675
- Weiss LA, Arking DE, Daly MJ, Chakravarti A (2009) A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* 461, 802-808
- Weltzien F, Puller C, O'Sullivan GA, Paarmann I, Betz H (2012) Distribution of the glycine receptor beta-subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *J Comp Neurol* 520, 3962-3981
- Werling DM, Geschwind DH (2013) Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 26, 146-153
- Wermter AK, Kamp-Becker I, Strauch K, Schulte-Korne G, Remschmidt H (2008) No evidence for involvement of genetic variants in the X-linked neuroligin genes NLGN3 and NLGN4X in probands with autism spectrum disorder on high functioning level. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B, 535-537
- Williams JG, Higgins JP, Brayne CE (2006) Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch Dis Child* 91, 8-15
- Wing L, Gould J (1979) Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *J Autism Dev Disord* 9, 11-29
- Wong CC, Meaburn EL, Ronald A, Price TS, Jeffries AR, Schalkwyk LC, Plomin R, Mill J (2013) Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol Psychiatry* (Epub ahead of print)
- Wu JY, Kuban KC, Allred E, Shapiro F, Darras BT (2005) Association of Duchenne muscular dystrophy with autism spectrum disorder. *J Child Neurol* 20, 790-795

X-Y-Z

- Xu Q, de la Cruz E, Anderson SA (2003) Cortical interneuron fate determination: diverse sources for distinct subtypes? *Cereb Cortex* 13, 670-676
- Yan J, Oliveira G, Coutinho A, Yang C, Feng J, Katz C, Sram J, Bockholt A, Jones IR, Craddock N et al. (2005) Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Mol Psychiatry* 10, 329-332
- Ye JH, Wang F, Krnjevic K, Wang W, Xiong ZG, Zhang J (2004) Presynaptic glycine receptors on GABAergic terminals facilitate discharge of dopaminergic neurons in ventral tegmental area. *J Neurosci* 24, 8961-8974
- Ye JH (2008) Regulation of excitation by glycine receptors. *Results Probl Cell Differ* 44, 123-143
- Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT et al. (2011) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171-178
- Ylisaukko-oja T, Rehnstrom K, Auranen M, Vanhala R, Alen R, Kempas E, Ellonen P, Turunen JA, Makkonen I, Riikonen R et al. (2005) Analysis of four neuroligin genes as candidates for autism. *Eur J Hum Genet* 13, 1285-1292
- Young JW, Kerr LE, Kelly JS, Marston HM, Spratt C, Finlayson K, Sharkey J (2007) The odour span task: a novel paradigm for assessing working memory in mice. *Neuropharmacology* 52, 634-645
- Young TL, Cepko CL (2004) A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron* 41, 867-879
- Young-Pearse TL, Ivic L, Kriegstein AR, Cepko CL (2006) Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Mol Cell Biol* 26, 5728-5734
- Yu TW, Chahrouh MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, Schmitz-Abe K, Harmin DA, Adli M, Malik AN et al. (2013) Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* 77, 259-273
- Zafeiriou DI, Ververi A, Dafoulis V, Kalyva E, Vargiami E (2013) Autism spectrum disorders: the quest for genetic syndromes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 162B, 327-366
- Zhang C, Milunsky JM, Newton S, Ko J, Zhao G, Maher TA, Tager-Flusberg H, Bolliger MF, Carter AS, Boucard AA et al. (2009) A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *J Neurosci* 29, 10843-10854
- Zhang C, Atasoy D, Arac D, Yang X, Fucillo MV, Robison AJ, Ko J, Brunger AT, Sudhof TC (2010) Neurexins physically and functionally interact with GABA(A) receptors. *Neuron* 66, 403-416

Zhao X, Leotta A, Kustanovich V, Lajonchere C, Geschwind DH, Law K, Law P, Qiu S, Lord C, Sebat J et al. (2007) A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12831-12836

- Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Bryson SE, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chung BH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Cytrynbaum C, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green A, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizoi R, Kim C, Klauck SM, Kolevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougale CJ, McGrath J, McMahon WM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, **Pilorge M**, Piven J, Ponting CP, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Sequeira AF, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stein O, Sykes N, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapuram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Webber C, Weksberg R, Wing K, Wittemeyer K, Wood S, Wu J, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Devlin B, Ennis S, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Hallmayer J, Miller J, Monaco AP, Nurnberger Jr JI, Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Scherer SW, Sutcliffe JS, Betancur C (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466 (7304), 368-372 (**Article 1**)
- McInnes LA, Nakamine A, **Pilorge M**, Brandt T, Jiménez González P, Fallas M, Manghi ER, Edelmann L, Glessner J, Hakonarson H, Betancur C, Buxbaum JD (2010) A large-scale survey of the novel 15q24 microdeletion syndrome in autism spectrum disorders identifies an atypical deletion that narrows the critical region. *Mol Autism* 1 (1), 5 (**Annexe, Article 3**)
- Tabet AC, Aboura A, Gérard M, **Pilorge M**, Dupont C, Gadisseux JF, Hervy N, Pipiras E, Delahaye A, Kanafan S, Verloes A, Benzacken B, Betancur C (2010) Molecular characterization of a *de novo* 6q24.2q25.3 duplication interrupting *UTRN* in a patient with arthrogyposis. *Am J Med Genet A* 152A (7), 1781-1788
- Tabet AC, **Pilorge M**, Delorme R, Amsellem F, Pinaud JM, Leboyer M, Verloes A, Benzacken B, Betancur C (2012) Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother. *Eur J Hum Genet* 20 (5), 540-546 (**Annexe, Article 4**)
- Bozdagi O, Sakurai T, Dorr N, **Pilorge M**, Takahashi N, Buxbaum JD (2012) Haploinsufficiency of *Cyfp1* produces fragile X-like phenotypes in mice. *PLoS One* 7 (8), e42422
- Pilorge M**, Fassier C, Le Corronc H, Potey A, Bai J, Delaby E, Assouline B, Guinchat V, Devillard F, Delorme R, Nygren G, Råstam M, Meier JC, Otani S, James VM, Topf M, Dear TN, Gillberg C, Leboyer M, Giros B, Gautron S, Hazan J, Harvey RJ, Legendre P, Betancur C. Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic neurotransmission in autism (*soumis*) (**Article 2**)
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z, Vorstman JAS, Thompson A, Regan R, **Pilorge M**, Pellecchia G, Pagnamenta AT, Oliveira B, Marshall CR, Magalhaes T, Lowe JK, Howe JL, Griswold AJ, Gilbert J, Duketis E, Dombroski BA, De Jonge MV, Cuccaro M, Crawford EL, Correia CT, Conroy J, Conceição IC, Chiochetti AG, Casey J, Cai G, Cabrol C, Bolshakova N,

Bacchelli E, Anney R, Gallinger S, Cotterchio M, Casey G, Zwaigenbaum L, Wittemeyer K, Wing K, Wallace S, van Engeland H, Tryfon A, Thomson S, Soorya L, Rogé B, Roberts W, Poustka F, Mougá S, Minshew N, McInnes LA, McGrew SG, Lord C, Leboyer M, Le Couteur AS, Kolevzon A, Jiménez González P, Jacob S, Holt R, Guter S, Green J, Green A, Gillberg C, Fernandez B, Duque F, Delorme R, Dawson G, Chaste P, Café C, Brennan S, Bourgeron T, Bolton PF, Bölte S, Bernier R, Baird G, Bailey AJ, Anagnostou E, Almeida J, Wijsman EM, Vieland VJ, Vicente AM, Schellenberg GD, Pericak-Vance M, Paterson AD, Parr JR, Oliveira G, Nurnberger JI, Monaco AP, Maestrini E, Klauck SM, Hakonarson H, Haines JL, Geschwind DH, Freitag CM, Folstein SE, Ennis S, Coon H, Battaglia A, Szatmari P, Sutcliffe JS, Hallmayer J, Gill M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Gallagher L, Betancur C, Scherer SW (*soumis*)

Article 3

A large-scale survey of the novel 15q24 microdeletion syndrome in autism spectrum disorders identifies an atypical deletion that narrows the critical region

McInnes LA, Nakamine A, **Pilorge M**, Brandt T, Jiménez González P, Fallas M, Manghi ER, Edelman L, Glessner J, Hakonarson H, Betancur C, Buxbaum JD

Mol Autism (2010) 1, 5

RESEARCH

Open Access

A large-scale survey of the novel 15q24 microdeletion syndrome in autism spectrum disorders identifies an atypical deletion that narrows the critical region

L Alison McInnes^{1,2}, Alisa Nakamine^{1,3}, Marion Pilorge^{4,5,6}, Tracy Brandt², Patricia Jiménez González⁷, Marietha Fallas⁷, Elina R Manghi⁸, Lisa Edelmann^{2,11}, Joseph Glessner⁹, Hakon Hakonarson⁹, Catalina Betancur^{4,5,6}, Joseph D Buxbaum^{1,2,3,10,11*}

Abstract

Background: The 15q24 microdeletion syndrome has been recently described as a recurrent, submicroscopic genomic imbalance found in individuals with intellectual disability, typical facial appearance, hypotonia, and digital and genital abnormalities. Gene dosage abnormalities, including copy number variations (CNVs), have been identified in a significant fraction of individuals with autism spectrum disorders (ASDs). In this study we surveyed two ASD cohorts for 15q24 abnormalities to assess the frequency of genomic imbalances in this interval.

Methods: We screened 173 unrelated subjects with ASD from the Central Valley of Costa Rica and 1336 subjects with ASD from 785 independent families registered with the Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) for CNVs across 15q24 using oligonucleotide arrays. Rearrangements were confirmed by array comparative genomic hybridization and quantitative PCR.

Results: Among the patients from Costa Rica, an atypical *de novo* deletion of 3.06 Mb in 15q23-q24.1 was detected in a boy with autism sharing many features with the other 13 subjects with the 15q24 microdeletion syndrome described to date. He exhibited intellectual disability, constant smiling, characteristic facial features (high anterior hairline, broad medial eyebrows, epicanthal folds, hypertelorism, full lower lip and protuberant, posteriorly rotated ears), single palmar crease, toe syndactyly and congenital nystagmus. The deletion breakpoints are atypical and lie outside previously characterized low copy repeats (69,838-72,897 Mb). Genotyping data revealed that the deletion had occurred in the paternal chromosome. Among the AGRE families, no large 15q24 deletions were observed.

Conclusions: From the current and previous studies, deletions in the 15q24 region represent rare causes of ASDs with an estimated frequency of 0.1 to 0.2% in individuals ascertained for ASDs, although the proportion might be higher in sporadic cases. These rates compare with a frequency of about 0.3% in patients ascertained for unexplained intellectual disability and congenital anomalies. This atypical deletion reduces the minimal interval for the syndrome from 1.75 Mb to 766 kb, implicating a reduced number of genes (15 versus 38). Sequencing of genes in the 15q24 interval in large ASD and intellectual disability samples may identify mutations of etiologic importance in the development of these disorders.

* Correspondence: Joseph.Buxbaum@mssm.edu

¹Seaver Autism Center for Research and Treatment, Department of Psychiatry, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA

Background

The widespread use of genomic DNA array-based technologies to detect whole genome copy number variations (CNVs) has led to the identification of novel recurrent genomic disorders associated with syndromic or nonsyndromic intellectual disability [1]. The 15q24 microdeletion syndrome was first described by Sharp *et al.* in 2007 in four subjects sharing clinical characteristics and overlapping *de novo* deletions [2]. Phenotypic features include mild to moderate developmental delay, characteristic facial features (high anterior hairline, broad medial eyebrows, hypertelorism, downslanting palpebral fissures, broad nasal base, long smooth philtrum, and full lower lip), growth retardation, hypotonia, joint laxity, digital abnormalities and genital abnormalities [2]. The recurrent deletions, ranging from 1.7 to 3.9 Mb, result from non-allelic homologous recombination mediated by low-copy repeat (LCR, also called segmental duplication) clusters in 15q24, termed BP1, BP2 and BP3 [2]. Sharp *et al.* defined a minimal critical region between BP1 and BP2 that spanned 1.75 Mb of genomic sequence. More recently, El-Hattab *et al.* [3] reported four additional deletion cases, which implicated the same 1.75 Mb minimal critical region in the syndrome and described two other LCR clusters that mediate the formation of alternative-sized rearrangements, termed LCR 15q24A, 15q24B (BP1), 15q24C, 15q24D (BP2) and 15q24E (BP3). Three other subjects with 15q24 deletion have been reported recently, further expanding the phenotypic spectrum [4-6]. In addition, there have been four reported 15q24 duplications that involve the same LCRs and share some clinical features with cases of 15q24 microdeletion [3,7].

Genetic variants that present with developmental delay can often be associated with an autism spectrum disorder (ASD). Smith *et al.* described a girl with autism, developmental delay and mild dysmorphism carrying what was first identified as an interstitial deletion of chromosome 15q22-q23 according to fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis [8], but subsequent microarray mapping revealed to be a 15q24 deletion overlapping the genomic region identified by Sharp *et al.* [2] (Moyra Smith, personal communication). Furthermore, a recent analysis of 427 unrelated subjects with ASD reported a 15q24 *de novo* deletion in a boy with ASD, intellectual disability, severe dysmorphism, scoliosis and diaphragmatic hernia [9]. The deletion was validated by subsequent quantitative (q)PCR and karyotyping, and found to encompass 4.29 Mb.

In this study, we surveyed two ASD cohorts comprising subjects from 958 unrelated families to estimate the frequency of 15q24 deletions in ASD, and mapped 15q24 deletions in these cohorts as a means of

generating a plausible list of genes that may contribute to the phenotypes associated with the 15q24 deletion syndrome.

Methods

The study was approved under the guidelines of the Ministry of Health of Costa Rica, the ethics committee of the National Children's Hospital in San José (Hospital Nacional de Niños, HNN) and the institutional review board at Mount Sinai School of Medicine in accordance with the Declaration of Helsinki.

Subjects

Subjects were derived from two datasets: a genetic study of autism in an isolated founder population in the Central Valley of Costa Rica (CVCR) (n = 173) and the Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) cohort (n = 1336 subjects with ASD from 785 families). The CVCR study, initiated by one of the authors (LAM), including recruitment and assessment, has been described in detail previously [10,11]. This sample comprised 153 males and 20 females and all were sporadic cases (that is, only one affected child in the family). Families of individuals with a known or possible diagnosis of ASD contacted the HNN or were contacted by the Costa Rican research team (PJG, head). If they expressed interest in the study, they were formally asked to participate using established informed consent criteria. All interviews and examinations took place at the Neurodevelopmental Unit of the HNN, where parents were interviewed by an experienced pediatrician (PJG) using the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) [12], and the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) [13] was administered. Both assessments were videotaped for independent scoring by the best estimator (ERM). IQ tests appropriate for the age and level of verbal communication of the subjects were administered, as were the Vineland Adaptive Behavioral Scales [14]. A complete medical and neurological examination was performed, including a dermatological examination under Wood's lamp. Subjects were assessed for dysmorphic features and a full panel of photographs was taken for further evaluation by a clinical geneticist. Blood samples were taken from subjects and parents for DNA extraction and transformation into cell lines. The parents of patient AU008 reported here provided written informed consent for publication of clinical data, including photographs.

The AGRE cohort is a well-characterized sample that has been used in numerous studies. Recently, the AGRE cohort was genotyped and analyzed genome-wide for CNVs [15], and these data were used here to assess the frequency of 15q24 deletions. The AGRE sample

comprised 1336 subjects (1051 males, 285 females); 291 were sporadic cases and 494 were from multiplex families (two or more affected children per family).

Genotyping on oligonucleotide arrays

The CVCR sample was genotyped using *NspI* 250K arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Genotyping was carried out at the University of California Los Angeles DNA Microarray Facility, part of the NIH Neuroscience Microarray Consortium, using manufacturer-recommended procedures for probe generation and hybridization. Analysis of these microarray data for CNVs was carried out as described previously [16], using the dChip software package <https://sites.google.com/site/dchipsoft/>.

Analysis of 15q24 CNVs in the AGRE cohort was performed in a subset of subjects that had been genotyped (Infinium II HumanHap550 BeadChip, Illumina, Inc., San Diego, CA) and passed strict quality control parameters, as described in detail previously [15].

Cases with apparent deletions were confirmed with array comparative genomic hybridization (aCGH) and qPCR.

aCGH

Genomic DNA was purified using a commercial kit in accordance with the instruction manual (DNA Clean & Concentrator-5 Kit; Zymo Research, Orange, CA, USA). aCGH was performed on microarrays according to the manufacturer's instructions (Agilent SurePrint G3 Human CGH 1 × 1 M; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). In brief, 1.5 µg of experimental and gender-matched reference DNAs (Promega, Madison, WI, USA) were digested with *AluI* and *RsaI* restriction endonucleases (Promega) and fluorescently labeled with cyanine 5-dCTP (Cy-5; experimental) and cyanine 3-dCTP (Cy-3; reference) using a labeling kit (Genomic DNA Labeling Kit; Agilent Technologies). Labeled experimental and reference DNAs were purified, combined, denatured, pre-annealed with Cot-1 DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and blocking reagent (Agilent Technologies) and hybridized to the microarrays in a rotating oven (20 rpm) at 65°C for 40 hours. After hybridization and recommended washes, the arrays were scanned at 3 µm resolution with a G2505B Agilent Microarray Scanner. Images were processed with Feature Extraction 9.5.1 Software and the data analyzed with DNA Analytics 4.0 software (both from Agilent Technologies). Aberrations were identified using the Aberration Detection Method-1 algorithm with a sensitivity threshold of 6.0 and a data filter that rejected aberrations that did not include at least 10 probes with a log₂ ratio ± 0.25.

qPCR

We used the Universal Probe Library (UPL) system (Roche, NJ, USA) to perform genomic qPCR in probands with apparent deletions and their parents, as described previously [16]. Primers were designed with ProbeFinder v2.35 software (Roche, <http://www.universalprobelibrary.com>).

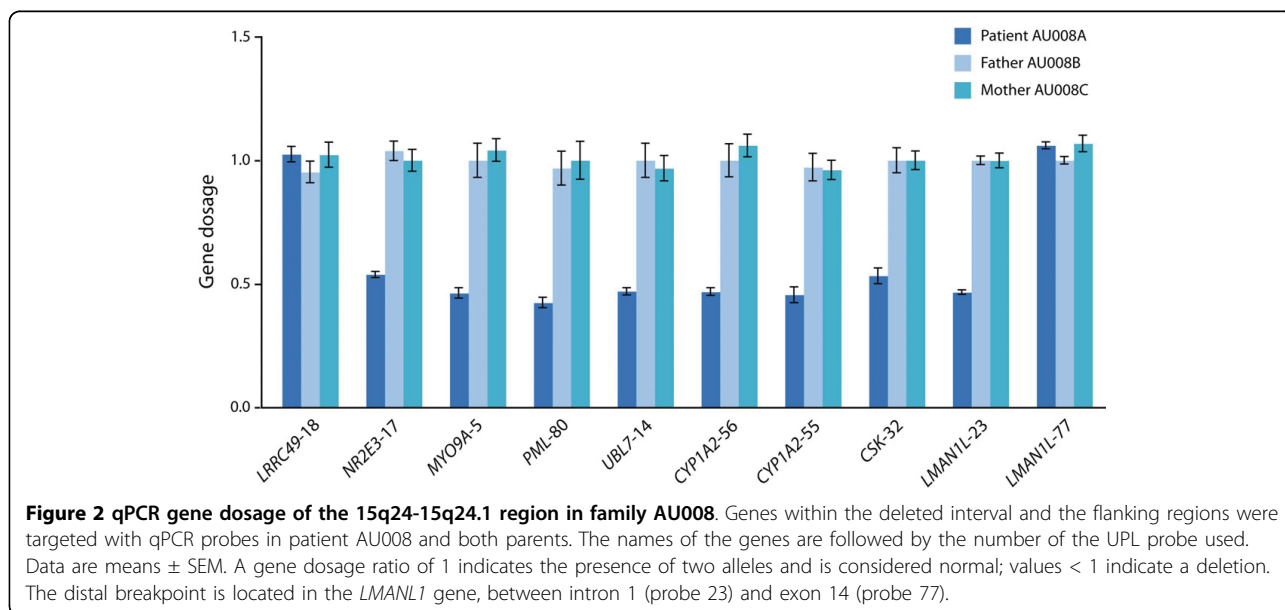
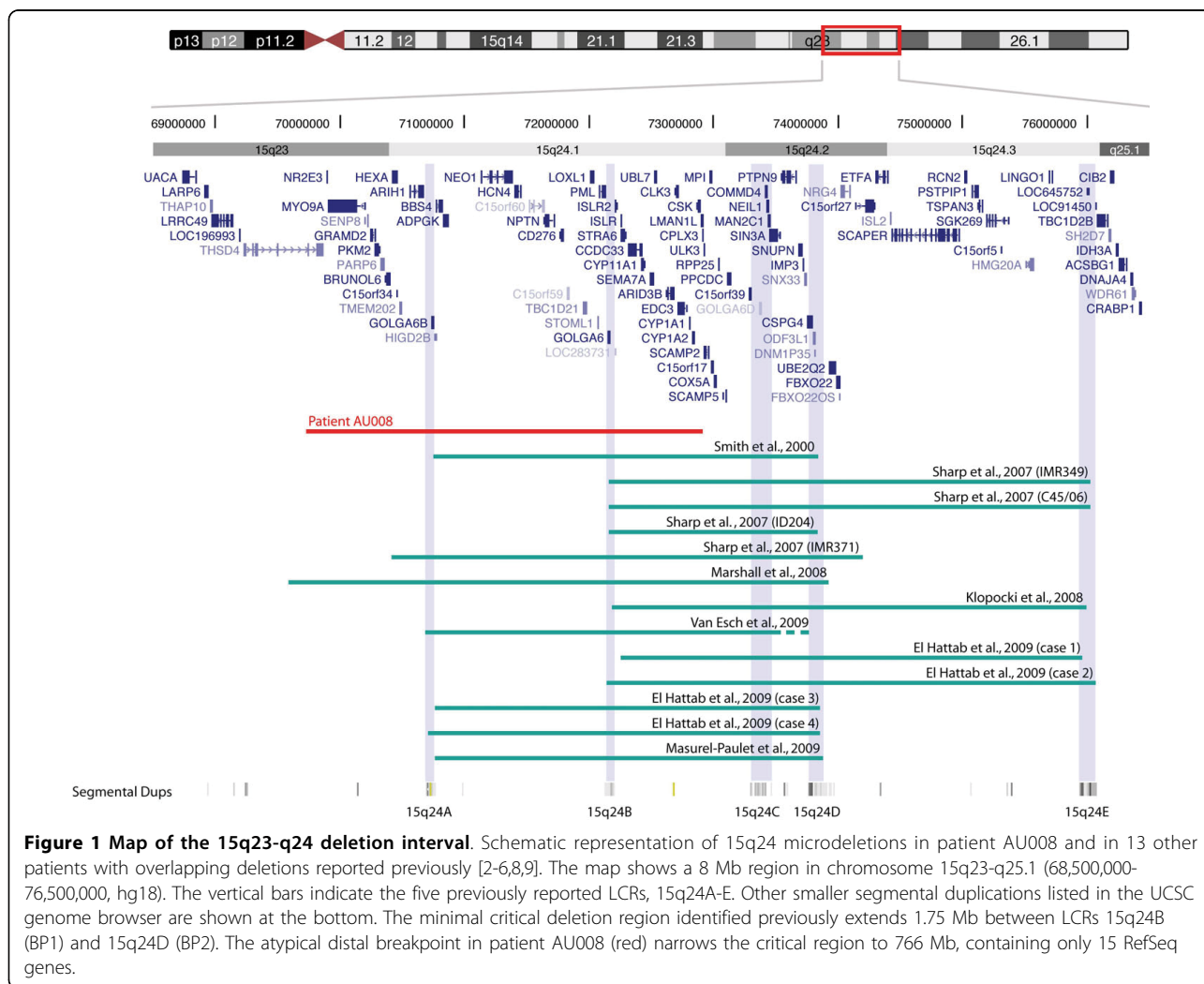
Multiplex ligation-dependent probe amplification

The methylation status of the 15q11-q13 Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome critical region was assessed by methylation-sensitive multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (ME028 PWS/AS MLPA kit; MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). The kit contains five probes to assess methylation status; four are located in *SNRPN* and one in *NDN*. Electrophoresis of PCR products was performed using an automated sequencer (ABI 3730; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). MLPA data were analyzed using GeneMarker 1.70 software (SoftGenetics, State College, PA, USA).

Results

15q24 microdeletion in a patient from the Costa Rican cohort

We screened 173 unrelated patients with ASD from Costa Rica using the Affymetrix 250K single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays and identified a deletion of the 15q23-q24.1 region in a boy with autism, moderate intellectual disability and mild dysmorphic features (patient AU008). The deletion encompassed at least 2.8 Mb (hg18, chr15:69,897,977-72,697,052), partially overlapping the minimal interval of the recurrent 15q24 microdeletion (Figure 1). Analysis of parental DNA with the 250K SNP arrays revealed that the deletion had occurred *de novo* in the paternal chromosome (data not shown). Real-time qPCR experiments confirmed the deletion in the patient and showed that the distal breakpoint was located in the *LMANL1* gene, between intron 1 (deleted) and exon 14 (normal) (Figure 2). High-resolution aCGH was performed to characterize further the extent of the deletion, revealing a 3.06 Mb loss (69,837,976-72,896,937) (Figure 3). Neither breakpoint coincides with the recently characterized LCRs in the region [2,3] or with smaller segmental duplications reported in the UCSC genome browser <http://www.genome.ucsc.edu/> (Figure 1). The distal breakpoint lies between LCR 15q24B and 15q24C. Therefore, the deletion in this patient would narrow the critical region for the novel 15q24 microdeletion syndrome from 1.75 Mb to 766 kb.



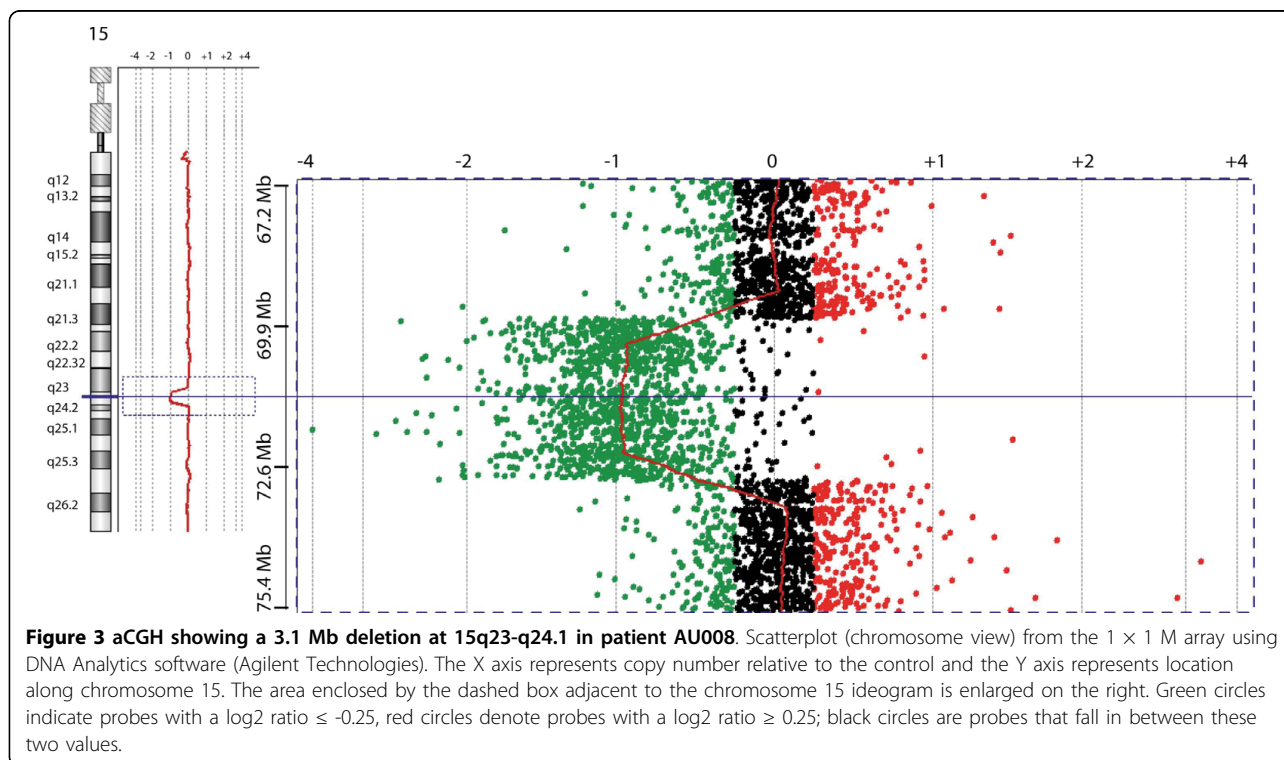


Figure 3 aCGH showing a 3.1 Mb deletion at 15q23-q24.1 in patient AU008. Scatterplot (chromosome view) from the 1 × 1 M array using DNA Analytics software (Agilent Technologies). The X axis represents copy number relative to the control and the Y axis represents location along chromosome 15. The area enclosed by the dashed box adjacent to the chromosome 15 ideogram is enlarged on the right. Green circles indicate probes with a log₂ ratio ≤ -0.25, red circles denote probes with a log₂ ratio ≥ 0.25; black circles are probes that fall in between these two values.

Clinical description of the patient with an atypical 15q24 deletion

This male child (patient AU008) was 5 years and 1 month old at the time of evaluation. Table 1 provides a summary of the clinical features in the patient compared with 13 other 15q23-q24 deletion carriers. The patient was born at term (39 weeks) to a 21-year-old G1P1 mother and a 28-year-old father. The psychiatric history of the mother's family was notable for the fact that the mother's paternal grandmother, maternal grandfather and a maternal aunt had been diagnosed with schizophrenia, and idiopathic intellectual disability had been reported in a maternal cousin. During pregnancy, polyhydramnios was detected and the mother was hospitalized for several days in the sixth month for pre-eclampsia. Labor was induced with oxytocin; it lasted 6 hours and the delivery was vaginal. At birth, the child weighed 2.46 kg (fifth percentile), was 48 cm long (25th percentile) and had a head circumference of 32 cm (fifth percentile). His Apgar scores were 9 at 1 minute and at 5 minutes after birth. He was described as an irritable baby during the perinatal period.

The child was able to support his head at 15 days, displayed a social smile at 20 days and sat by himself at 6 months. He was able to stand alone at 7 months, but did not walk alone until 30 months, and was unable to hop on one foot. Notably, the parents stated that he did not crawl because he could not tolerate contact with the

floor, and that from 1 month of age onwards, he did not want to be touched and would become stiff and throw his head back if someone lifted him in their arms. He acquired sphincter control at 36 months. He spoke his first words at 12 months but never developed phrase speech, eye contact or pointing. The patient had a maximum vocabulary of 10-20 words but stopped using words at the age of 4.5 years. At the time of evaluation, he used only two words.

His parents stated that he had a difficult temper, threw frequent tantrums, and was very restless and hyperactive. He also had difficulty falling and staying asleep. The patient could not modulate his behavior in emotional situations and displayed aggressive behaviors towards himself and/or others when happy or sad. He laughed or cried out of context, and smiled constantly no matter what his mood. He did not respond when called, did not make eye contact and did not follow instructions. He also displayed a multitude of severe restricted and repetitive behaviors. For example, he had difficulty adjusting to change of any kind in his routine or environment. He displayed stereotypies including clapping and hand flapping, and self-stimulating behaviors including spinning, hitting objects or looking at his hands for hours. He put objects in his mouth constantly. He was interested in parts of objects such as the wheels of cars and made frequent meaningless noises.

Table 1 Clinical features in Patient AU008 compared to 13 individuals with 15q24 deletions reported in the literature

	Present case	13 previously reported cases	Total (%)
Deletion 15q24			
Length, MB	3.06	1.7 to 4.3	
Inheritance	<i>De novo</i>	11 <i>de novo</i> (2 unknown)	
Parental origin	Paternal	2 paternal, 3 maternal (8 unknown)	
Gender	M	11 M, 2 F	
Behavioral abnormalities			
Developmental delay/ID	Moderate ID	13/13	14/14 (100%)
Impaired speech development	Language regression; 2 words at 5 y	7/9	8/10 (80%)
ASD	Autism	2 ASD, 1 autistic features/13	3/14 (21%)
Developmental regression	+	1/12	2/13 (15%)
Happy facial expression	Constant smiling	3/12	4/13 (31%)
Hyperactivity	+	2/12	3/13 (23%)
Aggressiveness	+	2/12	3/13 (23%)
Sleep disturbances	+	1/12	2/13 (15%)
Growth			
Low birth weight	+	4/12	5/13 (38%)
Persistent growth retardation	-	5/12	5/13 (38%)
Obesity	-	3/12	3/13 (23%)
Head circumference <3rd percentile	-	3/12	3/13 (23%)
Facial dysmorphism			
	+	13/13	14/14 (100%)
High anterior hair line	+	8/12	9/13 (69%)
Long narrow face	+	4/12	5/13 (38%)
Hypertelorism	+	7/12	8/13 (62%)
Broad medial eyebrows	+	6/12	7/13 (54%)
Epicanthus	+	6/12	7/13 (54%)
Full lower lip	+	5/12	6/13 (46%)
Widely spaced teeth	+	1/12	2/13 (15%)
Ear abnormalities	Protuberant ears	8/12	9/13 (69%)
Facial asymmetry	-	4/12	4/13 (31%)
Down-slanting palpebral fissures	-	7/12	7/13 (54%)
Deep set eyes	-	2/12	2/13 (15%)
Broad nasal base	-	4/12	4/13 (31%)
Flaring alae nasi	-	3/12	3/13 (23%)
Hypoplastic alae nasi	-	2/12	2/13 (15%)
Depressed nasal bridge	-	2/12	2/13 (15%)
Long and/or smooth philtrum	-	8/12	8/13 (62%)
Small mouth	-	3/12	3/13 (23%)
High arched palate	-	2/12	2/13 (15%)
Eye abnormalities			
	+	7/12	8/13 (62%)
Nystagmus	+	1/12	2/13 (15%)
Strabismus	-	6/12	6/13 (46%)
Microphthalmia	-	1/12	1/13 (8%)
Anisocoria	-	1/12	1/13 (8%)
Digital abnormalities			
	+	10/12	11/13 (85%)
Single palmar crease	Right single palmar crease	2/12	3/13 (23%)
Syndactyly	Left 2-3 syndactyly of toes	1/12	2/13 (15%)
Clinodactyly	-	3/12	3/13 (23%)
Long slender fingers	-	2/12	2/13 (15%)
Brachydactyly	-	2/12	2/13 (15%)
Abnormal thumbs	-	2/12	2/13 (15%)
Small hands	-	2/12	2/13 (15%)
Proximally implanted thumbs	-	2/12	2/13 (15%)

Table 1: Clinical features in Patient AU008 compared to 13 individuals with 15q24 deletions reported in the literature (Continued)

Neurological abnormalities			
CNS abnormality by MRI/CT	Minimal cortical atrophy on CT	4/7	5/8 (63%)
Hypotonia	Not reported but probable	8/12	9/13 (69%)
Seizures	-	1/12	1/13 (8%)
Genital abnormalities			
	-	8/10 M	8/11 (73%)
Hypospadias	-	4/10 M	4/11 (36%)
Micropenis	-	4/10 M	4/11 (36%)
Cryptorchidism	-	2/10 M	2/11 (18%)
Musculoskeletal abnormalities			
Scoliosis	Mild scoliosis	4/13	5/14 (36%)
Joint laxity	+	7/12	8/13 (62%)
Chest abnormalities	-	3/12	3/13 (23%)
Clubfeet	-		
Other			
Polyhydramnios	+	0/12	1/13 (8%)
Recurrent infections	Recurrent respiratory infections	6/12	7/13 (54%)
Unusual voice	-	4/12	4/13 (31%)
Diaphragmatic hernia	-	3/13	3/14 (21%)
Inguinal hernia	-	3/12	3/13 (15%)
Growth hormone deficiency	-	2/12	2/13 (15%)
Bowel atresia	-	2/12	2/13 (15%)
Hypogonadism	-	2/12	2/13 (15%)
Hearing loss	-	2/12	2/13 (15%)
Café-au-lait spots	-	2/12	2/13 (15%)

CNS, central nervous system; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging.

Evaluation for autism was carried out at 5.1 years of age. The parents were interviewed using the ADI-R and the child was tested with the ADOS module 1 for non-verbal subjects. Both tests showed that the patient fulfilled the criteria for autistic disorder. The results from the ADI-R gave a score of 29 in the reciprocal social interaction area (cut-off is 10), a score of 12 in the communication area (cut-off for non verbal subjects 7) and a score of 8 in the restricted, repetitive behavior area (cut-off 3), with an onset before 36 months (score 3, cut-off 1). On the ADOS, the patient scored 7 points in the communication area (autism cut-off 4) and 10 points in the reciprocal social interaction area (autism cut-off 7), for a total score of 17 points (autism cut-off 12). The Bayley Scales of Infant Development showed a performance IQ < 50. In the Vineland Adaptive Behavior Scales, the child obtained a score of 46 for communication, 52 for daily living skills, 48 years for socialization and 47 for motor skills; the adaptive behavior composite score was 45.

The medical history for this patient is remarkable for chronic allergic rhinitis, asthma and frequent respiratory infections. He also required hospitalization for treatment of several severe dental cavities at the age of 4 years. An

ophthalmic examination revealed congenital nystagmus. Brainstem auditory evoked potentials were normal. Computed tomography of the brain revealed minimal cortical atrophy but no other abnormalities. The child was evaluated for sinus bradycardia at 3 and 5 years, but the results of Holter monitoring were normal and there was no evidence of arrhythmias. A spinal X-ray revealed slight lumbar scoliosis but was otherwise normal. Although the patient did not present with typical Angelman features, the inappropriate laughter led us to test him for this syndrome. A 15q11-q13 deletion was ruled out by the CNV analysis. The methylation status of the Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome critical region in 15q11-q13 was assessed using methylation-sensitive MLPA and no abnormalities were observed, thus ruling out a uniparental disomy or imprinting defect. Tests were negative for the *FRAXA* mutation and there was a normal G-banded karyotype at 550-band resolution. Routine blood chemistries, full blood count, and urine analysis were also normal.

On physical examination at 5.1 years, the patient weighed 17.5 kg (30th percentile), measured 106 cm in height (21th percentile) and had a head circumference of 51 cm. He presented with a high anterior hairline,

long narrow face, broad medial eyebrows, epicanthal folds, hypertelorism, a full lower lip, widely spaced teeth, and protuberant, posteriorly rotated ears (Figure 4). The examination was otherwise notable for the presence of a right single palmar crease and partial syndactyly of the second and third toes of the left foot. He also exhibited joint laxity. All other aspects of the examination, including evaluation of the heart, abdomen, genitalia and skin, were normal.

15q24 microdeletions in the AGRE cohort

Our study in the Costa Rican cohort suggested an estimated frequency of 15q24 deletions in ASD of 1 in 173, but this was a modest sample. For this reason, follow-up studies were carried out in an independent cohort. We made use of recent CNV data from 1,336 AGRE cases (from 785 distinct families) that passed strict quality metrics for CNV calling [15]. We did not observe any large (>100 kb) deletions in this cohort across the minimal 15q24 interval as defined by Sharp *et al.* [2]. We observed and confirmed only a 108 kb deletion (73,911,628-74,020,037) at the distal (telomeric) side of the critical region, encompassing the *UBE2Q2* and *FBX022* genes, in two affected brothers, AU058-003 and AU058-004 (see Additional file 1, Figure S1A). The deletion was inherited from the healthy father (AU058-002) and was absent in the mother (AU058-001). The deletion was confirmed by qPCR (Additional file 1, Figure S1B). The segregation pattern of this microdeletion and the fact that it lies outside the critical region indicate that it is unlikely to be pathogenic.

Discussion

15q24 microdeletion syndrome

The phenotype of the 15q24 deletion is heterogeneous, but all 14 cases described to date (including the present case) have intellectual disability ranging from mild to severe, and characteristic facial features (Table 1; Additional File 2), suggesting that the 15q24 deletion phenotype may be clinically recognizable [2]. Facial characteristics include high anterior hairline, broad medial eyebrows, hypertelorism, downslanted palpebral fissures, epicanthus, long and smooth philtrum, full lower lip and abnormal ears. Other common features include minor digital anomalies (85%), impaired speech development (80%), genital abnormalities in males (73%), hypotonia (69%), eye abnormalities such as strabismus and nystagmus (62%), joint laxity (62%) and recurrent infections (54%). Less commonly reported features include low birth weight, growth hormone deficiency, diaphragmatic and inguinal hernias, scoliosis and other musculoskeletal abnormalities, bowel atresia, hearing loss and major central nervous system abnormalities (dysplastic corpus callosum with a transected pituitary

stalk, myelomeningocele with hydrocephalus and multiple cysts of the corpus callosum) [2,3,6].

In this study, we detected a 3.06 Mb *de novo* deletion of 15q24 of paternal origin in a boy with overlapping clinical features with the previously reported cases of 15q24 microdeletion, including low birth weight, developmental delay, distinct facial features, digital, eye and ear abnormalities, severely impaired language, joint laxity, scoliosis and recurrent respiratory infections. The association with nystagmus is in agreement with an earlier report [2]. Although hypotonia had never been described in the present case, he had delayed motor development, did not walk independently until 30 months and received physical therapy for 4 years, suggesting that he might have been mildly hypotonic. Our patient had no genital abnormalities, whereas hypospadias, micropenis or cryptorchidism have been reported in 8 of 10 previously reported males [2-6].

In addition, patient AU008 exhibited classic features of autism, along with constant smiling and inappropriate laughter, reminiscent of Angelman syndrome. Of the four male cases with a microdeletion of 15q24 initially reported by Sharp *et al.*, three were noted to have happy facial expressions, whereas the fourth subject was described as having 'autistiform' traits [2]. Review of the literature identified two other patients with ASD carrying 15q24 deletions, thus adding this microdeletion syndrome to the increasing list of rare genomic disorders involved in the etiology of autism. Smith *et al.* described a girl with autism carrying an interstitial deletion of chromosome 15q originally mapped by FISH to 15q22-q23 [8]. However, a recent reassessment of this patient using Affymetrix SNP 6.0 microarrays identified a 3.12 Mb deletion (70.740-73.860 Mb) between LCR15q24A and 15q24D (Moyra Smith, personal communication). The girl's phenotype was very similar to that observed in our patient; both exhibited classic autism, intellectual disability, delayed motor development and mild dysmorphic facial features. In addition, both had language regression and were nonverbal at the time of evaluation, they showed prominent mouthing behavior and they had frequent infections. The second patient with ASD carrying a 15q24 microdeletion was identified by Marshall *et al.* in a whole-genome CNV analysis, and limited clinical information was provided [9]. This child appeared to have a more severe phenotype, with severe dysmorphism, severe scoliosis and diaphragmatic hernia (see Additional File 2). The real frequency of ASD among 15q24 deletion carriers is unknown, as the majority of patients reported to date were not formally evaluated for autism. The fact that only some patients with 15q24 deletion have ASD is similar to observations in many other microdeletion and microduplication syndromes, and is part of the variable clinical presentation



Figure 4 Photographs of patient AU008 with a 15q24 microdeletion. Patient AU008 at (left) 5.1 years and (right) 8.10 years of age. Note the high anterior hairline, long narrow face, broad medial eyebrows, epicanthal folds, hypertelorism, full lower lip, widely spaced teeth and protuberant ears. Specific consent from the parents was obtained to publish these photographs.

that can be observed in these genomic disorders. Examples of where ASD can be part of the phenotype at varying rates include 15q11-q13 duplication, 22q13 deletion, Angelman, DiGeorge, Potocki-Lupski and Williams syndromes, to name but a few [17,18]. Other behavioral traits reported in 15q24 deletions include hyperactivity/attention deficit-hyperactivity disorder in two patients, aggressiveness in two and sleep difficulties in one, suggesting that this deletion may confer susceptibility to other neuropsychiatric disorders.

Although it is difficult to perform detailed genotype-phenotype correlations given the limited number of patients described to date, some observations are beginning to emerge. Notably, of the 14 cases with deletions of chromosome 15q24, 12 are males [2-6,8,9]. This distortion in the sex ratio raises the possibility that the penetrance may be influenced by the sex of the individual. Although the phenotype in the two females [3,8] does not appear to differ significantly from that observed in males (see Additional File 2), the apparently biased sex ratio is intriguing, and needs to be confirmed as additional patients are reported. Diaphragmatic hernia has been described in three patients with deletions involving the LCR15q24A-15q24B interval [2,5,9], but was not observed in patient AU008 or in four

other patients with deletions affecting the same interval [3,6,8], suggesting incomplete penetrance.

Frequency of 15q24 microdeletions in ASD

In our study of the Costa Rican sample, we observed one case of 15q24 microdeletion syndrome in 173 unrelated cases ascertained for ASDs. This corresponds to a frequency of 0.54%. This compares to a frequency of 0.23% (1/427) in the study of Marshall *et al.* and a frequency of 0% (0/785 unrelated cases) in the AGRE families. Combining these studies results in an overall frequency of 15q24 microdeletions in patients ascertained for ASD of 0.14% (2/1385). It should be noted that both the AGRE cohort [15] and the Canadian cohort [9] included large proportions of multiplex families (63% and 44%, respectively). Given that in all cases where parental samples were available, 15q24 microdeletions have been shown to be *de novo*, it is likely that rates are higher in simplex families, thus, the rate of 0.14% should be considered as a lower bound. The rates observed in samples ascertained for ASD were in the same order of 15q24 microdeletions observed in patients ascertained for unexplained intellectual disability and congenital anomalies (~0.33%; 4/1200) [2].

Parental origin of 15q24 deletions

In the three cases with ASD reported to date, the deletion arose in the paternal chromosome (the present case; the girl described by Smith *et al.* [8] (Moyra Smith, personal communication) and the case reported by Marshall *et al.* [9]). By contrast, three of the subjects described by Sharp *et al.* [2] (two with happy facial expression and one with autistic traits), carried deletions of maternal origin. Parental origin was not determined in the remaining cases. It is thus unclear at present the relevance, if any, of the gender of the parent of origin to the resultant behavioral phenotype, and more information is needed. However, it should be noted that no imprinted genes have been described in the deleted 15q23-q24 interval <http://www.geneimprint.com/>.

Atypical 15q24 microdeletion breakpoints

Breakpoints of the 15q24 microdeletions described to date are typically defined by segmental duplications, which predispose to recurrent chromosomal rearrangements via non-allelic homologous recombination [2-6]. However, both breakpoints in our patient lie outside these segmental duplications. Similarly, Marshall *et al.* [9] reported a subject with ASD carrying a deletion of 15q23-q24.2, with the proximal breakpoint lying outside the segmental duplications and within the *THSD4* gene, as in the patient described here (Figure 1), and extending distally to LCR15q24D. However, the breakpoints in *THSD4* appear to be different, at 69.60 Mb (intron 6) in the subject described by Marshall *et al.* [9] and at 69.84 Mb (intron 14) in patient AU0008. Finally, one of the patients described by Sharp *et al.* (IMR371) had an atypical 15q24 deletion (Figure 1), and precise mapping of both breakpoints and sequencing of the junction fragment revealed two unique breakpoints that were not located within repetitive sequences and had no apparent pairwise homology [2]. The presence of atypical deletions provides an important opportunity to better understand the genes in the minimal region and their relationship to phenotype.

Genes in the minimal deletion interval

Despite the varying sizes of the 15q24 deletions reported, no correlation has been observed between the extent of the deletion and clinical severity [2-6,8,9]. In fact, the phenotypic similarities between all patients suggest that haploinsufficiency of one or several genes within the minimal deletion interval are responsible for the syndrome. The molecular characterization of the atypical deletion in patient AU008 provides a considerably reduced minimal deletion interval, from 1.75 Mb to 766 kb, implicating a reduced number of genes (15 versus 38 Refseq genes). Of these genes, two have been implicated in autosomal recessive disorders.

Homozygous mutations in *STRA6* result in a multiple malformation syndrome typically associated with anophthalmia or microphthalmia [19], the latter also observed in one patient with 15q24 deletion syndrome [2]. *CYP11A1* codes for the mitochondrial cholesterol side-chain cleavage enzyme (cytochrome P450_{scc}), catalyzing the first step of steroid biosynthesis leading to production of glucocorticoids, mineralocorticoids and sex hormones. Homozygous mutations in this gene can lead to congenital adrenal insufficiency with disordered sexual differentiation [20].

In addition to *CYP11A1*, two other genes involved in metabolism, *CYP1A1* and *CYP1A2* [21], are found in the minimal interval. These genes are involved in the metabolism of endogenous and xenobiotic compounds, including caffeine, theophylline, acetaminophen, naproxen and many psychiatric drugs (see the updated list at the Indiana University Drug Interaction table <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.asp>). Careful assessment of drug dosing and sensitivity is therefore warranted in 15q24 deletion carriers. As these enzymes are also important in the metabolism of xenobiotics including environmental toxins, both increased and decreased sensitivity to such toxins might be expected (see [21] for review).

Focusing on neural expressed genes, review of the Allen Brain Atlas <http://www.brain-map.org> expression data on these genes for four brain regions (cerebellum, CB; neocortex, CTX; hippocampal formation, HPF; and amygdala, AMY) shows very high and ubiquitous staining for *UBL7* and region-specific, high levels of expression of *SEMA7A* (CB), *ARID3B* (CTX, HPF, AMY) and *CLK3* (CTX, HPF) (see Additional File 3). Of these, *SEMA7A* (semaphorin 7A), is crucial for proper axon tract formation during embryonic development [22,23] and T-cell-mediated immune function [24]. *SEMA7A* binds to plexin-C1 and to integrin- β 1 [25,26]. There is evidence from knockout mice that the effects of *SEMA7A* in axon outgrowth are mediated by integrin- β 1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathways, possibly thereby regulating the actin cytoskeleton [22]. Interestingly, another member of the semaphorin family, *SEMA5A*, was recently implicated in ASDs through gene expression studies [27] and genome-wide association studies [28].

Ingenuity pathway analysis confirmed significant association of genes in the minimal interval with several metabolic processes (drug metabolism, small molecule biochemistry, protein synthesis, lipid metabolism and vitamin and mineral metabolism; maximum *P* values 5.7×10^{-07} to 1.2×10^{-05}) driven entirely by the three CYP-family genes. One interesting finding is that *PRDM5*, which is a zinc finger protein, binds to seven genes in the interval (*GOLGA6*, *ISLR2*, *ISLR*, *CCDC33*, *UBL7*, *ARID3B* and *CLK3*) and regulates their expression [29], indicating

coordinated regulation of expression, in turn suggesting an as yet unidentified common functionality. Disruption of multiple genes in a common pathway is more likely to lead to observable phenotypes.

Conclusions

We estimate that 15q24 microdeletions are etiologically significant in $\geq \sim 0.1\%$ of patients with ASDs. The atypical breakpoints observed in our patient narrow the minimal region of overlap and identify genes for sequencing in additional patients. The 15q24 microdeletion appears to be more common in males than females (12 versus 2), and the three patients with ASD reported to date all have paternally derived deletions; these two preliminary observations deserve further investigation.

Additional file 1: Figure S1. Deletion of the *UBE2Q2* and *FBX022* genes in 15q24.2 in family au058. (a) Schematic representation of the 15q24 microdeletion identified with the Illumina 500 k SNP microarray in AGRE Family AU058. The map shows a 860 kb region in chromosome 15q24.2 (hg18 chr15: 73,540,000-74,400,000). The 108 kb deletion was present in two affected brothers (AU058-003 and AU058-004) and in their healthy father (AU058-002). The vertical bar indicates the LCR cluster 15q24D (BP2). Other smaller segmental duplications listed in UCSC are shown at the bottom. (b) The deletion was confirmed by qPCR using a probe in the *UBE2Q2* gene in the two patients and their father; the mother (AU058-001) had normal gene dosage. Data represent mean \pm SEM.

Additional file 2: Supplementary Table 1. Detailed clinical features in the present case and in 13 individuals with 15q24 deletions reported in the literature.

Additional file 3: Supplementary Table 2. Genes within the 15q24 microdeletion critical interval. Refseq genes in the minimal deletion interval defined by the atypical deletion in patient AU008.

Acknowledgements

This work was supported by NINDS (LAM, grant R01 043540), the Seaver Foundation (LAM and JDB) and a grant from the General Clinical Research Center at the Mount Sinai School of Medicine, and by the Seed Grant Program of The Charles R. Bronfman Institute for Personalized Medicine. The microarray work and analysis of the Costa Rican sample were supported by grant U24 NS 052108. We thank Safiana Katz for her careful processing of immortalized cell lines. We also thank Dr. Rafael Jimenez from the Bioethical Board and Dr. Abdon Castro, president of the Fundación Pro Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. Above all, we are grateful to the family of patient AU008, and all the other families who have participated in our study, to the Autism Parents' Association of San José, Costa Rica and to the families contributing to and supporting AGRE. We also appreciate the help of Dr. Nagahide Takahashi with qPCR experiments and Ana Tryfon and Lauren Pepa with accessing clinical data. Written consent for publication was obtained from the parents of patient AU008.

Author details

¹Seaver Autism Center for Research and Treatment, Department of Psychiatry, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA. ²Department of Genetics and Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA. ³Laboratory of Molecular Neuropsychiatry, Mount Sinai School of Medicine, New York, 10029 NY, USA. ⁴INSERM U952, 75005 Paris, France. ⁵CNRS UMR 7224, 75005 Paris, France. ⁶UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France. ⁷Hospital Nacional de Niños Dr Sáenz Herrera, CCSS, Child Developmental and Behavioral Unit, San José, Costa Rica. ⁸Department of Disability and Human Development, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60608, USA. ⁹Center for Applied Genomics,

Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA 19104, USA.

¹⁰Department of Neuroscience, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA. ¹¹The Charles R. Bronfman Institute for Personalized Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, 10029 NY, USA.

Authors' contributions

LAM, PJG and ERM were responsible for recruitment of patients from Costa Rica. PJG and MF provided the clinical work up of patient AU008A and worked with ERM and CB to prepare the description in the manuscript. LAM was responsible for the survey of CNVs in the Costa Rican families, and LAM, AN, MP, TB, LE and CB were responsible for detailed analysis of the CNV in patient AU008A. JG and HH provided extensive data on CNVs in the 15q24 region in the AGRE cohort. MP, TB, LE and CB were responsible for validating the CNVs in the AGRE families. LAM, CB and JDB were responsible for the design and analysis of experiments, and for the preparation and editing of the manuscript, tables and figures.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 November 2009 Accepted: 19 March 2010

Published: 19 March 2010

References

1. Slavotinek AM: Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet* 2008, **124**:1-17.
2. Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S, Gimelli G, Striano P, Coppola A, Regan R, Price SM, Knoers NV, Eis PS, Brunner HG, Hennekam RC, Knight SJ, de Vries BB, Zuffardi O, Eichler EE: Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet* 2007, **16**:567-572.
3. El-Hattab AW, Smolarek TA, Walker ME, Schorry EK, Immken LL, Patel G, Abbott MA, Lanpher BC, Ou Z, Kang SH, Patel A, Scaglia F, Lupski JR, Cheung SW, Stankiewicz P: Redefined genomic architecture in 15q24 directed by patient deletion/duplication breakpoint mapping. *Hum Genet* 2009, **126**:589-602.
4. Klopocki E, Graul-Neumann LM, Grieben U, Tonnies H, Ropers HH, Horn D, Mundlos S, Ullmann R: A further case of the recurrent 15q24 microdeletion syndrome, detected by array CGH. *Eur J Pediatr* 2008, **167**:903-908.
5. Van Esch H, Backx L, Pijckels E, Fryns JP: Congenital diaphragmatic hernia is part of the new 15q24 microdeletion syndrome. *Eur J Med Genet* 2009, **52**:153-156.
6. Masurel-Paulet A, Callier P, Thauvin-Robinet C, Chouchane M, Mejean N, Marle N, Mosca AL, Salem DB, Giroud M, Guibaud L, Huet F, Mugneret F, Fauriol L: Multiple cysts of the corpus callosum and psychomotor delay in a patient with a 3.1 Mb 15q24.1q24.2 interstitial deletion identified by array-CGH. *Am J Med Genet A* 2009, **149A**:1504-1510.
7. Kiholm Lund AB, Hove HD, Kirchoff M: A 15q24 microduplication, reciprocal to the recently described 15q24 microdeletion, in a boy sharing clinical features with 15q24 microdeletion syndrome patients. *Eur J Med Genet* 2008, **51**:520-526.
8. Smith M, Filipek PA, Wu C, Bocian M, Hakim S, Modahl C, Spence MA: Analysis of a 1-megabase deletion in 15q22-q23 in an autistic patient: identification of candidate genes for autism and of homologous DNA segments in 15q22-q23 and 15q11-q13. *Am J Med Genet* 2000, **96**:765-770.
9. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, et al: Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 2008, **82**:477-488.
10. McInnes LA, Gonzalez PJ, Manghi ER, Esquivel M, Monge S, Delgado MF, Fournier E, Bondy P, Castelle K: A genetic study of autism in Costa Rica: multiple variables affecting IQ scores observed in a preliminary sample of autistic cases. *BMC Psychiatry* 2005, **5**:15.
11. McInnes LA, Ouchanov L, Nakamine A, Jimenez P, Esquivel M, Fallas M, Monge S, Bondy P, Manghi ER: The *NRG1* exon 11 missense variant is not associated with autism in the Central Valley of Costa Rica. *BMC Psychiatry* 2007, **7**:21.
12. Rutter ML, LeCouteur A, Lord C: *Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R)*. Los Angeles: Western Psychological Services 2003.
13. Lord C, Rutter M, DiLavore PC, Risi S: *Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS)*. Los Angeles: Western Psychological Services 2001.

14. Carter AS, Volkmar FR, Sparrow SS, Wang JJ, Lord C, Dawson G, Fombonne E, Loveland K, Mesibov G, Schopler E: **The Vineland Adaptive Behavior Scales: supplementary norms for individuals with autism.** *J Autism Dev Disord* 1998, **28**:287-302.
15. Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, et al: **Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes.** *Nature* 2009, **459**:569-573.
16. Nakamine A, Ouchanov L, Jimenez P, Manghi ER, Esquivel M, Monge S, Fallas M, Burton BK, Szomju B, Elsea SH, Marshall CR, Scherer SW, McInnes LA: **Duplication of 17(p11.2p11.2) in a male child with autism and severe language delay.** *Am J Med Genet A* 2008, **146A**:636-643.
17. Abrahams BS, Geschwind DH: **Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology.** *Nat Rev Genet* 2008, **9**:341-355.
18. Leyfer OT, Woodruff-Borden J, Klein-Tasman BP, Fricke JS, Mervis CB: **Prevalence of psychiatric disorders in 4 to 16-year-olds with Williams syndrome.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, **141B**:615-622.
19. Chassaing N, Golzio C, Odent S, Lequeux L, Vigouroux A, Martinovic-Bouriel J, Tiziano FD, Masini L, Piro F, Maragliano G, Delezoide AL, Attié-Bitach T, Manouvrier-Hanu S, Etchevers HC, Calvas P: **Phenotypic spectrum of STRA6 mutations: from Matthew-Wood syndrome to non-lethal anophthalmia.** *Hum Mutat* 2009, **30**:E673-681.
20. Kim CJ, Lin L, Huang N, Quigley CA, AvRuskin TW, Achermann JC, Miller WL: **Severe combined adrenal and gonadal deficiency caused by novel mutations in the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc.** *J Clin Endocrinol Metab* 2008, **93**:696-702.
21. Nebert DW, Dalton TP: **The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**:947-960.
22. Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL: **Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs.** *Nature* 2003, **424**:398-405.
23. Pasterkamp RJ, Kolk SM, Hellemons AJ, Kolodkin AL: **Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration.** *BMC Dev Biol* 2007, **7**:98.
24. Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, Pasterkamp RJ, Takegahara N, Takamatsu H, Kitao T, Takagi J, Rennert PD, Kolodkin AL, Kumanogoh A, Kikutani H: **Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin.** *Nature* 2007, **446**:680-684.
25. Serini G, Bussolino F: **Common cues in vascular and axon guidance.** *Physiology (Bethesda)* 2004, **19**:348-354.
26. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM: **Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates.** *Cell* 1999, **99**:71-80.
27. Melin M, Carlsson B, Anckarsater H, Rastam M, Betancur C, Isaksson A, Gillberg C, Dahl N: **Constitutional downregulation of SEMA5A expression in autism.** *Neuropsychobiology* 2006, **54**:64-69.
28. Weiss LA, Arking DE, Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly MJ, Chakravarti A: **A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism.** *Nature* 2009, **461**:802-808.
29. Duan Z, Person RE, Lee HH, Huang S, Donadieu J, Badolato R, Grimes HL, Papayannopoulou T, Horwitz MS: **Epigenetic regulation of protein-coding and microRNA genes by the Gfi1-interacting tumor suppressor PRDM5.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:6889-6902.

doi:10.1186/2040-2392-1-5

Cite this article as: McInnes et al.: A large-scale survey of the novel 15q24 microdeletion syndrome in autism spectrum disorders identifies an atypical deletion that narrows the critical region. *Molecular Autism* 2010 **1**:5.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Supplementary Table 1. Clinical features of individuals with deletions of 15q24

	Sharp et al. (2007) IMR349	Sharp et al. (2007) C45/06	Sharp et al. (2007) ID204	Sharp et al. (2007) IMR371	Klopocki et al. (2008)	Van Esch et al. (2009) <i>De novo</i>	El-Hattab et al. (2009) Case 1
Del 15q24	72.15–76.01 Mb	72.15–76.01 Mb	72.15–73.85 Mb	70.40–74.21 Mb	72.2–75.9 Mb	70.6–73.7 Mb	72.252–75.937 Mb
Length	3.86 Mb	3.86 Mb	1.7 Mb	3.72 Mb	3.7 Mb	3.1 Mb	3.686 Mb
Inheritance	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	Unknown	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>
Parental origin	Maternal	Maternal	Unknown	Maternal	NA	NA	NA
Age	14 y	14 y	33 y	15 y	10 y	33 y	33 m
Gender	M	M	M	M	M	M	M
ASD	Autistic features	—	—	—	—	—	—
Language	Speaks well	Few words	Speaks well	Simple speech	Speech delay	Limited speech Echolalia Articulation difficulties	NA
Development	Mild MR	Mild MR	Mild MR	Mild MR	Mild MR	Severe MR	Mild delay
Happy facial expression	—	+	+	+	NA	NA	NA
Other behavior	ADHD	—	—	Sleep disturbances	NA	Hyperactivity Aggressiveness	NA
Growth	Height <P3 Low birth weight (<P3) HC <P3	Height <P3 Low birth weight (<P5) HC <P3	Height <P1 Low birth weight (<P2) HC <P3	Height P25 Weight P75 HC P50	Height P50 Truncal obesity HC P75	Tall (185 cm) Obese (94 kg) HC >P97 P (60.5 cm)	Short stature
Facial features	High anterior hair line Long narrow face	High anterior hair line Facial asymmetry	High anterior hair line Facial asymmetry	High anterior hair line Facial asymmetry Long narrow face	High anterior hair line Coarse face Full cheeks	High anterior hair line Long face Small maxilla Large mandible Full cheeks	High anterior hair line Broad forehead
Eye	Broad medial eyebrows Hypertelorism Down-slanting palpebral fissures	Broad medial eyebrows Hypertelorism Down-slanting palpebral fissures Strabismus Microphthalmia	Broad medial eyebrows Hypertelorism Down-slanting palpebral fissures Deep set eyes Epicanthus Strabismus	Broad medial eyebrows Hypertelorism Long palpebral fissures Nystagmus	Broad medial eyebrows Down-slanting palpebral fissures Periorbital fullness Deep set eyes Strabismus Astigmatism	Broad medial eyebrows Hypertelorism Down-slanting small palpebral fissures Strabismus	Sparse eye brows Epicanthus
Nose	Broad nasal base Flaring alae nasi	Broad nasal base Flaring alae nasi	Small nose Hypoplastic alae nasi	High nasal bridge Broad nasal base Flaring alae nasi	Hypoplastic nostrils	Broad nasal base	Depressed nasal bridge
Mouth	Long philtrum Full lower lip High arched palate Crowded teeth	Smooth philtrum Full lower lip	Long smooth philtrum Full lower lip	Long philtrum Full lower lip	Long smooth philtrum	Long smooth philtrum High palate Bifid uvula	Long smooth philtrum Full lower lip
Ear	Ear abnormalities Hearing loss Tinnitus	Ear abnormalities	Small everted ears	Normal ears Hearing loss	Normal appearance	Large ears	Ear lobe pit
Hands/feet	Long slender fingers Proximally implanted thumbs Sandal gap Deep plantar creases	Proximally implanted thumbs Single palmar crease	Small hands Single palmar crease Brachydactyly Syndactyly 2-3, 3-4 fingers and 2-3 toes (no MRI)	Hypoplastic right thumb Contractures of fingers Pes cavus Camptodactyly of toes (no MRI)	Broad thumbs Brachydactyly Clinodactyly Delayed carpal ossification	Long slender fingers with distal tapering Clubfeet	Small hands
Neurologic	Wide basal cisterna on brain MRI	Neonatal hypotonia Seizures Brain MRI: dysplastic corpus callosum, pituitary stalk transection, ectopic neurohypophysis, hypoplastic adenohypophysis	— (no MRI)	— (no MRI)	Hypotonia Normal brain CT	Hypotonia Delayed motor development Normal brain imaging	Hypotonia
Genital	Normal	Hypospadias	Hypospadias	Hypospadias	Micropenis Cryptorchidism	Micropenis Cryptorchidism	Normal
Musculoskeletal	Scoliosis Joint laxity	Scoliosis	Joint laxity	Joint laxity Narrow chest Valgus deformity at ankles	Joint laxity Lumbar lordosis Genua valga	Scoliosis	—
Respiratory	Recurrent ear infections	Low tone voice	Recurrent upper airway infections	Recurrent chest infections Asthma	Nasal speech Hoarse voice	High pitched voice	—
Other	Growth hormone deficiency Delayed puberty Bowel atresia Coarse hair of two different colors Hairy elbows	Edema of extremities Growth hormone deficiency Hypogonadotropic hypogonadism Bowel atresia	Feeding difficulties as a child	Diaphragmatic hernia Inguinal hernia	Inguinal and umbilical hernias Skin laxity Splenomegaly Widely spaced inverted nipples Elevated triglycerides and LDL/HDL ratio	Diaphragmatic hernia Inguinal hernias	Acute lymphoblastic leukemia Feeding difficulties Hepatomegaly

Abbreviations: ADHD, attention deficit-hyperactivity disorder; ASD, autism spectrum disorder; CT, computed tomography; F, female; HC, head circumference; ID, intellectual disability; IUGR, intrauterine growth retardation; M, male; MR, mental retardation; MRI, magnetic resonance imaging; NA, not available (not reported); P, percentile; + present; — assessed and absent; ? not assessed

Supplementary Table 1 continued

	El-Hattab et al. (2009) Case 2	El-Hattab et al. (2009) Case 3	El-Hattab et al. (2009) Case 4	Masurel-Paulet et al. (2009)	Smith et al. (2000)*	Marshall et al. (2008) SK0243-003	Present study Patient AU008
Del 15q24	72.130–76.080 Mb	70.750–73.856 Mb	70.708–73.856 Mb	70.755–73.856	70.740–73.860 Mb	69.60–73.89 Mb	69.838–72.897 Mb
Length	3.950 Mb	3.106 Mb	3.148 Mb	3.101 Mb	3.120 Mb	4.289 Mb	3.06 Mb
Inheritance	Unknown	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>
Parental origin	NA	NA	NA	NA	Paternal	Paternal	Paternal
Age	5 m	14 y	9 y	4 y	7 y	?	5 y
Gender	F	M	M	M	F	M	M
ASD	—	—	—	—	Autism	ASD	Autism
Language	NA	NA	NA	2 words only	Language regression, nonverbal	Severe delay	Language regression, nonverbal (2 words)
Development	MR	Delayed	Moderate MR	Moderate to severe MR	Severe global delay	Severe MR	Moderate MR
Happy facial expression	NA	NA	NA	—	—	—	Constant smiling
Other behavior	NA	NA	Aggressiveness	?	Chewing and mouthing behaviors	—	Hyperactive/attention deficits Sleep disturbances Aggressiveness Mouthing behavior
Growth	Short stature	Normal growth	Obesity	IUGR Height P50 Weight P10 HC P10	Normal birth weight Height P10 Weight P5 HC P50	—	Low birth weight (P5) Normal growth afterwards
Facial features	Frontal bossing Brachycephaly	Normal appearance	Facial asymmetry Round face	High anterior hair line Micrognathia	Long narrow face Pointed chin	Severe dysmorphism (no details)	High anterior hair line Long narrow face
Eye	Hypertelorism Epicanthus	Down-slanting palpebral fissures Epicanthus	Normal appearance	Sparse eyebrows Down-slanting palpebral fissures Epicanthus Hypertelorism Strabismus Anisocoria	Epicanthus Strabismus	—	Broad medial eyebrows Epicanthus Hypertelorism Congenital nystagmus
Nose	Broad upturned nasal tip	Normal appearance	Normal appearance	—	Depressed nasal bridge	—	Normal appearance
Mouth	Small mouth	Small mouth	Smooth philtrum	Long philtrum Small mouth Glossoptosis	Thin upper lip Wide dental spacing in the upper jaw Narrow anterior palate	—	Full lower lip Widely spaced teeth
Ear	Normal appearance	Thick, small ears Ear lobe pit	Cup-shaped protruding ears	Anteverted ear lobes	—	—	Protuberant ears
Hands/feet	Overriding second toes Clinodactyly Clubfeet	Long first toes and short second toes	Brachymesophalangy II and V Clinodactyly Pes planus	—	Flat nails	—	Single palmar crease Syndactyly 2-3 toes
Neurologic	Myelomeningocele Hydrocephalus	Hypotonia	Hypotonia	Hypotonia Delayed motor development Brain MRI: multiple cysts of the corpus callosum	Hypotonia Delayed motor development Regression 29 m Brisk tendon reflexes Normal brain CT	—	Brain CT: minimal cortical atrophy Delayed motor development
Genital	Normal	Hypospadias	Micropenis	Micropenis	—	—	Normal
Musculoskeletal	—	Joint laxity Pectus carinatum	Joint laxity	Kyphosis	Pectus excavatum Lax fingers	Severe scoliosis	Mild scoliosis Joint laxity
Respiratory	—	Recurrent ear infections Velo-pharyngeal insufficiency Soft nasal speech	Recurrent ear infections	—	Frequent infections	—	Recurrent respiratory infections Asthma Chronic allergic rhinitis
Other	Tetralogy of Fallot	Café au lait spots Feeding difficulties	Café au lait spots Acanthosis nigricans	—	Light skin, hair and eyes	Diaphragmatic hernia	Polyhydramnios

* The deletion reported by Smith et al. (2002) was originally mapped by FISH to 15q22-q23, but subsequent analysis using Affymetrix SNP 6.0 microarrays revealed a 15q24 deletion (Moyra Smith, personal communication)

Supplementary Table 2. Genes within the 15q24 microdeletion critical interval

Gene ID	Gene name	Start (hg 18 coordinates)	End	Associated human disease	Brain expression			
					CB	CTX	HPF	AMY
<i>GOLGA6</i>	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 6	72 149 251	72 161 944		ND	ND	ND	ND
<i>ISLR2</i>	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2	72 208 768	72 216 196		4.1	3.6	18.1	1.4
<i>ISLR</i>	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	72 253 140	72 256 265		11.4	3.0	9.4	2.9
<i>STRA6</i>	Stimulated by retinoic acid gene 6 homolog	72 273 784	72 288 424	Homozygous mutations result in a multiple malformation syndrome with anophthalmia	7.1	1.2	5.4	3.4
<i>CCDC33</i>	Coiled-coil domain containing 33	72 315 720	72 415 535		ND	ND	ND	ND
<i>CYP11A1</i>	Cytochrome P450, subfamily XIA, polypeptide 1	72 417 156	72 447 134	Homozygous mutations result in congenital adrenal insufficiency with 46,XY sex reversal	2.7	5.6	3.2	1.8
<i>SEMA7A</i>	Semaphorin 7A	72 488 684	72 513 352		72.0	16.9	8.8	0.5
<i>UBL7</i>	Ubiquitin-like 7	72 525 371	72 540 563		100	100	100	100
<i>ARID3B</i>	AT rich interactive domain 3B	72 620 601	72 677 525		13.3	73.1	42.3	45.8
<i>CLK3</i>	CDC-like kinase 3	72 687 766	72 709 595		25.1	53.2	53.7	17.4
<i>EDC3</i>	Enhancer of mRNA decapping 3	72 709 953	72 775 439		100	32.8	17.1	0
<i>CYP1A1</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	72 798 936	72 804 930		0.9	0.9	1.3	0.4
<i>CYP1A2</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	72 828 237	72 835 994		6.7	9.1	6.2	6.0
<i>CSK</i>	c-src tyrosine kinase	72 861 478	72 882 592		15.4	13.8	19.5	15.5
<i>LMAN1L</i>	Lectin, mannose-binding, 1 like	72 892 247	72 905 152		9.8	9.9	8.6	0.8

Mouse brain expression values were derived from the Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>) and reflect average expression levels over a particular region normalized to 'maximum possible expression' (which is in turn derived from a set of ubiquitously expressed genes). Qualitatively similar results were observed using expression density (defined as the number of expressing cells in a given region normalized to the maximum possible number of expressing cells in the same region, again derived from a set of ubiquitous genes in that region). Abbreviations: CB, cerebellum; CTX, neocortex; HPF, hippocampal formation; AMY, amygdala; ND, not detected.

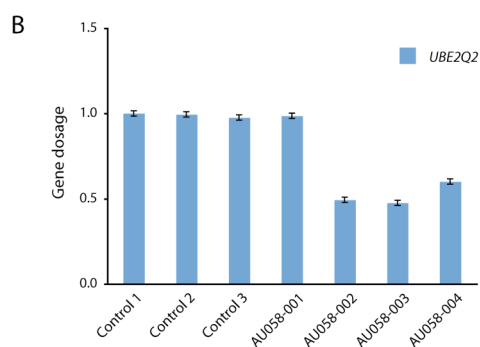
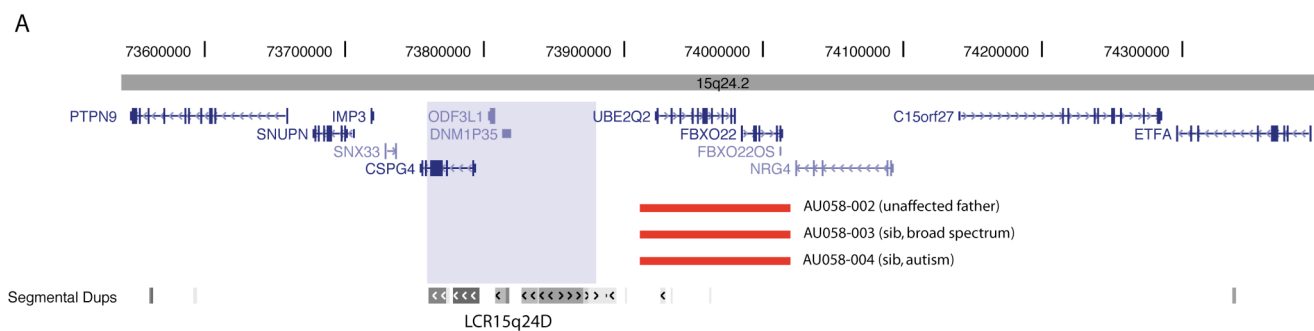


Figure S1. Deletion of the *UBE2Q2* and *FBXO22* genes in 15q24.2 in family AU058. (a) Schematic representation of the 15q24 microdeletion identified with the Illumina 500 k SNP microarray in AGRE Family AU058. The map shows a 860 kb region in chromosome 15q24.2 (hg18 chr15: 73,540,000-74,400,000). The 108 kb deletion was present in two affected brothers (AU058-003 and AU058-004) and in their healthy father (AU058-002). The vertical bar indicates the LCR cluster 15q24D (BP2). Other smaller segmental duplications listed in UCSC are shown at the bottom. **(b)** The deletion was confirmed by qPCR using a probe in the *UBE2Q2* gene in the two patients and their father; the mother (AU058-001) had normal gene dosage. Data represent mean ± SEM.

Article 4

Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother

Tabet AC, **Pilorge M**, Delorme R, Amsellem F, Pinard JM, Leboyer M, Verloes A, Benzacken B, Betancur C

Eur J Hum Genet (2012) 20, 540-546

ARTICLE

Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother

Anne-Claude Tabet^{1,2,3,4}, Marion Pilorge^{2,3,4}, Richard Delorme^{5,6}, Frédérique Amsellem^{5,6}, Jean-Marc Pinard⁷, Marion Leboyer^{6,8,9}, Alain Verloes¹⁰, Brigitte Benzacken^{1,11,12} and Catalina Betancur^{x,2,3,4}

The pericentromeric region of chromosome 16p is rich in segmental duplications that predispose to rearrangements through non-allelic homologous recombination. Several recurrent copy number variations have been described recently in chromosome 16p. 16p11.2 rearrangements (29.5–30.1 Mb) are associated with autism, intellectual disability (ID) and other neurodevelopmental disorders. Another recognizable but less common microdeletion syndrome in 16p11.2p12.2 (21.4 to 28.5–30.1 Mb) has been described in six individuals with ID, whereas apparently reciprocal duplications, studied by standard cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization techniques, have been reported in three patients with autism spectrum disorders. Here, we report a multiplex family with three boys affected with autism, including two monozygotic twins carrying a *de novo* 16p11.2p12.2 duplication of 8.95 Mb (21.28–30.23 Mb) characterized by single-nucleotide polymorphism array, encompassing both the 16p11.2 and 16p11.2p12.2 regions. The twins exhibited autism, severe ID, and dysmorphic features, including a triangular face, deep-set eyes, large and prominent nasal bridge, and tall, slender build. The eldest brother presented with autism, mild ID, early-onset obesity and normal craniofacial features, and carried a smaller, overlapping 16p11.2 microdeletion of 847 kb (28.40–29.25 Mb), inherited from his apparently healthy father. Recurrent deletions in this region encompassing the *SH2B1* gene were recently reported in early-onset obesity and in individuals with neurodevelopmental disorders associated with phenotypic variability. We discuss the clinical and genetic implications of two different 16p chromosomal rearrangements in this family, and suggest that the 16p11.2 deletion in the father predisposed to the formation of the duplication in his twin children.

European Journal of Human Genetics (2012) 20, 540–546; doi:10.1038/ejhg.2011.244; published online 11 January 2012

Keywords: duplication 16p11.2p12.2; deletion 16p11.2; autism; intellectual disability; *SH2B1*; SNP array

INTRODUCTION

Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders characterized by impairments in social communication and by restricted and stereotyped behaviors and interests, with an onset in the first 3 years of life and a sex ratio heavily skewed towards males (4:1). ASD are etiologically heterogeneous.¹ About 10–20% of individuals have an identified genetic etiology, including chromosomal rearrangements, Mendelian disorders (eg, fragile X syndrome, tuberous sclerosis, Rett syndrome), rare mutations in synaptic genes (eg, *NLGN4X*, *SHANK3*, *SHANK2*), and copy number variations (CNVs). Microscopically visible chromosomal aberrations are observed in about 5% of individuals with autism.² The most frequent cytogenetic abnormality is maternal duplication 15q11q13; other recurrent abnormalities include deletions of 2q37, 22q11.2 and 22q13. Some of these recurrent rearrangements arise through non allelic homologous recombination (NAHR) between paired segmental duplications.³

As the short arm of chromosome 16 is rich in intrachromosomal segmental duplications, several microdeletion and microduplication syndromes have been described arising through NAHR. Recurrent ~600 kb deletions and duplications in the 16p11.2 region (29.5–30.1 Mb) are associated with a wide spectrum of neurobehavioral abnormalities, including ASD, intellectual disability (ID), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), seizures and schizophrenia.^{4–9} Dysmorphic features and congenital anomalies are also observed frequently.^{6,7} In addition, 16p11.2 deletions and duplications increase the risk of obesity and being underweight, respectively.^{10,11} Another microdeletion syndrome in 16p11.2p12.2 involving a ~7–9 Mb region (with a common distal breakpoint at 21.4 Mb and proximal breakpoints varying between 28.5 and 30.1 Mb) was identified recently in six patients with common dysmorphic features and developmental delay without autism.^{12–14} Three patients carrying a 16p11.2p12.2 duplication had been described earlier,^{15,16} but as these cases were

¹AP-HP, Robert Debré Hospital, Department of Genetics, Cytogenetics Unit, Paris, France; ²Inserm U952, Paris, France; ³CNRS UMR 7224, Paris, France; ⁴Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris, France; ⁵AP-HP, Robert Debré Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, Paris, France; ⁶INSERM U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Psychiatric Genetics, Créteil, France; ⁷AP-HP, Raymond Poincaré Hospital, Pediatric Neurology Unit, Garches, France; ⁸AP-HP, Henri Mondor-Albert Chenevier Hospital, Department of Psychiatry, Créteil, France; ⁹University Paris-Est Créteil, Faculty of Medicine, Créteil, France; ¹⁰AP-HP, Robert Debré Hospital, Department of Genetics, Clinical Unit, Paris, France; ¹¹Inserm U676, Paris, France; ¹²AP-HP, Jean Verdier Hospital, Cytogenetics Unit, Bondy, France

*Correspondence: Dr C Betancur, INSERM U952, Université Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France. Tel: +33 1 44 27 61 19; fax: +33 1 44 27 60 69; E-mail: Catalina.Betancur@inserm.fr

Received 23 May 2011; revised 4 October 2011; accepted 23 November 2011; published online 11 January 2012

studied by standard cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques, it is difficult to prove that they are the reciprocal duplication product of the 16p11.2p12.2 microdeletion syndrome. The three patients had ASD and short stature, but only one had ID and dysmorphic features.^{15,16} A 16p11.2p12.2 duplication identified prenatally was also reported.¹⁷ Thus, the phenotype of the 16p11.2p12 duplication is not well defined.

Here, we report a multiplex family with three boys with autism, including two monozygotic twins with severe ID and dysmorphic features carrying a *de novo* 16p11.2p12.2 duplication encompassing both the region implicated in the 16p11.2p12 microdeletion syndrome and the 16p11.2 region predisposing to ASD. The eldest brother carried a smaller, overlapping paternally-inherited microdeletion in the distal 16p11.2 region recently involved in early-onset obesity.¹⁸ We present the phenotype, cytogenetic and molecular findings in the three patients and discuss the genetic heterogeneity observed in this multiplex family.

CLINICAL REPORTS

Patient 1

Patient 1 is a 21-year-old male, the first child of non-consanguineous parents. The father is Caucasian, the mother is from Mauritius. The father declined neuropsychological evaluation but was described by his wife as being non talkative, introverted and having few social relationships. One of his brothers (among 10 sibs) had severe ID with epilepsy; he died at age 42; no further details were available. The maternal personal and family history was negative.

This boy was born at 41 weeks after an uneventful pregnancy; prolonged labor required the use of forceps. Birth weight was 3450 g (44th centile), length 51 cm (65th centile), and occipitofrontal circumference (OFC) 36 cm (54th centile). Apgar scores were 6 and 10 at 1 and 5 min, respectively. Early development was normal; he walked at 15 months. He had gastroesophageal reflux and was operated for adenoidectomy and orchidopexy during childhood. The parents reported hyperactivity, motor stereotypies (flapping) and noise intolerance at the age of 2 years. Speech was severely delayed, with first words at 10 years. At 4 years, he was diagnosed with autism based on DSM-IV criteria. He met criteria for autism on the Autism Diagnostic Interview-Revised. (Supplementary Table 1 shows the scores of the behavioral evaluations in the three siblings.) Obesity appeared in childhood; at 7 years 6 months, he was 135 cm tall and weighed 37.6 kg (body mass index (BMI) 20.6, >97th centile). He attended a special school where he acquired basic skills in reading and writing. At 16 years, his IQ was 47.

When examined at the age of 19, he was 187 cm tall (+2.5 SD), weighed 91.5 kg (+4 SD) and had an OFC of 58.5 cm (+1.5 SD). He had mild troncular obesity (BMI 26), and some unusual facial features

(deep-set eyes, thick supra-orbital ridge with thick eyebrows, wide and prominent nasal bridge, receding chin and everted lower lip), which were difficult to assess considering his mixed ethnic background (Figure 1a). He had extensive acanthosis nigricans, mainly in the neck, axillae, and groin. Neurological examination was normal. His expressive language remained limited to restrictive sentences, mostly dyssyntactic, equivalent to a developmental age of 4 years.

Karyotype, fragile X testing, telomere analysis by multiplex ligation probe amplification and metabolic screening (amino acids, mucopolysaccharides, organic acids, and uric acid) were normal. Brain MRI performed at 5 years was normal. At 12 years, sleep polysomnography to explore difficulties to fall asleep showed temporo-occipital and temporo-parietal hypersynchrony with rapid rhythmic waves, but no significant epileptic event.

Patient 2

Patient 2 was born at term from a monozygotic, monoamniotic twin pregnancy. Birth weigh was 2450 g (4th centile), length 47 cm (13th centile) and OFC 33 cm (9th centile), with Apgar scores of 10 at 1 and 5 min. A small ventricular septal defect was diagnosed in the neonatal period and closed spontaneously. He wore glasses for myopia and strabismus since the first months of life. Recurrent ear, nose, and throat infections required adenoidectomy. Early development was considered normal, with walking at 15 months and first words before age 2. However, verbal communication and social interaction vanished completely in 4 months after the 26th month. Frequent outbursts and stereotypies such as auditory self-stimulation started at that time. At 3 years of age, he was diagnosed with autism, according to DSM-IV criteria. He also met criteria for autism on the Autism Diagnostic Interview-Revised. His behavioral difficulties made long-term schooling impossible until he was 14 years old, when he entered an inpatient clinic. Additional psychiatric evaluations were conducted at 18 years. The patient remained severely handicapped; he was not fully toilet-trained and required assistance for most basic needs, but was able to feed and dress himself. He was non-verbal, but had acquired basic communication skills using pictograms. Assessment with the Autism Diagnostic Observation Schedule was difficult because of hyperactivity but confirmed the diagnosis of autism. He was unable to complete the Raven's Colored Progressive Matrices test. The scores on the Vineland Adaptive Behavior Scales II indicated severe to profound ID. Sleep difficulties, hyperactivity, and impulsivity were treated with melatonin and risperidone.

When examined at 17 years of age, he was 173 cm tall (mean), weighed 49 kg (-2 SD) and had an OFC of 55 cm (-1 SD). He had a triangular face, with broad forehead and prominent orbital ridge (Figure 1b). The eyebrows were thick on the outer part, with a marked upslant; the eyes were deep set, the palpebral fissures were



Figure 1 Photos of patients 1–3. (a) Patient 1, showing some unusual facial features (deep-set eyes, thick supra-orbital ridge with thick eyebrows, wide and prominent nasal bridge, receding chin and everted lower lip). (b, c) Patient 2 (left) and 3 (right); note similar dysmorphic features with hypertelorism, upslanting palpebral fissures, broad nasal bridge and tip, everted lower lip and retrognathia with marked chin. (d) Sternum deformity in patient 2 (also present in his twin brother).

wide, almond shaped and upslanted and he had alternating strabismus. The nose had a prominent and large bridge, a wide, bulbous tip, and anteverted nares. The philtrum was tented, with a wide philtral groove and a wide cupid's bow, a thin vermillion border and everted lower lip. There was marked overbite and retrognathia despite the presence of a marked chin. The ears were tilted backward. He had a very slender habitus, poor muscle mass in limbs, hypotrophic thenar muscles, cubitus valgus, and mild scoliosis. An asymmetric sternal deformity was noted, with increased Louis angle, bulge of the upper part of the sternum, and depression of the lower part (Figure 1d). He had long fingers and toes, with hypermobile small joints, bilateral single palmar creases and sandal gap. Acanthosis nigricans was present in the neck. Neurological examination was normal, except for absent knee, bicipital and achillean reflexes, and pes cavus, without pyramidal signs. Further evaluations to rule out a peripheral neuropathy could not be performed because of non-compliance.

High-resolution karyotype showed an interstitial duplication on chromosome 16p. Fragile X testing, uric, lactic and pyruvic acid, plasma organic acids and amino acids were all normal except for isolated increase in cysteine in the latter. Brain MRI at 30 months showed white matter hyperintensities with moderate cortical atrophy and thin corpus callosum. An abdominal ultrasound and electroencephalogram were normal.

Patient 3

The clinical presentation of patient 3 is very similar to that of his twin brother (patient 2), but he had no heart defect. His development followed an identical course, with verbal regression at 24 months. His cognitive abilities were also similar (Supplementary Table 1), but his behavior was more problematic, with frequent bouts of self-injurious behavior, clastic crises, and severe sleep disturbances. At 18 years, he was 172 cm tall (mean), weighed 55 kg (−1 SD) and had an OFC of 55 m (−1 SD). He had dysmorphic features similar to his twin brother (Figure 1c), including the sternum malformation. The results of the karyotype, fragile X, brain MRI and metabolic screening were the same as in his twin brother.

METHODS

Cytogenetic analysis and FISH

High-resolution karyotypes were performed on peripheral blood lymphocytes using RHG and GTG banding. FISH using a whole chromosome painting probe for chromosome 16 (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) was performed on metaphase spreads of the twins. Bacterial artificial chromosomes ADELA-1G01 and APADA-2A01 (Integragen, Evry, France) were used to confirm the duplication.

Whole-genome single-nucleotide polymorphism (SNP) array

Genomic DNA was analyzed with the HumanCNV370-Duo DNA Analysis BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) containing over 370 000 markers, the majority of which are SNPs. The mean resolution is ~20 kb. SNP copy numbers (log R ratio) and B allele frequencies were assessed using the Illumina BeadStudio software v3.2. CNV analysis was performed using CNV partition v3.1.1 (Illumina) and PennCNV algorithms (www.openbioinformatics.org). Genomic locations are based on NCBI Build 36 (hg18).

Real-time quantitative PCR (qPCR)

qPCR with the Universal Probe Library (Roche, Indianapolis, IN, USA) was used to confirm and map the CNVs, as described previously.¹⁹ Data analysis was performed with the qBase software (<http://medgen.ugent.be/qbase/>).

RESULTS

High-resolution karyotype (800 bands) in the twins (patients 2 and 3) showed additional material on the short arm of one chromosome 16.

The whole chromosome 16-painting probe completely painted both chromosomes 16, showing that the extra material was from chromosome 16. Parental karyotypes were normal, indicating that the interstitial 16p duplication occurred *de novo*. The karyotype of patient 1 was also normal. FISH analysis using clones ADELA-1G01 (16p12.1) and APADA-2A01 (16p11.2) in one of the twins (patient 2) demonstrated a direct tandem duplication and ruled out an inversion in the parents (data not shown).

High-resolution SNP array in patient 2 confirmed the presence of a ~8.95 Mb duplication at 16p11.2p12.2 flanked by segmental duplications; the minimal and maximal estimated sizes of the duplication are 21282605-30235818 and 21273056-30239704 (Figures 2a and 3). Analysis of genotypes and B allele frequency in the duplicated segment showed that the rearrangement arose on the paternal chromosome. No other rare CNVs were observed in patient 2 (Supplementary Table 2).

The microarray in the eldest brother (patient 1) showed a 847 kb microdeletion in 16p11.2 (28401454-29249055) (Figures 2a and 3). The same deletion was present in the father, whereas the mother had a normal profile (Figure 2a). The other CNVs identified in patient 1 were reported in the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>) (Supplementary Table 2).

The results of the SNP arrays were confirmed by qPCR (Figure 2b). In patients 2 and 3, the qPCR confirmed the duplication of *VWA3A* located at 16p12.1, and *NUPRI*, *LAT*, and *ALDOA* located at 16p11.2, with normal dosage of the genes flanking the rearranged region. In patient 1 and the father, both *NUPRI* and *LAT* were deleted.

DISCUSSION

16p11.2p12.2 rearrangements

We report a family with three children with autism, carrying different rearrangements on an overlapping region of chromosome 16p. The monozygotic twins carried a *de novo* 8.95 Mb duplication in 16p11.2p12.2 (21.28–30.23 Mb), encompassing the region associated with the novel 16p11.2p12.2 microdeletion syndrome.¹² The six deletion carriers described so far exhibit similar dysmorphic features, ID, severe language impairment, short stature, feeding difficulties and recurrent ear infections.^{12–14} None was reported to have autism or autistic traits, although only one was assessed formally for ASD.¹³ These subjects share a common distal breakpoint around 21.4 Mb, but differ in the proximal breakpoint, ranging from 28.5 to 30.1 Mb.¹²

Our patients are the first with a molecularly characterized 16p11.2p12.2 duplication. Apparently reciprocal duplication of the 16p11.2p12.2 region has been reported in three patients,^{15,16} as well as in a fetus diagnosed prenatally,¹⁷ all were studied by standard cytogenetic analysis and FISH. The clinical features of the twins and previously reported patients are summarized in Supplementary Table 3; the only shared feature is ASD. A woman with autism, anxiety disorder and ADHD transmitted the duplication to her daughter, who had ASD and limited language; neither one had ID or dysmorphic features.^{15,16} The third case, a male, had a more severe phenotype, with autism, severe ID, epilepsy, and dysmorphic features including hypertelorism, broad nasal bridge and tip, wide mouth, short stature, and club feet.¹⁶ In addition, a girl carrying a complex 16p11.2p12.1 rearrangement involving a duplication and triplication had moderate ID, short stature, and dysmorphic features with short palpebral fissures, and wide nasal bridge and tip; she was described as friendly and talkative.¹² The twins described here had autism, severe ID and dysmorphic features including deep-set eyes and large nasal bridge and tip. They had recurrent infections during childhood, like the boy described previously.¹⁶ On the basis of this limited number of patients,

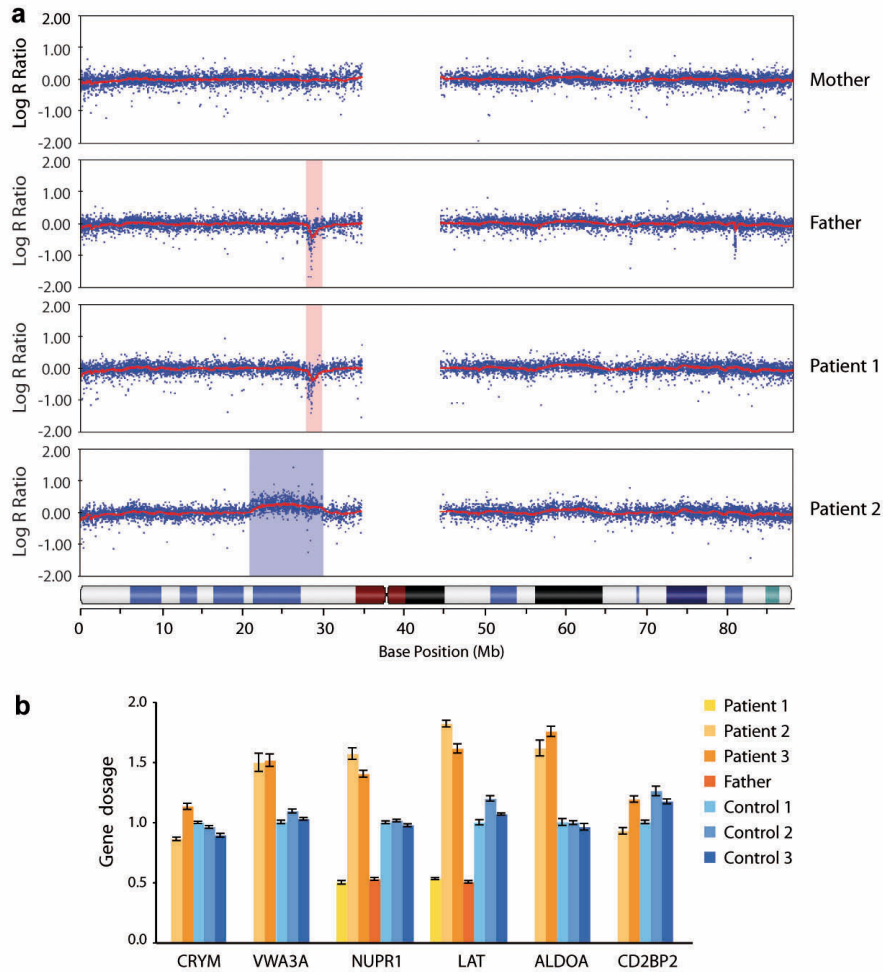


Figure 2 Microarray and qPCR results. (a) SNP array profiles of chromosome 16 showing a 16p11.2 deletion in patient 1, inherited from his father (both highlighted in red), a *de novo* 16p11.2p12.1 duplication in patient 2 (highlighted in blue), and a normal profile in the mother. (b) qPCR probes confirmed the 16p11.2p12.2 duplication in the twins (patients 2 and 3) and the 16p11.2 deletion in patient 1 and the father compared with three controls. Data represent mean \pm SEM. The color reproduction of this figure is available at *European Journal of Human Genetics* journal online.

duplications of the 16p11.2p12.2 region appear to be associated with a more variable phenotype compared with deletions, with ASD being the only constant feature identified thus far. Other cases of molecularly defined 16p11.2p12.2 duplications are necessary in order to clarify the genotype–phenotype correlation.

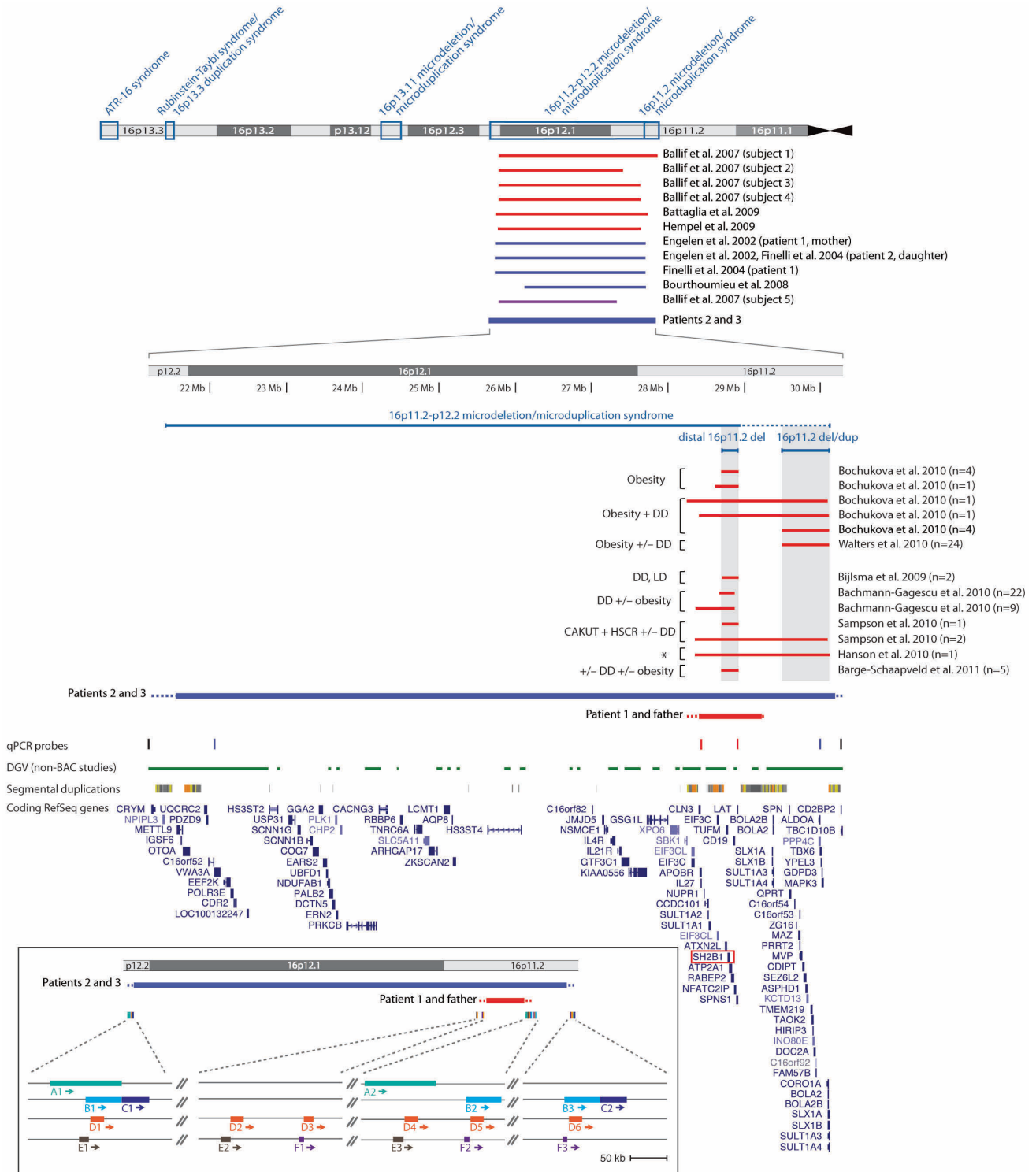
The centromeric end of the 16p11.2p12.2 deletion can overlap the 600-kb region in 16p11.2 (29.5–30.1 Mb) associated with autism and other neurodevelopmental disorders.¹² The duplication in the twins also encompassed this 16p11.2 region. Initially reported in up to 1% of patients with ASD, this CNV was shown to occur in 0.3–0.4% of ASD subjects in two recent large studies,^{20,21} and in 0.6% patients submitted for clinical array-CGH.⁶ Both the deletion and the duplication are associated with phenotypic heterogeneity, ranging from ASD, ID, multiple congenital anomalies, and learning and speech problems, to an apparently normal phenotype,^{6–8,22} but the deletion seems to be more penetrant compared with the duplication.⁸ In addition to cognitive impairment and language deficits, individuals with the 16p11.2 duplication can exhibit motor delay, behavioral problems including ASD, ADHD, aggression or outbursts, schizophrenia, epilepsy, dysmorphic features without a recognizable pattern, and rare congenital anomalies.^{5–8,23} Patients with microdeletion are at increased risk for obesity,^{7,10} whereas the duplication is associated with being underweight.¹¹ In common with other 16p11.2 duplication

carriers, the twins had autism, ID, lack of speech, severe behavioral problems with hyperactivity and clastic crises, dysmorphic features, and a tendency to being underweight (–1 to –2 SD). One of the twins had a ventricular septal defect; a microduplication carrier with a similar heart abnormality was reported previously.²³ Other features found in patients 2 and 3, such as the sternal deformity and the muscular hypotrophy with absent reflexes, suggestive of peripheral neuropathy, have not been described before, either in association with 16p11.2 duplications or the larger 16p11.2p12.2 duplications.

The duplicated segment in the twins encompasses 125 RefSeq genes, including numerous brain-expressed genes with potential roles in neurodevelopment. Increased dosage of one or more genes in the 16p11.2p12.2 or the 16p11.2 regions could contribute to their phenotype, given that ASD, ID, and dysmorphic features have been reported in both.

SH2B1-containing distal 16p11.2. deletion

In the eldest brother (patient 1), the oligonucleotide array revealed a deletion of 847 kb in the 16p11.2 region (28.40–29.25 Mb), inherited from his healthy father. This microdeletion does not overlap the proximal 16p11.2 locus associated with ASD and ID, and encompasses 19 RefSeq genes (Figure 3). Interestingly, deletions in this region were recently implicated in early-onset obesity, with a minimal overlapping



Since online publication, the weight of the rules in figure 3 have been corrected

Figure 3 Map of the short arm of chromosome 16 with a summary of abnormalities identified in the 16p11.2-p12.2 region. Schematic representation of chromosome 16p showing the 16p11.2-p12.2 duplication in patients 2 and 3 (thick blue line) and other overlapping rearrangements reported previously: four duplications (thin blue lines), six deletions (red lines) and one complex rearrangement involving a duplication and a triplication (purple line). The location of five recurrent microdeletion/microduplication syndromes is represented by blue rectangles on the ideogram. A detailed map of ~9 Mb (21177300-30296811, hg 18), comprising the duplication in patients 2 and 3 (thick blue line) and the deletion in patient 1 and the father (thick red line) is shown. Additional horizontal thin red lines indicate deletions described previously in individuals with obesity, developmental delay (DD), learning disability (LD), congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT), or Hirschsprung disease (HSCR). The patient marked with an asterisk was too young to evaluate the manifestations reliably. qPCR probes are shown as vertical bars; black bars represent a normal copy number, blue bars indicate a duplication (in patients 2 and 3) and red bars indicate a deletion (in patient 1 and the father). Horizontal green lines indicate the location of structural variations identified in non-bacterial artificial chromosomes studies according to the Database of Genomic Variants (DGV). The inset shows a simplified interpretation of the segmental duplications located in the 16p11.2-p12.2 region (UCSC genome browser). See Supplementary Note for a detailed description of these segmental duplications and their possible role in the observed rearrangements in the family described here. The color reproduction of this figure is available at *European Journal of Human Genetics* journal online.

region of 220 kb (28.73–28.95 Mb)¹⁸ (Figure 3). Patients with longer deletions extending through the 600-kb region associated with ASD/ID exhibited developmental delay in addition to obesity. The 220-kb deletion was also identified in 2 out of 7366 controls. The minimal deleted interval contains nine genes (Supplementary Table 4), including *SH2B1*, which encodes an adapter protein involved in leptin and insulin signaling. *Sh2b1* disruption in mice results in obesity and insulin resistance, a phenotype rescued by neuron-specific expression of SH2B1.²⁴ Patient 1 had childhood obesity, whereas his father showed a tendency to be overweight, supporting the role of the *SH2B1*-containing region in obesity. However, in contrast to the patients with 16p11.2 deletions reported by Bochukova *et al*,¹⁸ who rapidly gained weight in the first years of life and became severely obese, our patient first met criteria for obesity at the age of 7 years (BMI 20.6, >97th centile) and when last examined at 19 years, he was mildly overweight, with a BMI of 26 (84th centile).

The frequency of the *SH2B1*-containing 220-kb deletion in patients with severe obesity is 0.51% (7/1362),¹⁸ whereas the 600-kb 16p11.2 deletion has a frequency of 0.36% in individuals ascertained for obesity (15/4197).¹⁰ Thus, both CNVs are among the most frequent genetic causes of obesity, after melanocortin-4 receptor (*MC4R*) point mutations.

The *SH2B1*-containing 16p11.2 deletion was recently reported in 31 of 23084 patients with developmental disabilities referred for chromosomal microarray analysis.²⁵ Only deletions not overlapping the ASD/ID proximal 16p11.2 CNV were included. When compared with published control datasets, where a single 200-kb deletion was identified in 7700 subjects (0.013%), deletions in this region appeared

to be significantly enriched in the patient population (0.13%). Among 13 patients in which inheritance was determined, 5 were *de novo*. Detailed clinical information was only available for six subjects; all had developmental delay of varying severity, two had ASD, three had dysmorphic features and four had BMI \geq 95th centile. Because the enrichment analysis was performed with control data generated on different microarray platforms with varying sensitivity and specificity, these findings need to be replicated. Future studies, comparing the frequency of 16p11.2 deletions that include the *SH2B1* gene in large samples ascertained for obesity alone, ID/ASD alone or both phenotypes, will help clarify the impact of this CNV in neurodevelopmental disorders.

Additional reports of 11 individuals with overlapping 16p11.2 distal deletions have been published recently (Figure 3), associated with highly variable phenotypes, including developmental delay ($n=5$), learning difficulties ($n=1$), behavioral problems such as ASD ($n=2$) and ADHD ($n=1$), unusual facial features ($n=6$), obesity ($n=4$), diabetes ($n=2$), seizures ($n=1$), congenital anomalies of the kidney and urinary tract ($n=2$), and Hirschprung disease ($n=2$).^{7,22,26,27} Three of the deletions were *de novo*, five paternally inherited and three unknown. Two carrier relatives, a father and a sister, had obesity and diabetes, but were otherwise reportedly healthy.²⁷

Of the other eight genes contained in the minimal deleted region, three are involved in autosomal recessive disorders (*TUFM*, *ATP2A*, *CD19*), three are involved in immunity (*NFATC2IP*, *LAT*, *ATXN2L*), *RABEP2* has a role in membrane trafficking, and little is known about the function of *SPNS1* (Supplementary Table 4). *SH2B1* haploinsufficiency, already implicated in central nervous system-mediated

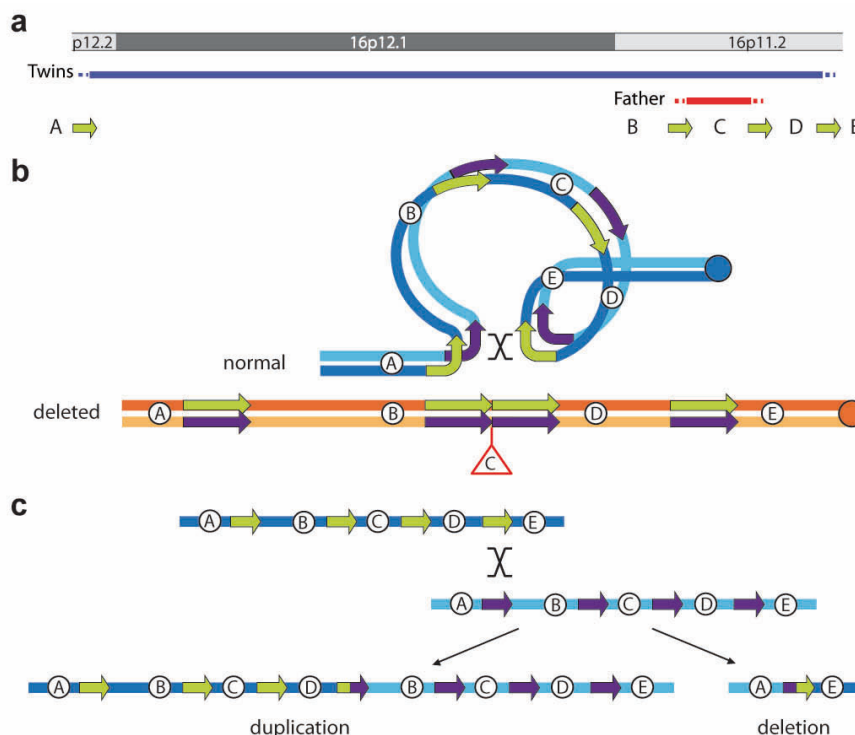


Figure 4 Proposed mechanism for the formation of the 16p11.2-p12.2 duplication in the twins. (a) Chromosome 16p region comprising the duplication in the twins (blue line) and the 16p11.2 deletion in the father (red line). Blocks of segmental duplications in the same orientation with a high degree of identity overlapping the breakpoint regions are represented by green arrows (see Supplementary note for details). Letters A–E indicate the chromosomal regions represented in the panels below. (b) One of the paternal chromosomes (orange) carries a deletion of the segment identified as C. During meiosis, the normal chromosome (blue) forms a deletion loop; the genome architecture of the region facilitates misalignment of directly oriented segmental duplications, followed by NAHR within the loop. (c) Interchromatid mispairing of direct repeats results in duplication (the recombinant product transmitted to the twins) and deletion. The color reproduction of this figure is available at *European Journal of Human Genetics* journal online.

obesity,²⁴ could also participate in neurodevelopmental and other phenotypes. The widely expressed scaffold protein SH2B1 binds to a variety of ligand-activated receptor tyrosine kinases, including the receptors for nerve growth factor, insulin and insulin-growth factor 1. SH2B1 facilitates glial-cell-line-derived neurotrophic factor-induced neurite outgrowth through RET receptor signaling.²⁸ Through its implication in the RET-glial-cell-line-derived neurotrophic factor signaling pathway, SH2B1 could also have a role in the abnormalities of renal morphogenesis and enteric innervation seen in patients with distal 16p11.2 deletions.²⁶

Potential molecular mechanisms

Most recurrent CNVs described in the short arm of chromosome 16 occur through NAHR.^{5,12,18} A NAHR mechanism is also likely to be involved in the rearrangements observed in the present family, as the breakpoints of the 16p11.2p12.2 duplication and the 16p11.2 microdeletion were found to map within segmental duplications with a high degree of sequence identity (see Figure 3 and Supplementary Note). Both the duplication and the deletion are from paternal origin. Analysis of genotypes and B allele frequency indicated that patients 1 and 2 shared the same paternal allele in the telomeric part of the region encompassing the duplication in the twins, but they inherited different paternal alleles in the region overlapping the deletion and the distal part of the duplication (Supplementary Table 5). This suggests that during meiosis in the father, a crossing over between the two homologous chromosomes 16 occurred distal to the deleted region. Thus, patient 1 inherited part of the normal allele and part of the deleted allele comprising the deleted region.

We hypothesize that the 16p11.2 deletion in the father might have facilitated the appearance of the duplication in his twin children because of the formation during meiotic pairing of a deletion loop in the normal chromosome 16, together with misalignment of segmental duplications in the same orientation sharing >98% sequence identity (Figure 4 and Supplementary Note). After an intrachromosomal crossing-over within the loop, the recombined allele carried a direct duplication of the segment comprised in the loop. Thus, on the basis of the suggested mechanism, the distal 16p11.2 microdeletion implicated in obesity¹⁸ could contribute to increased risk of rearrangements of the 16p pericentromeric region in the progeny, some of which can result in ASD or other neurodevelopmental disorders, like in the present family. Further cases are needed to confirm this hypothesis.

CONCLUSION

This multiplex family highlights the profound genetic heterogeneity underlying autism, including instances of intrafamilial heterogeneity like the one reported here. Although the *de novo* 16p11.2p12.2 duplication is the likely cause of ASD, ID, and malformations in the twins, the contribution of the paternally inherited SH2B1-containing 16p11.2 deletion to the neurological phenotype of the eldest brother is unclear at present, and further studies in large samples are needed to enable genotype/phenotype correlations.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the family for participating in this study. This research was supported by Fondation de France, INSERM and by a donation from

Mr Gabriel de Broglie of the Fondation Dehecq-Institut de France. MP is supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Research.

- Betancur C: Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* 2011; **1380**: 42–77.
- Kielinen M, Rantala H, Timonen E, Linna SL, Moilanen I: Associated medical disorders and disabilities in children with autistic disorder: a population-based study. *Autism* 2004; **8**: 49–60.
- Lupski JR, Stankiewicz P: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 2005; **1**: e49.
- Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J *et al*: Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 628–638.
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM *et al*: Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 2008; **358**: 667–675.
- Shinawi M, Liu P, Kang SH *et al*: Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioral problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 2009; **47**: 332–341.
- Bijsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH *et al*: Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet* 2009; **52**: 77–87.
- Fernandez BA, Roberts W, Chung B *et al*: Phenotypic spectrum associated with *de novo* and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet* 2009; **47**: 195–203.
- McCarthy SE, Makarov V, Kirov G *et al*: Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* 2009; **41**: 1223–1227.
- Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A *et al*: A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 2010; **463**: 671–675.
- Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F *et al*: Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 2011; **478**: 97–102.
- Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E *et al*: Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nat Genet* 2007; **39**: 1071–1073.
- Battaglia A, Novelli A, Bernardini L, Iglizoi R, Parrini B: Further characterization of the new microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**: 1200–1204.
- Hempel M, Rivera Bragues N, Wagenstaller J *et al*: Microdeletion syndrome 16p11.2-p12.2: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**: 2106–2112.
- Engelen JJ, de Die-Smulders CE, Dirckx R *et al*: Duplication of chromosome region (16)(p11.2→p12.1) in a mother and daughter with mild mental retardation. *Am J Med Genet* 2002; **109**: 149–153.
- Finelli P, Natacci F, Bonati MT *et al*: FISH characterisation of an identical (16)(p11.2p12.2) tandem duplication in two unrelated patients with autistic behaviour. *J Med Genet* 2004; **41**: e90.
- Bourthoumie S, Esclaire F, Terro F *et al*: First prenatally diagnosed case of 16p11.2p12.1 duplication. *Prenat Diagn* 2008; **28**: 254–256.
- Bochukova EG, Huang N, Keogh J *et al*: Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature* 2010; **463**: 666–670.
- Tabet AC, Aboura A, Gerard M *et al*: Molecular characterization of a *de novo* 6q24.2q25.3 duplication interrupting UTRN in a patient with arthrogyposis. *Am J Med Genet A* 2010; **152A**: 1781–1788.
- Glessner JT, Wang K, Cai G *et al*: Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 2009; **459**: 569–573.
- Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L *et al*: Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 2010; **466**: 368–372.
- Hanson E, Nasir RH, Fong A *et al*: Cognitive and behavioral characterization of 16p11.2 deletion syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 2010; **31**: 649–657.
- Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA *et al*: Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodev Disord* 2010; **2**: 26–38.
- Ren D, Zhou Y, Morris D, Li M, Li Z, Rui L: Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2007; **117**: 397–406.
- Bachmann-Gagescu R, Mefford HC, Cowan C *et al*: Recurrent 200-kb deletions of 16p11.2 that include the SH2B1 gene are associated with developmental delay and obesity. *Genet Med* 2010; **12**: 641–647.
- Sampson MG, Coughlin 2nd CR, Kaplan P *et al*: Evidence for a recurrent microdeletion at chromosome 16p11.2 associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) and Hirschsprung disease. *Am J Med Genet A* 2010; **152A**: 2618–2622.
- Barge-Schaapveld DQ, Maas SM, Polstra A, Knecht LC, Hennekam RC: The atypical 16p11.2 deletion: A not so atypical microdeletion syndrome? *Am J Med Genet A* 2011; **155**: 1066–1072.
- Zhang Y, Zhu W, Wang YG *et al*: Interaction of SH2B1 with RET is involved in signaling of GDNF-induced neurite outgrowth. *J Cell Sci* 2006; **119**: 1666–1676.

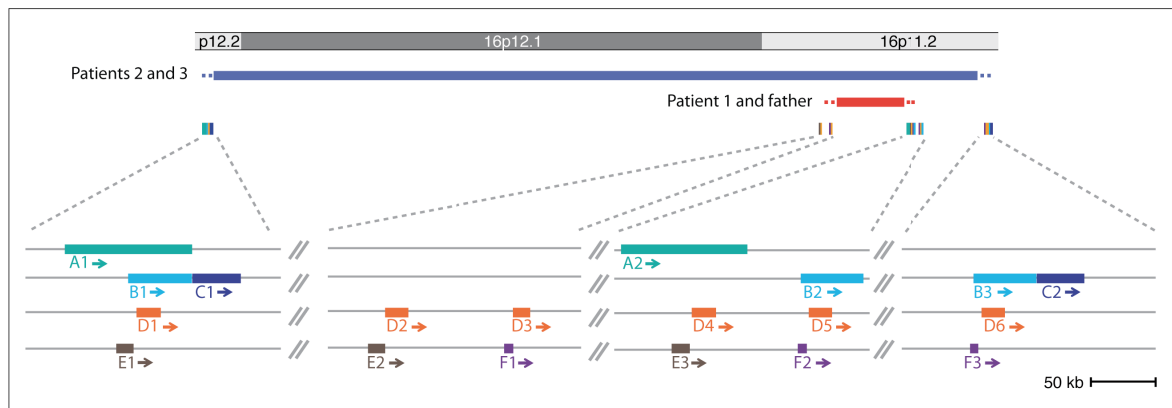
Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother

Anne-Claude Tabet, Marion Pilorge, Richard Delorme, Frédérique Amsellem, Jean-Marc Pinard, Marion Leboyer, Alain Verloes, Brigitte Benzacken, Catalina Betancur

Supplementary Material

Supplementary Note



Inset of Figure 2.

The segmental duplications in the 16p11.2-p12.2 region have been assigned the alphanumeric IDs A1-A2, B1-B3, C1-C2, D1-D6, E1-E3 and F1-F3. Segmental duplications A1 and A2 are 110 kb in size, are in the same orientation and share >98% sequence identity. The distal (telomeric) breakpoint of the duplication in the twins (Patients 2 and 3) is located at A1, whereas the proximal (centromeric) breakpoint of the deletion in their non-twin brother (Patient 1) and the father is located at A2. Segmental duplications B1-B3 are ~55 kb in size, are oriented in the same way and share >99% sequence identity. As A1 and A2, segmental duplications B1 and B2 are located at the distal breakpoint of the duplication and the proximal breakpoint of the deletion, respectively, whereas B3 is located at the proximal breakpoint of the duplication. Segmental duplications C1 and C2 are ~42 kb in size, are oriented in the same way and share >98% sequence identity. The proximal and distal breakpoints of the duplication are located at segmental duplications C1 and C2, respectively. Segmental duplications D1-D6 are 15-20 kb in size, are oriented in the same way and share >98% sequence identity. D1-D6 are present at all distal and proximal breakpoints of the deletion and the duplication. Segmental duplications E1-E3 are 15 kb in size, are in the same orientation and share >98% sequence identity. Segmental duplications F1-F3 are 7.6 kb in size and share >98% sequence identity.

Supplementary Table 1. Psychiatric, cognitive and developmental evaluations of the siblings

	Patient 1	Patient 2 (MZ twin)	Patient 3 (MZ twin)
Sex	Male	Male	Male
Copy number imbalance	16p11.2 deletion (28.40-29.25 Mb)	16p11.2p12.2 duplication (21.28-30.23 Mb)	16p11.2p12.2 duplication (21.28-30.23 Mb)
Inheritance	Paternal	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Clinical and research diagnosis	Autism	Autism	Autism
ADI-R			
Age at evaluation	5 y 1 mo	3 y 2 mo	3 y 2 mo
Social (cutoff 10)	17	23	22
Communication (cutoff 7)	14 (non verbal)	14 (non verbal)	13 (non verbal)
Repetitive behavior (cutoff 3)	7	4	3
Onset (cutoff 1)	5	4	4
ADI-R diagnosis	Autism	Autism	Autism
ADOS (module 1)			
Age at evaluation	—	18 y 5 mo	18 y 5 mo
Communication (cutoff 4)	—	6	6
Social Interaction (cutoff 7)	—	14	13
Total (cutoff 12)	—	20	19
Play	—	4	4
Interests and Behavior	—	8	8
ADOS diagnosis	—	Autism	Autism
IQ measure			
Scale	WISC-III	RCPM	RCPM
Age at evaluation	16 y	18 y 4 mo	18 y 4 mo
Full scale IQ	47	<1st centile	<1st centile
Verbal IQ	50	—	—
Performance IQ	50	—	—
VABS II ¹			
Age at evaluation	5 y 2 mo	18 y 5 mo	18 y 5 mo
Communication	13	11	9
Daily living	20	23	21
Socialization	15	1	1
Maladaptive behaviors	38	20	23
CARS			
Age at evaluation	—	10 y 3 mo	10 y 3 mo
Composite score	—	37	38
Severity	—	Mild-moderate autism	Severe autism

¹ Age equivalent scores, expressed in months. Abbreviations: CARS, Childhood Autism Rating Scale; MZ, monozygotic; RCPM, Raven's Colored Progressive Matrices; VABS II, Vineland Adaptive Behavior Scales, second edition; WISC-III, Wechsler Intelligence Scale for Children, third edition

Supplementary Table 2. Other CNVs identified in the family

Subject	Chr	Start ¹	End ¹	Size	Algorithms	CNV	Inheritance	DGV ³	
Patient 1	2	4191253	4199818	8565	CNV partition	deletion	paternal	yes	
	3	74185282	74280502	95220	CNV partition, PennCNV	deletion	maternal	partial	
	4	69097539	69163188	65649	CNV partition	deletion	maternal ²	yes	
	6	79029649	79090197	60548	CNV partition	deletion	paternal	yes	
	6	170222030	170223555	1525	CNV partition	deletion	paternal ²	yes	
	8	39356825	39497557	140732	CNV partition, PennCNV	deletion	paternal	yes	
	9	370095	400312	30217	CNV partition, PennCNV	duplication	maternal	yes	
	11	55124465	55149014	24549	CNV partition	deletion	paternal ²	yes	
	11	80663196	80692622	29426	CNV partition, PennCNV	deletion	maternal	yes	
	12	7891603	8014573	122970	CNV partition, PennCNV	deletion	paternal	yes	
	13	56659471	56665094	5623	CNV partition	deletion	paternal ²	yes	
	Patient 2	3	164004033	164085280	81247	CNV partition	deletion	maternal ²	yes
		4	69097539	69163188	65649	CNV partition	deletion	maternal ²	yes
4		161271979	161291569	19590	CNV partition	deletion	<i>de novo?</i>	yes	
6		67075448	67104015	28567	CNV partition	deletion	paternal	yes	
6		79029649	79090197	60548	CNV partition	deletion	paternal	yes	
6		170222030	170223555	1525	CNV partition	deletion	paternal ²	yes	
8		39356825	39497557	140732	CNV partition, PennCNV	deletion	paternal	yes	
11		55124465	55149014	24549	CNV partition	deletion	paternal ²	yes	
11		80663196	80692622	29426	CNV partition, PennCNV	deletion	maternal	yes	
12		7891603	8014573	122970	CNV partition, PennCNV	deletion	paternal	yes	
14		18531500	19387587	856087	CNV partition, PennCNV	duplication	paternal	yes	
19		20413668	20507068	93400	CNV partition	deletion	maternal ²	yes	
Father		1	103941535	104107839	166304	CNV partition, PennCNV	deletion		yes
	2	4191253	4199818	8565	CNV partition	deletion		yes	
	4	115398433	115401739	3306	CNV partition	deletion		yes	
	6	67075448	67104015	28567	none (manual inspection)	deletion		yes	
	6	79029649	79090197	60548	CNV partition	deletion		yes	
	6	170222362	170223555	1193	CNV partition	deletion		yes	
	8	39356825	39497557	140732	CNV partition, PennCNV	deletion		yes	
	10	66981540	66983475	1935	CNV partition	deletion		yes	
	11	55124465	55171592	47127	CNV partition	deletion		yes	
	12	7891603	8014573	122970	CNV partition, PennCNV	deletion		yes	
	13	56646795	56665094	18299	CNV partition	deletion		yes	
	14	18531500	19387587	856087	none (manual inspection)	duplication		yes	
	16	81590327	81706426	116099	CNV partition, PennCNV	deletion		no	
18	36515599	36519446	3847	CNV partition	deletion		yes		
Mother	2	82794772	82891026	96254	CNV partition	deletion		yes	
	2	159667833	159679609	11776	CNV partition	deletion		partial	
	3	74185282	74280502	95220	CNV partition, PennCNV	deletion		partial	
	3	133194645	133195707	1062	CNV partition	deletion		yes	
	3	164004033	164101579	97546	CNV partition	deletion		yes	
	4	69064675	69163188	98513	CNV partition	deletion		yes	
	4	70164518	70246877	82359	CNV partition	deletion		yes	
	5	148738220	149321472	583252	CNV partition, PennCNV	deletion		partial	
	5	150167998	150194892	26894	CNV partition	deletion		yes	
	9	370095	400312	30217	CNV partition, PennCNV	duplication		yes	
	9	43515795	43720352	204557	CNV partition	deletion		yes	
	11	80663196	80692622	29426	none (manual inspection)	deletion		yes	
	15	19777876	19967366	189490	CNV partition	deletion		yes	
18	36514913	36519446	4533	CNV partition	deletion		yes		
19	20404485	20507068	102583	CNV partition, PennCNV	deletion		yes		
19	53898415	53900677	2262	CNV partition	deletion		yes		

HumanCNV370-Duo BeadChip (Illumina) data were analyzed using CNV partition and PennCNV. In addition, the results were inspected manually to determine inheritance of genomic variants in the children. Because none of the CNVs detected in Patients 1 and 2 appeared to be rare, no attempt was made to validate these findings with an independent method. ¹ Genomic coordinates correspond to the hg18 genome assembly (Build 36). ² Apparently inherited CNV with one breakpoint differing from the parent. ³ DGV, Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

Supplementary Table 3. Clinical features of individuals with duplications of the 16p11.2p12 region

	Engelen et al. (2002) Patient 1 (mother)	Engelen et al. (2002), Finelli et al. (2004) Patient 2 (daughter)	Finelli et al. (2004) Patient 1	Balif et al. (2007) Patient 5 ¹	Present study Patient 2 (MZ twin)	Present study Patient 3 (MZ twin)
Duplicated region	16p11.2p12.2 (21.24-29.41 Mb)	16p11.2p12.2 (21.24-29.41 Mb)	16p11.2p12.2 (21.24-29.41 Mb)	1p12.2 (21.4-28.2 Mb) (5.7 Mb dup)	16p11.2p12.2 (21.28-30.23 Mb)	16p11.2p12.2 (21.28-30.23 Mb)
Molecular studies	FISH (WCP16 and specific BAC probes)	FISH (WCP16 and specific BAC probes)	FISH (WCP16 and specific BAC probes)	array-CGH, SNP array 250K	SNP array 370K	SNP array 370K
Inheritance	unknown	inherited from mother (Patient 1)	mother's karyotype normal; father's karyotype not available	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>
Gender	F	F	M	F	M	M
Age	40 Y	5 Y	25 Y	17 Y 11 mo	17 Y 6 mo	18 Y 4 mo
Weight	NA	16.3 kg (50 th centile)	42 kg (<3 rd centile)	-2 SD	49 kg (-2 SD)	55 kg (-1 SD)
Stature	158 cm (<3 rd centile)	103 cm (3 rd centile -2 cm)	151 cm (<3 rd centile)	-3 to -4 SD, growth hormone deficiency	173 cm (normal range)	172 cm (normal range)
HC	52.5 cm (<3 rd centile)	49 cm (3 rd centile)	54 cm (25 th centile)	-1 SD	55 cm (-1 SD)	55 cm (-1 SD)
Development	learning difficulties	normal in the first year of life	severe neurodevelopmental delay	significant neurodevelopmental delay	normal development followed by regression at 26 mo	normal development followed by regression at 24 mo
IQ	IQ 83 (PIQ 64, VIQ 100, WAIS)	IQ 80	25<IQ<39 at 3 y	IQ 42 (WISC-IV at age 9)	severe ID	severe ID
ASD	autism	ASD	autism	—	autism	autism
Language	automatic speech, echolalia	poor expressive language, echolalia	first words at 10 y, no functional language	12 th percentile for reading, <1 st percentile for spelling and math	language regression at 26 mo; non verbal	language regression at 24 mo; non verbal
Other behavior	ADHD, borderline psychotic symptoms, flat affect, anxiety disorder, obsessive-compulsive symptoms	stubbomness	never achieved continence, needs help in eating, dressing and self care; hyperactive, poor attention	friendly and talkative, ADHD, anxiety and nervousness with nail biting and skin picking	not fully toilet trained, hyperactivity, short and agitated sleep	not fully toilet trained, hyperactivity, aggressive behavior, self-injurious behavior, severe sleep disturbance
Dysmorphism						
face	—	—	asymmetric, squared, bitemporal constriction, sparse hair	round face with full cheeks	triangular face, broad forehead, prominent orbital ridge	triangular face, broad forehead, prominent orbital ridge
eyes	—	—	upslanting palpebral fissures	narrow and slightly short palpebral fissures, relative hypertelorism, ptosis, strabismus, hyperopia	deep set eyes, upslanting palpebral fissures, thick upslant eyebrows, myopia, strabismus	deep set eyes, upslanting palpebral fissures, thick upslant eyebrows, myopia, strabismus
nose	—	—	broad nasal bridge, broad nasal tip, prominent columella	short nose, wide nasal bridge and round tip, anteverted nares	large, prominent nasal bridge, wide, bulbous tip, anteverted nares	large, prominent nasal bridge, wide, bulbous tip, anteverted nares
mouth and jaw	—	—	large mouth, thick lips, large irregular teeth, short philtrum	wide mouth, high-arched palate, thin upper lip, long philtrum, retrognathia	everted lower lip, tented philtrum wide cupid's bow, overbite, retrognathia with marked chin	everted lower lip, tented philtrum wide cupid's bow, overbite, retrognathia with marked chin
ears	—	—	long	low and posteriorly rotated, hyperacusis	backward tilted	backward tilted
Other malformations	—	—	bilateral club foot	bridged palmar creases, short fifth fingers, prominent finger tip pads, bilateral hallux valgus, minimal 2,3 toe syndactyly	ventricular septal defect, slender habitus, sternum deformity, mild scoliosis, cubitus valgus, long fingers and toes, bilateral single palmar creases and sandal gap	no heart defect, slender habitus, sternum deformity, mild scoliosis, cubitus valgus, long fingers and toes, bilateral single palmar creases and sandal gap
Infections	—	—	recurrent bronchitis, otitis, and gastroenteritis in childhood	—	recurrent otitis, nose and throat infections in childhood	recurrent otitis, nose and throat infections in childhood
Neurological	—	—	distal coreoathetotic movements, cervical dystonia	hypotonia	hyporeflexia, no motor deficit	absent reflexes, no motor deficit
Epilepsy	—	—	yes	—	—	—
Brain imaging	brain CT normal	NA	MRI: slight ventricular dilatation, moderate diffuse cortical atrophy	NA	MRI: white matter hyperintensities, moderate cortical atrophy and thin corpus callosum	MRI: white matter hyperintensities, moderate cortical atrophy and thin corpus callosum

¹ The patient reported by Balif et al. (2007) has a complex duplication and triplication involving the 16p11.2p12.1 region. Abbreviations: ADHD, attention deficit-hyperactivity disorder; ASD, autism spectrum disorder; CT, computed tomography; F, female; HC, head circumference; ID, intellectual disability; IQ, intellectual quotient; M, male; MRI, magnetic resonance imaging; MZ, monozygotic; NA, not available (not reported); PIQ, performance IQ; SD, standard deviation; VIQ, verbal IQ; WCP16, whole chromosome painting 16

Supplementary Table 4. Genes within the 220-kb minimal region of overlap of distal 16p11.2 deletions (28.73-28.95 Mb)

Symbol	Name	Coordinates (hg 18)	Function	Associated disease
<i>ATXN2L</i>	Ataxin 2 related protein	28 741 915- 28 756 059	ATXN2L is a member of the spinocerebellar ataxia family, suggested to be a component of the cytokine signaling system	No associated disease
<i>TUFM</i>	Tu translation elongation factor, mitochondrial	28 761 233- 28 765 230	TUFM participates in protein translation in mitochondria	An homozygous missense mutation in <i>TUFM</i> was described in a baby with mitochondrial encephalopathy (combined oxidative phosphorylation deficiency 4, OMIM 610678)
<i>SH2B1</i>	SH2B adaptor protein 1	28 782 725- 28 793 027	SH2B1 is an adaptor protein involved in leptin, insulin, cytokine and growth factor receptor signaling. In addition to its role in central nervous system-mediated obesity, SH2B1 facilitates neurite outgrowth	Severe early-onset obesity (OMIM 613444)
<i>ATP2A1</i>	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	28 797 310- 28 823 331	ATP2A1 is a magnesium-dependent enzyme involved in muscular excitation and contraction	Autosomal recessive Brody myopathy (OMIM 601003), characterized by impaired muscular relaxation during exercise
<i>RABEP2</i>	RAB GTPase binding effector protein 2	28 823 243- 28 844 033	RABEP2 plays a role in membrane trafficking, regulating endosomal vesicle docking and fusion	No associated disease
<i>CD19</i>	CD19 antigen	28 850 761- 28 858 164	CD19 is a cell surface molecule that regulates the antigen receptor-dependent stimulation of B lymphocytes	Antibody-deficiency syndrome (OMIM 613493), autosomal recessive
<i>NFATC2IP</i>	Nuclear factor of activated T-cells	28 869 819- 28 885 268	NFATC2IP plays a role in the inducible expression of cytokine genes in T cells	No associated disease
<i>SPNS1</i>	Spinster homolog 1	28 893 650- 28 904 339	SPNS1 appears to be involved in programmed cell death. The homologue of <i>SPNS1</i> , <i>SPNS2</i> , encodes a transporter of the sphingolipid metabolite sphingosine 1-phosphate (S1P), which plays a central role in neural, cardiovascular, and immunological development and function	No associated disease
<i>LAT</i>	Linker for activation of T cells	28 903 648- 28 909 605	LAT is a transmembrane protein that when phosphorylated leads to the recruitment of multiple signaling molecules implicated in T cell activation	No associated disease

Supplementary Table 5. B allele frequency and genotypes of the short arm of chromosome 16

SNP	Position	Father		Mother		Patient 1		Patient 2 (twin)	
		B all freq	Genotype	B all freq	Genotype	B all freq	Genotype	B all freq	Genotype
rs11865131	103667	0.5	AB	0.9	BB	0.5	AB	0.5	AB
rs11248914	233563	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.5	AB
rs9921222	315783	0.5	AB	1.0	BB	0.4	AB	0.5	AB
rs11645697	435663	0.6	AB	0.0	AA	0.0	AA	0.0	AA
rs12446663	5906038	0.5	AB	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB
rs6500827	6764824	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.5	AB
rs4261521	7872048	0.6	AB	0.0	AA	0.4	AB	0.5	AB
rs1058967	8854537	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.6	AB
rs8064140	9576189	0.6	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.5	AB
rs6498229	11607016	0.5	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.5	AB
rs1794302	12498592	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.5	AB
rs1438701	13173810	0.6	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.5	AB
rs7405176	14365847	0.6	AB	0.0	AA	0.6	AB	0.6	AB
rs4780577	15675498	0.5	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.5	AB
rs2100401	16867138	0.4	AB	0.0	AA	0.0	AA	0.0	AA
rs4781952	17616369	0.6	AB	0.5	AB	0.5	AB	0.0	AA
rs9937539	18941493	0.5	AB	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB
rs739565	19624006	0.5	AB	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB
rs2214195	20406898	0.5	AB	0.0	AA	0.0	AA	0.0	AA
rs858205	20979000	0.6	AB	1.0	BB	0.6	AB	0.6	AB
rs9933675	21161736	0.6	AB	0.0	AA	0.0	AA	0.0	AA
rs2238478	21190256	0.5	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.5	AB
rs226035	21202238	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.5	AB
rs194548	21515973	0.5	AB	0.5	AB	1.0	BB	0.7	AB
rs226005	21528048	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.3	AB
rs238547	23267700	0.6	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.3	AB
rs8048821	23886863	0.5	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.6	AB
rs4787697	25111249	0.6	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.7	AB
rs4592663	25810187	0.5	AB	0.5	AB	0.0	AA	0.3	AB
rs321441	26611178	0.5	AB	0.0	AA	0.4	AB	0.6	AB
rs10400960	26738119	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	0.4	AB
rs17200687	26743810	0.5	AB	0.0	AA	0.0	AA	0.0	AA
rs4787393	26857335	0.6	AB	1.0	BB	0.6	AB	1.0	BB
rs4238945	26882508	0.6	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.0	AA
rs7206078	26955737	0.6	AB	1.0	BB	1.0	BB	0.3	AB
rs205432	27992496	0.6	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.0	AA
rs205355	28012030	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	1.0	BB
rs4075049	28150790	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	1.0	BB
rs2650492	28240912	0.6	AB	1.0	BB	0.5	AB	1.0	BB
rs1064886	28396413	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB
rs26528	28425210	1.0	BB	0.0	AA	0.0	AA	0.7	AB
rs153107	28432806	1.0	BB	0.0	AA	0.0	AA	0.7	AB
rs151228	28470527	1.0	BB	0.0	AA	0.0	AA	0.6	AB
rs151230	28490716	0.0	AA	1.0	BB	1.0	BB	0.3	AB
rs7201929	28779467	0.0	AA	1.0	BB	1.0	BB	0.3	AB
rs4072401	28844776	1.0	BB	0.0	AA	0.0	AA	0.7	AB
rs7184953	29223380	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB
rs4787478	29256578	0.4	AB	0.6	AB	1.0	BB	0.0	AA
rs8054172	29563365	0.5	AB	0.0	AA	0.6	AB	0.0	AA
rs11150564	29574237	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	1.0	BB
rs7202714	30085308	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	1.0	BB
rs9938125	30195224	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB	1.0	BB
rs4238961	30287987	0.6	AB	0.0	AA	0.6	AB	0.0	AA
rs1064524	30400324	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	1.0	BB
rs8058961	30716564	0.5	AB	0.0	AA	0.6	AB	0.0	AA
rs8048583	31187037	0.5	AB	1.0	BB	1.0	BB	0.5	AB
rs12927233	32045466	0.6	AB	0.0	AA	0.5	AB	0.0	AA
rs8047974	34079200	0.5	AB	1.0	BB	0.5	AB	1.0	BB
Centromere									

Informative SNPs were selected to illustrate the rearrangements and the parental origin. The 16p11.2p12.2 region duplicated in Patient 2 (and in his twin brother, Patient 3) is highlighted in blue, the 16p11.2 region deleted in Patient 1 and his father is highlighted in red. Informative SNPs for which Patient 1 and Patient 2 share the same paternal allele are shown in blue font, those for which they inherited a different allele are shown in red font. A crossing-over in the father's germline inherited by Patient 1 occurred between 26 743 810 bp and 26 857 335 bp. Non-informative SNPs at the start and end of the duplication and the deletion are shown in black. Genomic coordinates correspond to NCBI Build 36 (hg18).