



HAL
open science

Identification de facteurs biologiques de la transition psychotique

Boris Chaumette

► **To cite this version:**

Boris Chaumette. Identification de facteurs biologiques de la transition psychotique. Neurosciences. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB046 . tel-01730914

HAL Id: tel-01730914

<https://theses.hal.science/tel-01730914>

Submitted on 13 Mar 2018

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 Paris Descartes

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Inserm U894 / Equipe Physiopathologie des Maladies Psychiatriques

Identification de facteurs biologiques de la transition psychotique

Par Boris Chaumette

Thèse de doctorat de Neurobiologie

Dirigée par le Pr Marie-Odile Krebs

Présentée et soutenue publiquement le 5 septembre 2016

Devant un jury composé de :

Pierre Gressens, président de jury

Kim Q Do, rapporteuse

Sylvie Tordjman, rapporteuse

Olivier Guillin, membre du jury

Marie-Odile Krebs, directrice de thèse

Oussama Kebir, co-encadrant, membre du jury

Résumé :

La psychose est un syndrome apparaissant progressivement à l'adolescence chez des individus à risque selon un processus dynamique appelé transition psychotique. Ces individus à risque sont repérables cliniquement mais les données biologiques actuelles sont insuffisantes pour expliquer l'apparition de la psychose. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à identifier les facteurs biologiques responsables de ce processus.

Les hypothèses permettant d'expliquer la transition psychotique privilégient l'interaction gène x environnement, sous-tendue par des mécanismes épigénétiques. Nous avons mené une étude des modifications de la méthylation de l'ADN et de la transcription à l'aide de techniques de biologie moléculaire et de bio-informatique à l'échelle pan-génomique. La transition psychotique semble être liée à des modifications de méthylation et de transcription de gènes impliqués dans des mécanismes comme le guidage axonal ou la régulation du stress oxydatif.

Ces modifications longitudinales pourraient refléter l'influence de l'environnement. Les facteurs environnementaux pourraient déréguler l'axe biologique du stress dès les phases précoces de la maladie, comme le suggère l'augmentation de la sécrétion de cortisol basal que nous avons montré chez les individus à risque.

En outre, il est probable que des spécificités au niveau des gènes et des processus régulant l'épigénome soient également impliquées dans cette réponse individuelle à l'environnement. Nous avons montré l'importance du métabolisme mono-carboné au moins dans un sous-groupe spécifique de patients.

Ces résultats doivent être répliqués et étendus dans d'autres paradigmes pour valider l'implication de ces processus dans la transition psychotique. En cas de confirmation, ces voies biologiques pourraient s'avérer être des pistes intéressantes pour développer des thérapies ciblées et relever le défi de la prévention de la psychose chez des individus à risque.

Mots clés : transition psychotique – émergence – schizophrénie – psychose – premier épisode psychotique – prodrome – état mental à risque

Title: Identification of biological factors during the psychotic transition**Abstract:**

Psychosis is a progressive mental disorder which normally occurs during adolescence in at-risk subjects following a dynamic process termed “psychotic transition”. These at-risk subjects are clinically identifiable but biological data are still insufficient in explaining the onset of psychosis. Throughout this thesis, we aim to identify biological factors implicated in this pathophysiological process.

Current hypotheses explaining the psychotic transition favor the interaction between genes and the environment mediated by epigenetic mechanisms. We conducted studies examining methylomic and transcriptomic changes during psychotic transition using molecular biology and bioinformatics techniques at a whole genome scale. Our results suggest that psychotic transition may be linked to methylomic and transcriptomic changes in genes implicated in axon guidance or oxidative stress.

These longitudinal changes could be related to environmental factors. Some of these factors could deregulate the hormonal stress response at the earliest phases of psychosis. Indeed, our results show that secretion of basal cortisol is increased in prodromal individuals.

Moreover, it is likely that genes and processes regulating epigenetic modifications are also implicated in the individual response to the environment. We have shown the importance of the one-carbon metabolism for at least one sub-group of patients affected by psychosis.

Our results should be replicated using other paradigms in order to definitively validate the implication of these various actors in the psychotic transition. If confirmed, knowledge of these biological mechanisms could lead to the development of targeted therapeutics to prevent psychosis in at-risk individuals.

Keywords: psychotic transition – schizophrenia – psychosis – first-episode of psychosis – prodromal – onset – ultra-high risk – at-risk mental state

Remerciements

A Monsieur le Pr Pierre Gressens, pour nous faire l'honneur de présider cette thèse. Nous espérons que ce travail constituera une preuve supplémentaire de l'implication du neurodéveloppement dans les troubles psychotiques.

A Madame le Pr Kim Q. Do, pour avoir accepté de juger ce travail, et pour s'être rendue disponible malgré la distance géographique. Puissent ces résultats confirmer vos hypothèses sur l'importance des mécanismes du stress oxydatif dans la schizophrénie.

A Madame le Pr Sylvie Tordjman, pour avoir accepté de juger ce travail. Puisse cette thèse contribuer à renforcer nos hypothèses communes sur l'interaction gène x environnement et l'implication du stress dans les troubles psychiatriques.

A Madame le Pr Marie-Odile Krebs, pour m'avoir permis de réaliser ce travail sous sa direction, pour ne pas avoir ménagé sa peine dans la mise au point des protocoles et dans le recrutement des patients, pour m'avoir enseigné et orienté vers des recherches fructueuses.

A Monsieur le Pr Olivier Guillin, pour avoir accepté de juger ce travail, pour m'avoir enseigné la psychiatrie et pour m'avoir soutenu dans mes choix et mes orientations de recherche.

A Monsieur le Dr Oussama Kebir, pour avoir co-encadré cette thèse, pour sa bonne humeur et pour les instants partagés ensemble à travers le monde.

A Amélie, ma femme, présente à mes côtés depuis le commencement, supportant ma joie comme les moments de découragement, et sans qui l'aventure n'aurait pu être tentée.

A mes parents sans qui rien n'aurait pu voir le jour et à ma sœur pour ce que nous avons partagé.

A ma famille et à ma belle-famille pour votre présence.

A Filo,

A Galice et Ellie,

Mes fidèles compagnons à quatre pattes qui m'encouragent au quotidien.

A Vladimir, Jean-Baptiste et Sevan, pour le soutien et nos échanges scientifiques et amicaux tout au long de ces années.

A mes amis « extra-médecine », Jonathan et Elise, Thomas, Jean-Baptiste et Marion, Adrien.

À toute l'équipe clinique et de recherche du SHU, du C'JAAD, du CERC, de l'unité Inserm U894 qui ont contribué à la réalisation ou à la réflexion autour de ces travaux. Et en particulier à Raphaël Gaillard, Fabrice Rivollier, Charlotte Alexandre, Isabelle Amado, Marion Plaze, Olivier Gay, Celia Mam-Lam-Fook, Guillaume Ciesco, Yannick Morvan pour leur aide et leurs commentaires.

À Thérèse Jay et toute l'équipe du laboratoire de physiopathologie des maladies psychiatriques que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant 3 ans.

À Macarena Cuenca pour ton esprit vif et ta joie de vivre.

À nos collaborateurs de Paris 7, Valérie Mezger et Federico Miozzo, pour les échanges et les "manip" de methylomique.

À nos collaborateurs du collège de France et de l'ENS, Bertrand Ducos, Juliette Pouch et l'équipe de Fekrije Selimi pour les "manip" de transcriptomique.

À nos collaborateurs québécois de Montréal Simon Girard, Lan Xiong, Guy Rouleau et l'équipe du Pr Dubé, pour ce que nous avons fait ensemble et ce qu'il nous reste à accomplir.

A nos collaborateurs de Barcelone pour notre article commun et nos échanges.

À Nicolas Ramoz et Yann Loe-Mie, pour leurs conseils toujours précieux.

Aux étudiants que j'ai encadré Marwa et William, à Grégoire.

Aux membres du club Psy-Stat-Omics que je n'aurai pas cités ci-dessus.

Table des matières

ABBREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	14
ETAT DES CONNAISSANCES.....	18
I.1 LA SCHIZOPHRENIE, UNE PSYCHOSE CHRONIQUE ET EVOLUTIVE	18
I.1.A LE MODELE DES STADES CLINIQUES DANS LA PSYCHOSE	23
I.1.B DEFINITION CLINIQUE D’ETAT MENTAL A RISQUE	25
I.1.C COMPRENDRE LA TRANSITION PSYCHOTIQUE : LES ENJEUX DE RECHERCHE.....	30
I.2 LA THEORIE EPIGENETIQUE DE LA SCHIZOPHRENIE	33
I.2.A LA THEORIE GENE X ENVIRONNEMENT	33
I.2.B LES DIFFERENTS MECANISMES EPIGENETIQUES.....	35
I.2.C LES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES DANS LA SCHIZOPHRENIE	46
I.3 L’ORIGINE DES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES	47
I.3.A L’IMPLICATION DE LA MACHINERIE EPIGENETIQUE.....	47
I.3.B L’IMPACT DE L’ENVIRONNEMENT	53
TRAVAIL EXPERIMENTAL	60
II.1 DESCRIPTION DE LA COHORTE ICAAR ET PARADIGME EXPERIMENTAL	60
II.2 ANALYSE METHYLOMIQUE DE LA TRANSITION PSYCHOTIQUE	63
ARTICLE 1: METHYLOMIC CHANGES DURING CONVERSION TO PSYCHOSIS (MOLECULAR PSYCHIATRY 2016).....	67
II.3 ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE.....	74
II.3.A COMPARAISON DES FUTURS TRANSITEURS ET DES CONTROLES A MO.....	76
II.3.B COMPARAISON DES PATIENTS PSYCHOTIQUES ET DES CONTROLES A MF	79
II.3.C EXPRESSION DIFFERENTIELLE AU COURS DE LA TRANSITION PSYCHOTIQUE	79
ARTICLE 2 : LONGITUDINAL ANALYSES OF BLOOD TRANSCRIPTOME DURING CONVERSION TO PSYCHOSIS	80
II.4 ANOMALIES DU CYCLE MONOCARBONE CHEZ LES INDIVIDUS PRESENTANT UN ETAT MENTAL A RISQUE	90
ARTICLE 3 : ONE-CARBON METABOLISM IN PSYCHIATRIC DISORDERS: EVIDENCE FOR AN AT-RISK SUBGROUP	92
II.5 IMPLICATION DU STRESS DANS LA TRANSITION PSYCHOTIQUE	112
ARTICLE 4 : SALIVARY CORTISOL IN EARLY PSYCHOSIS: NEW FINDINGS AND META-ANALYSIS.....	113
(PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY 2015)	113

DISCUSSION	125
III.1 LIMITES METHODOLOGIQUES	132
III.2 LES PERSPECTIVES DE RECHERCHE	135
III.2.A EXPLORATION DU STRESS OXYDATIF CHEZ LES PATIENTS A RISQUE	135
III.2.B NOUVELLES METHODES D'ANALYSE	136
III.2.C VALIDATION DE LA VALEUR PREDICTIVE DES RESULTATS.....	143
III.3 LES RETOMBES MEDICALES ATTENDUES	144
III.3.A IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS	145
III.3.B AMELIORATION DE LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....	145
III.3.C DEMEMBREMENT DE LA SCHIZOPHRENIE	146
CONCLUSION	148
BIBLIOGRAPHIE	152
OUVRAGES GENERAUX.....	152
RÉFÉRENCES.....	152
ANNEXES	168
LISTE DES ITEMS DE LA CAARMS.....	169
CRITERES DIAGNOSTIQUES A LA CAARMS.....	170
PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN	172
PROTOCOLE DE PYROSEQUENÇAGE.....	172
PROTOCOLE DE SEQUENÇAGE ARN	179
PROTOCOLE DES Q-PCR MULTIPLEX.....	183
ARTICLE HYPOTHESE EPIGENETIQUE DE LA SCHIZOPHRENIE (REVUE - L'ENCEPHALE 2014)	184
ARTICLE STRESS ET TRANSITION PSYCHOTIQUE (REVUE - L'ENCEPHALE 2016).....	191
ARTICLE FAMILY-BASED ASSOCIATION STUDY OF COMMON VARIANTS, RARE MUTATION STUDY AND EPISTATIC INTERACTION DETECTION IN HDAC GENES IN SCHIZOPHRENIA (SCHIZOPHRENIA RESEARCH 2014)	198
POSTER TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS IN EARLY PSYCHOSIS: METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS AND NEW FINDINGS (PRÉSENTÉ AU WCPG 2015)	205

Préambule

« Conserver la santé et guérir les maladies : tel est le problème que la médecine a posé dès son origine et dont elle poursuit encore la solution scientifique. L'état actuel de la pratique médicale donne à présumer que cette solution se fera encore longtemps chercher. Cependant, dans sa marche à travers les siècles, la médecine, constamment forcée d'agir, a tenté d'innombrables essais dans le domaine de l'empirisme et en a tiré d'utiles enseignements. (...) De notre temps, grâce aux développements considérables et aux secours puissants des sciences physico-chimiques, l'étude des phénomènes de la vie, soit à l'état normal, soit à l'état pathologique, a accompli des progrès surprenants qui chaque jour se multiplient davantage.

Il est ainsi évident pour tout esprit non prévenu que la médecine se dirige vers sa voie scientifique définitive. Par la seule marche naturelle de son évolution, elle abandonne peu à peu la région des systèmes pour revêtir de plus en plus la forme analytique, et rentrer ainsi graduellement dans la méthode d'investigation commune aux sciences expérimentales. (...)

Mais la médecine scientifique ne peut se constituer, ainsi que les autres sciences, que par voie expérimentale, c'est-à-dire par l'application immédiate et rigoureuse du raisonnement aux faits que l'observation et l'expérimentation nous fournissent. La méthode expérimentale, considérée en elle-même, n'est rien autre chose qu'un raisonnement à l'aide duquel nous soumettons méthodiquement nos idées à l'expérience des faits. (...)

Le raisonnement sera toujours juste quand il s'exercera sur des notions exactes et sur des faits précis ; mais il ne pourra conduire qu'à l'erreur toutes les fois que les notions ou les faits sur lesquels il s'appuie seront primitivement entachés d'erreur ou d'inexactitude. C'est pourquoi l'expérimentation, ou l'art d'obtenir des expériences rigoureuses et bien déterminées, est la base pratique et en quelque sorte la partie exécutive de la méthode expérimentale appliquée à la médecine. (...) L'expérimentation est incontestablement plus difficile en médecine que dans aucune autre science ; mais par cela même, elle ne fut jamais dans aucune plus nécessaire et plus indispensable. Plus une science est complexe, plus il importe, en effet, d'en établir une bonne critique expérimentale, afin d'obtenir des faits comparables et exempts de causes d'erreur. C'est aujourd'hui, suivant nous, ce qui importe le plus pour les progrès de la médecine.

Pour être digne de ce nom, l'expérimentateur doit être à la fois théoricien et praticien. S'il doit posséder d'une manière complète l'art d'instituer les faits d'expérience, qui sont les matériaux de la science, il doit aussi se rendre compte clairement des principes scientifiques qui dirigent notre raisonnement au milieu de l'étude expérimentale si variée des phénomènes de la nature. Il serait impossible de séparer ces deux choses : la tête et la main. Une main habile sans la tête qui la dirige est un instrument aveugle ; la tête sans la main qui réalise reste impuissante. »

Introduction à l'étude de la médecine expérimentale – Claude Bernard 1865

Abbreviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
APS	Attenuated Psychosis Syndrome (Psychose atténuée)
ARMS	At-Risk Mental State (Etat mental à risque)
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BLIPS	Brief Limited Intermittent Psychotic Symptoms (Episode psychotique transitoire)
C'JAAD	Centre d'évaluation pour Adolescents et jeunes adultes
C1	Métabolisme monocarboné
CAARMS	Comprehensive Assessment of At-Risk Mental State
CGI	Clinical Global Impression (échelle d'impression clinique globale)
CHR	Chromosome
CNV	Copy Number Variation (variation du nombre de copies chromosomiques)
CpG	Dinucléotide Cytosine-Phosphate-Guanine
DMP	Differentially Methylated Position (CpG différenciellement méthylée)
DMR	Differentially Methylated Region (Région différenciellement méthylée)
DNMT	DNA methyltransferase (ADN méthyltransférase)
DUP	Duration of Untreated Psychosis (Durée de psychose non traitée)
EEG	Électroencéphalogramme
EU-GEI	European network of national schizophrenia networks studying Gene-Environment Interactions
FEP	First Episode of Psychosis (Premier épisode psychotique)
FPKM	Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped
GxE	Interaction gène-environnement
HHS	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HSC	Help-seekers controls (sujets contrôles demandeurs de soin)
HSR	Heat-Shock response
ICAAR	Influence du Cannabis sur l'émergence de symptômes psychopathologiques des Adolescents et jeunes Adultes présentant un état mental à Risque
LCR	Liquide céphalo-rachidien
M0	Temps de la première évaluation dans la cohorte ICAAR
M6	Temps de la deuxième évaluation à 6 mois dans la cohorte ICAAR
MF	Temps de la dernière évaluation dans la cohorte ICAAR (après 12 mois ou après une transition psychotique)
miARN	micro-ARN
mRNA	(voir ARNm)
NAPLS	North American Prodrome Longitudinal Study (cohorte américaine)
NIMH	National Institute of Mental Health
NUHR	Sujet ne présentant pas un état mental à ultra-haut risque
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
QQ-plot	Diagramme Quantile-Quantile
qPCR	Polymerase Chain Reaction quantitative
RNAseq	Séquençage à ARN
RONS	Reactive Oxygen Nitrogen Species (espèces réactives oxygénées et azotées)
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives oxygénées)
SIPS	Structured Interview for Prodromal Syndromes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
UHR	Ultra-High risk patient (sujet présentant un état mental à ultra-haut risque)
UHR-NP	UHR n'évoluant pas vers la psychose
UHR-P	UHR évoluant vers la psychose

Introduction

Décrite depuis plus d'un siècle, la schizophrénie reste encore une maladie psychiatrique mal comprise et de mauvais pronostic du fait de sa chronicité et de thérapeutiques efficaces seulement partiellement. Cette maladie est fréquente avec une prévalence estimée à 0.7% dans le monde entier (1). Cette maladie handicapante a des conséquences majeures pour les individus atteints et pour la société ; l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il s'agit d'une des dix causes majeures d'invalidité dans le monde. Les coûts directs sont estimés à 2% des dépenses de santé dans les pays développés (2) et il faut également tenir compte des coûts indirects qui s'élèvent à plus d'une centaine de milliards de dollars par an (3). Seulement 14% des patients ont une récupération complète dans les 5 premières années suivant un premier épisode psychotique (4) et 30% à plus long terme (5) ; 10 à 20% des patients atteints de schizophrénie pourront exercer un travail (6) et 20% seront sans-abri (7). La schizophrénie survient classiquement à l'adolescence ou à l'âge de jeune adulte (entre 15 et 25 ans) ce qui accroît le retentissement social et professionnel. On estime que l'espérance de vie des patients est réduite de 20 ans par rapport à la population générale (8) et le risque de suicide est d'environ 5% sur la vie entière (9).

La schizophrénie est connue depuis plus d'un siècle. Dès 1907 Kraepelin dans sa troisième leçon de l'« Introduction à la psychiatrie clinique » présente plusieurs cas de «démence précoce» qui correspondent à une même entité diagnostique. En 1911, Bleuler dans son ouvrage intitulé « La démence précoce ou le groupe des schizophrénies », récuse ce terme de démence précoce et introduit le mot de schizophrénie pour illustrer l'idée d'une fragmentation de l'esprit qui correspond aux symptômes dissociatifs. Bleuler suppose même une origine organique à ces maladies qu'il admet volontiers diverses. Les progrès neurobiologiques de la première moitié du XXe siècle sont encore insuffisants pour confirmer ses hypothèses ; cependant en 1951, la découverte empirique du premier neuroleptique par Delay et Deniker ouvre la voie à la psychopharmacologie. Soixante-cinq années après la découverte de l'intérêt de la chlorpromazine, le traitement de la schizophrénie repose toujours sur des traitements médicamenteux, qui, s'ils présentent moins d'effets secondaires, restent à visée antidopaminergique (10). Or ces traitements, s'ils demeurent essentiels et irremplaçables

pour la prise en charge des patients, sont inefficaces sur de nombreux symptômes. En particulier, ils ciblent les symptômes positifs comme le délire ou les hallucinations (action contre la psychose d'où leur appellation d'antipsychotiques) mais n'améliorent peu ou pas les symptômes négatifs voire se révèlent délétères sur la cognition. Ces dernières années, de nouvelles molécules comme les agonistes partiels dopaminergiques ou des molécules ciblant les autres voies de neurotransmission (glutamatergiques, GABAergiques, sérotoninergiques...) ont vu le jour mais rares sont celles qui réussissent à franchir les différentes étapes d'évaluation nécessaires pour parvenir à la pratique clinique (11). La prise en charge des patients nécessite pourtant des thérapeutiques innovantes. On estime à un tiers la proportion de patients résistants aux antipsychotiques (12) et une large fraction des patients répondeurs présente des symptômes résiduels non résolus par le traitement. Selon l'OMS, près de la moitié des patients atteints de schizophrénie ne reçoivent pas de soins appropriés, pour des raisons sanitaires mais aussi par inadéquation des traitements proposés. Les raisons de cette inadéquation sont à rechercher dans la mauvaise compréhension de cette maladie et en particulier dans notre difficulté à repérer les individus vulnérables et notre incapacité à leur proposer de manière précoce des mesures thérapeutiques adaptées (13).

Au cours du XXe siècle, d'autres maladies ont pourtant vu leur pronostic considérablement transformé. Alors que Louis Pasteur établit l'infectiologie moderne vers le milieu du XIXe siècle, une centaine d'années suffisent pour permettre l'éradication de la variole (1980 selon l'OMS). Le cancer qui était une maladie encore largement incomprise avant le développement de la génétique moléculaire a vu sa prise en charge transformée à la fin du XXe siècle. La plupart des maladies disposent aujourd'hui de biomarqueurs de dépistage mais cette quête s'est révélée improductive en psychiatrie. Comment expliquer dès lors que la psychiatrie ne connaisse pas des innovations semblables aux autres champs de la médecine ? L'une des explications possibles pourrait être une méconnaissance des mécanismes physiopathologiques sous-tendant les maladies psychiatriques. Cette connaissance est rendue difficile en raison de la difficulté d'accès à l'organe affecté. Cette hypothèse semble cependant insuffisante car les maladies neurologiques ont su surmonter ce problème en utilisant des techniques d'investigation acceptables pour les patients : biomarqueurs de maladie d'Alzheimer dans le liquide céphalo-rachidien, étude de l'activité cérébrale par des méthodes d'imagerie fonctionnelle... Certains chercheurs expliquent cette errance propre à la psychiatrie par la poursuite de fausses hypothèses, ne reposant pas toujours sur des cheminements scientifiques et agissant comme de véritables leurres détournant les moyens de recherche vers des impasses (communication de Keshavan M. à l'International Congress on Schizophrenia Research 2015

– Colorado Springs). Ce constat impose de changer de paradigme scientifique, de repenser la physiopathologie à l'aide des dernières découvertes biologiques. Les avancées récentes ont permis d'affirmer la participation de facteurs génétiques dans la schizophrénie mais aussi d'acteurs biologiques comme les cytokines, le système antioxydant, certains facteurs de transcription comme le BDNF, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, le métabolisme mono-carboné. Ces pistes moléculaires, participant à la régulation cellulaire à un niveau très fondamental, semblent jouer un rôle important dans la vulnérabilité à la psychose. Cependant, les facteurs longitudinaux associés à l'apparition de la maladie chez ces individus vulnérables, c'est-à-dire au cours de la transition psychotique, restent peu étudiés et rien ne permet d'affirmer qu'il s'agisse des mêmes facteurs que ceux impliqués dans la psychose chronique.

Si la révolution génétique de la deuxième moitié du XXe siècle n'a pas permis de transformer la prise en charge des patients atteints de schizophrénie, c'est peut-être parce que la complexité des maladies psychiatriques n'est pas entièrement explicable par la génétique actuelle. Il est indiscutable que la schizophrénie possède une composante génétique très forte comme le démontrent les études de jumeaux avec une héritabilité estimée à 80% (14) mais il est également évident qu'il n'y a pas un gène unique responsable de la composante héréditaire de cette pathologie (15). La schizophrénie est réputée pour son héritabilité manquante et sa composante génétique implique dans certains cas des anomalies non héritées *de novo* (16). En outre, il semble que cette pathologie évolutive mette en jeu des processus biologiques dynamiques qui ne sont pas explicables uniquement par des mécanismes génétiques seuls. En effet, comment comprendre que la maladie se déclare à l'adolescence alors que le patrimoine génétique est fixé dès la conception ? Les méthodes classiques de la génétique mendélienne sont insuffisantes pour identifier des gènes causaux impliqués pour l'ensemble des formes de cette maladie et la schizophrénie est définie comme une maladie complexe mettant en jeu à la fois des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux (17). La recherche de facteurs biologiques associés à la schizophrénie est un défi qui repousse les limites de nos connaissances actuelles. L'essor de l'épigénétique au début du XXIe siècle pourrait permettre de surmonter ces difficultés. L'épigénétique, par son aspect intégratif est un bon candidat pour comprendre une pathologie complexe comme la schizophrénie. L'épigénétique, littéralement *επί* « au dessus de » la génétique, fait référence aux mécanismes permettant de moduler l'expression des gènes sans changement de la séquence d'ADN (18). L'épigénétique comme base permettant d'expliquer les interactions gène-environnement connaît un véritable engouement avec une explosion des projets de recherche et des publications ainsi qu'une nette augmentation du

nombre de journaux qui y sont consacrés, dépassant même le champ de la biologie (19). Certains auteurs ont pu décrire un véritable « imaginaire épigénétique » (20) tant cet engouement peut parfois précéder les avancées de la science, et suggèrent que les recherches dans ce domaine seraient prématurées (21). Nous pensons au contraire que l'épigénétique doit être aujourd'hui investiguée pour répondre aux défis posés par les maladies complexes comme la schizophrénie et en particulier pour expliquer son émergence.

Notre conception actuelle de la schizophrénie doit être rediscutée à l'aune des avancées biologiques. Les processus mis en jeu dans la transition psychotique semblent difficilement appréhendables par des études transversales et nécessitent des études longitudinales. Cette approche précoce pourrait être plus pertinente car il existe probablement un retentissement biologique de la chronicité de la maladie qui rend indistinguibles causes et conséquences. En outre, les changements biologiques chroniques pourraient devenir irréversibles après plusieurs années rendant illusoire toute tentative de retour à l'état initial. En psychiatrie, la prévention de la décompensation nécessite une recherche spécifique. Là encore, l'aspect plastique de l'épigénétique renforce la conviction que son étude est essentielle dans les maladies psychiatriques, qui peuvent être vues comme des maladies neuroprogressives.

Notre compréhension des mécanismes épigénétiques reste partielle pour ne pas dire limitée. Différents mécanismes ont été décrits mais leur intrication et leur impact sur le plan physiopathologique sont incertains. Ils sont au carrefour de voies biologiques complexes qui les régulent tout en étant sous leur contrôle. L'épigénétique semble sous la dépendance de facteurs génétiques, de facteurs environnementaux mais une part inconnue de ses variations est attribuée à des phénomènes stochastiques (22). Sa compréhension nécessite une approche intégrative, étudiant au cours d'un phénomène physiologique ou physiopathologique défini, l'interaction de facteurs régulant l'épigénétique (génétiques, métaboliques et environnementaux) tout en discutant les conséquences fonctionnelles de ces variations épigénétiques. Malgré les limites actuelles, ce sont ces défis que nous souhaitons relever pour tenter d'expliquer la physiopathologie de l'émergence de la schizophrénie.

Etat des connaissances

I.1 La schizophrénie, une psychose chronique et évolutive

La schizophrénie (du grec « σχιζο » qui signifie « séparer » et « φρενος » pour « esprit ») est définie par un ensemble de critères cliniques associant des symptômes positifs (délires, hallucinations...), des symptômes négatifs (repli social, perte des aptitudes...) et une désorganisation du comportement ou de la pensée. Les symptômes positifs se regroupent sous le terme de « psychose » (du grec ψυχή « âme », et -ωσις, « anomalie ») et traduisent une perte de contact avec la réalité. Des symptômes neurodéveloppementaux peuvent survenir dès la petite enfance, suivis d'une phase d'apparition de la psychose, classiquement à l'adolescence. Le mode principal d'entrée dans la maladie est insidieux avec une période prodromale pouvant durer plusieurs années. Au cours de ce mode d'entrée, les sujets à risque présentent des symptômes atténués ou limités dans le temps. Ils peuvent présenter une phase de transition vers la maladie appelée transition psychotique mais le plus souvent (deux tiers des cas), ils n'évolueront pas vers cette maladie. Cette différence d'évolution n'est actuellement pas comprise sur le plan biologique.

La question de symptômes préexistants à la psychose est une idée très ancienne. Dès la fin du XIXe siècle, Kraepelin évoque la présence d'anomalies aspécifiques présentes avant même l'apparition de la psychose (23). Kraepelin avait en effet recensé des éléments prodromaux tels que des anomalies affectives (irritabilité, oscillation de l'humeur sans raison, perte d'intérêt, hyperactivité), des anomalies sensorielles (sifflement, acouphène, illusion auditive), motrices (blocage) ou des anomalies du cours de la pensée. En 1911, Bleuler emploie le terme de schizophrénie latente pour caractériser cet état. En 1932, Mayer-Gross dans *Die Klinik der Schizophrenie* (24) reprend cette notion de prodromes. L'essor de la phénoménologie allemande dans les années 1950 permet à Klaus Conrad dans *Die Beginnende Schizophrenie* (25) de préciser ces prodromes : “ as a consequence of a deranged existential order of being, as a form of existential failure in the pursuit of life”. Les Etats-Unis ont adopté le terme “early psychosis” avant même la seconde guerre mondiale (26) comme en atteste la Lecture de Harry Stack Sullivan intitulé “The onset of schizophrenia” à la conférence de l'American Psychiatric

Association (APA) de 1927 (27). Ces notions s'exportent mal en France jusqu'aux années 1990 (28). Gerd Huber popularise ces travaux sur les prodromes et définit un regroupement de symptômes caractérisés par leur subjectivité (29). La conception d'individus présentant un état mental associé à un risque accru d'évolution vers la psychose a émergé formellement dans la littérature scientifique il y a une vingtaine d'années. Il est associé au concept de transition psychotique défini comme l'apparition de symptômes d'une intensité et d'une durée suffisante pour établir le diagnostic de psychose. Ces concepts sont de plus en plus étudiés dans le champ thématique des pathologies psychotiques. Ainsi, les données électroniques de la US National Library of Medicine National Institutes of Health nous indiquent l'évolution temporelle du nombre d'articles publiés traitant de ces concepts (figure 1.1a).

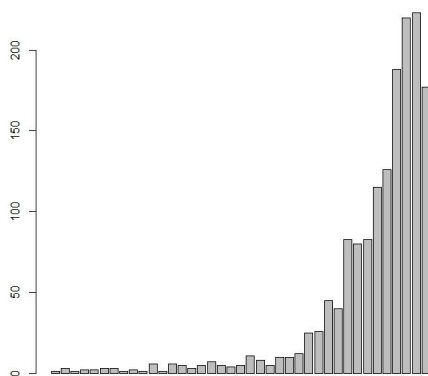


Figure 1.1a : Nombre de publications référencées dans Pubmed de janvier 1970 à juillet 2015 pour la requête :

"at-risk mental state"
OR "risk of psychosis"
OR "ultra-high risk"
OR "Clinical High risk"
OR "prodromal schizophrenia"
OR "prodromal psychosis"
OR "psychotic transition"
OR "conversion to psychosis"

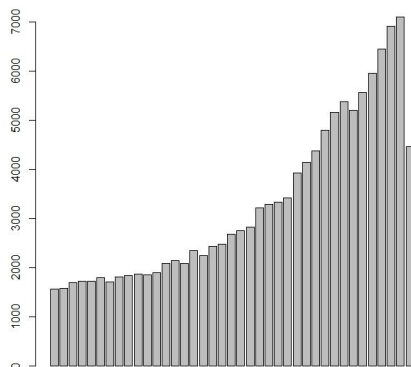


Figure 1.1b : Nombre de publications référencées dans Pubmed de janvier 1970 à juillet 2015 pour la requête :

"schizophrenia"
OR "psychosis"
OR "schizoaffective"

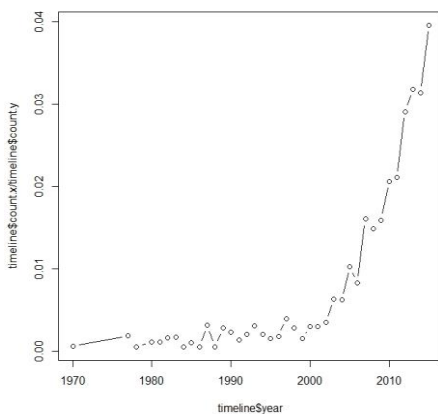


Figure 1.1c : Nombre de publications référencées dans Pubmed pour le concept d'état mental à risque et de transition psychotique rapporté au nombre de publications dans le champ thématique de la psychose entre janvier 1970 et juillet 2015.

La même analyse concernant les publications traitant de la thématique « psychose » montre que l'ensemble de la recherche dans ce champ thématique est croissante (figure 1.1b). Cependant, le nombre de publications concernant les concepts d'état mental à risque et de transition psychotique rapporté à l'évolution de la littérature sur la psychose montre que l'évolution de l'intérêt pour ces concepts est exponentielle (figure 1.1c), témoignant d'un intérêt grandissant pour ces concepts au sein de la communauté scientifique spécialisée dans les troubles psychotiques. Lors des congrès bisannuels spécifiquement dédiés à la schizophrénie (International Congress On Schizophrenia Research, Schizophrenia International Research Society Conference), de très nombreux résumés de communication orale et de posters traitant de ces concepts sont retenus suggérant que l'intérêt pour les états mentaux à risque et la transition psychotique restera élevé dans les années futures.

Les centres spécialisés dans la détection et la prise en charge de ces sujets sont répartis dans de nombreux pays, couplés souvent à des programmes de recherche. L'un des premiers programmes d'intervention précoce a été initié en 1984 en Australie au Royal Park Hospital (Melbourne). Initialement dédié à l'assistance des jeunes hospitalisés pour un premier épisode psychotique, ce programme a donné naissance à un service appelé Early Psychosis Prevention and Intervention Centre (EPPIC) à partir de 1992. Un centre de recherche baptisé Early Psychosis Research Centre a été ouvert dans la même période et s'est focalisé sur la thématique des prodromes et des prises en charge psychosociales. La prise en charge des individus à risque a été systématisée par la création de la clinique PACE en 1995. Cette équipe australienne a accueilli la première International Conference on Early Psychosis à Melbourne en 1996 qui a débouché en 1997 sur la mise en place d'un groupe d'experts internationaux regroupés dans l'International Early Psychosis Association (IEPA). En 2002, ce programme a été étendu sous le nom de Orygen qui regroupe un programme clinique et un centre de recherche dédié à la prise en charge des jeunes (15-25 ans) présentant une pathologie psychiatrique sévère (30).

Cette initiative australienne a été imitée par un programme européen intitulé EPOS : European Prediction of Psychosis Study qui consiste en une étude multicentrique longitudinale (18 mois) prospective et naturalistique (www.epos5.org). Ce programme regroupe les centres de Cologne, Berlin, Turku (Finlande), Amsterdam, Birmingham, Manchester (31) et a permis le recrutement de 250 sujets à risque investigués par des échelles cliniques et des tests paracliniques incluant des IRM et des enregistrements EEG.

Parallèlement, les Etats-Unis ont vu l'émergence au sein de l'University of California, Los Angeles du CAPPS (Center for Assessment and Prevention of Prodromal States) destinée à l'évaluation d'adolescents ayant un développement normal, de patients présentant un haut-

risque clinique de psychose et des patients au début de la maladie. Ce centre est devenu secondairement une composante du consortium NAPLS (North American Prodrome Longitudinal Study) qui regroupe 8 centres : CAAPS (UCLA), Emory University (Atlanta), Zucker Hillside Hospital (New York - Research and Prevention program), Yale University (New Haven - Prevention through Risk Identification Management and Education PRIME), University of North Carolina, Harvard University (Boston), University of California San Diego (Cognitive assessment and risk evaluation), University of California San Francisco. L'Université de Toronto associée initialement à ce consortium a été remplacée par l'Université de Calgary en 2008 pour former la NAPLS 2 soutenue par le NIMH au sein d'un programme pluri-annuel et qui a pour ambition de recruter plus de 700 individus à risque et 250 contrôles, avec des explorations en neuroimagerie, en électro-encéphalographie (EEG), sur le plan hormonal et génomique (32,33).

A Londres, le programme OASIS (Outreach and Support in South London) initié depuis 2001 (34) a pu évaluer plus de 1000 adolescents dont un tiers de patients à haut-risque de psychose et un tiers de psychotiques avec un suivi prospectif de 2 ans.

En France, l'équipe parisienne du Centre d'Évaluation pour les Jeunes Adultes et les Adolescents (C'JAAD) (35) mise en place depuis 1999 et a permis le recrutement de la cohorte PREPP puis ICAAR (Influence du Cannabis sur l'émergence de symptômes psychopathologiques des Adolescents et jeunes Adultes présentant un état mental à Risque). C'est cette cohorte ICAAR que nous avons pu explorer sur le plan biologique pour la réalisation de cette thèse (voir chapitre II pour une description). L'équipe du C'JAAD participe également au programme européen de recherche EU-GEI visant à explorer les interactions entre le patrimoine génétique et les facteurs environnementaux incluant le Work Package 5 sur les prodromes. Plus de 15 pays participent à ce programme : Pays-Bas, Royaume-Uni, Allemagne, Turquie, Espagne, France, Belgique, Grèce, Autriche, Suisse, Italie, Irlande, mais aussi des pays non européens comme Hong-Kong, Brésil, Australie (36).

Cette multiplicité des centres contribue à une meilleure compréhension de ces états mentaux à risque mais provoque des difficultés de nomenclature (UHR pour Ultra-High Risk, CHR pour Clinical High Risk, ARMS pour At-Risk Mental State), d'autant que ce concept n'est pas pleinement introduit dans les classifications internationales (37). En revanche, leur constatation à travers le monde entier suggère leur pertinence clinique, même si l'ensemble des psychoses ne surviennent pas toutes sur ce mode insidieux. Des observations rétrospectives de patients présentant un premier épisode psychotique montrent que 75% d'entre eux ont eu un contact préalable avec leur médecin traitant à propos de leurs symptômes psychiatriques (38).

Les cas de début brutal de psychose, bien que décrits, semblent donc minoritaires et l'entrée dans la psychose serait donc plus fréquemment progressif, évoluant sur de nombreuses années.

Le développement des structures médicales spécialisées et l'engouement scientifique pour ce concept d'état mental à risque et de transition psychotique s'explique par des enjeux de santé publique. La schizophrénie est une maladie chronique et lourdement invalidante survenant à un âge jeune entraînant donc une longue période d'incapacité. Or, le pronostic à long terme a été associé à la rapidité de prise en charge thérapeutique. La longueur de la période entre l'apparition des premiers symptômes positifs et l'instauration d'un traitement appelée DUP pour « duration of untreated psychosis » (figure 1.2) est associée à un moins bon pronostic clinique et fonctionnel (39).

Une DUP prolongée est corrélée à un moindre taux de rémission, à une symptomatologie plus sévère, à une augmentation des rehospitalisations et à une plus grande altération du fonctionnement social (40,41) (figure 1.3). Actuellement la DUP moyenne est d'environ 1 à 2 ans et ce retard thérapeutique est à l'origine de difficultés physiques, sociales et légales (42). L'un des enjeux concernant la prise en charge de la schizophrénie est d'intervenir le plus précocement possible. Un traitement efficace mis en place dès le premier épisode est un facteur important pour le devenir des patients (43) d'où l'idée émergente depuis une vingtaine d'années de traiter efficacement les individus avant même le premier épisode psychotique par des moyens spécifiques (44). L'objectif de cette prévention serait de différer l'apparition des troubles, d'en diminuer l'intensité et d'améliorer le pronostic fonctionnel et idéalement d'empêcher la survenue de la maladie proprement dite (13).

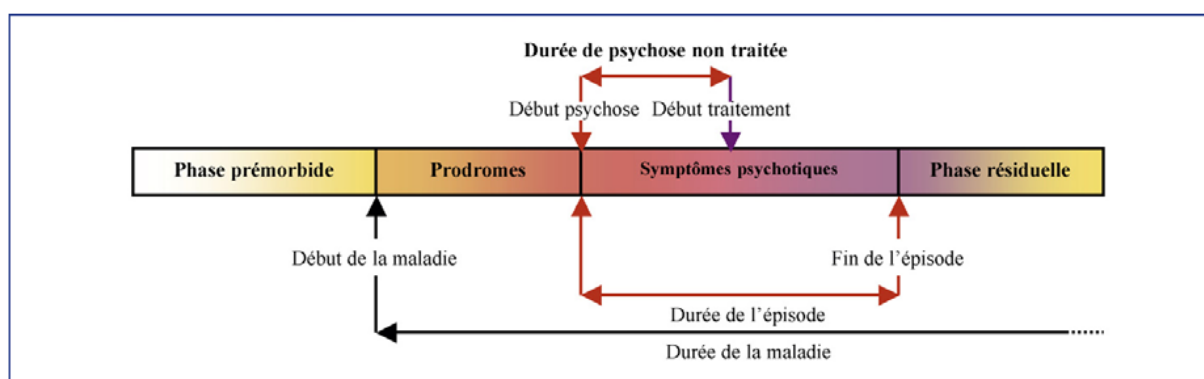


Figure 1.2 : schéma représentant l'évolution des symptômes dans la schizophrénie, adapté de Keshavan & Schooler 1992 (45)

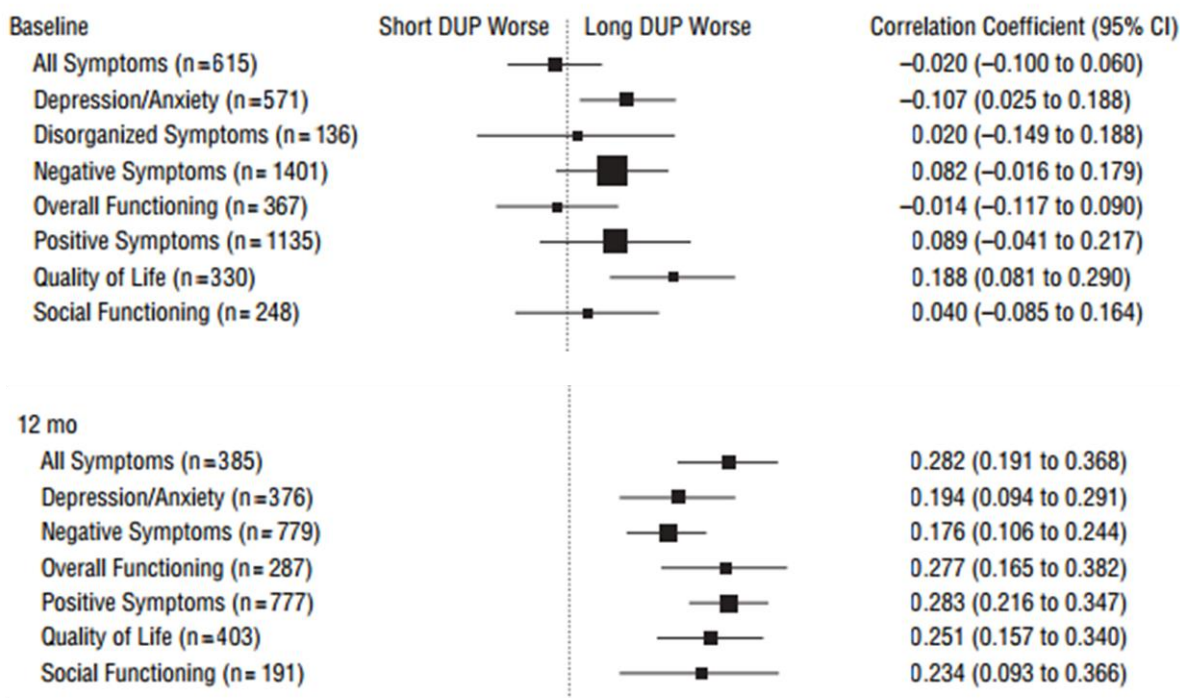


Figure 1.3 : méta-analyse extraite de Marshall et al (40) montrant l'association d'une longue durée de psychose non traitée avec un plus mauvais pronostic fonctionnel et symptomatique à 12 mois de suivi. (DUP = duration of untreated psychosis)

I.1.A Le modèle des stades cliniques dans la psychose

L'identification de stades cliniques des maladies a permis des avancées importantes en médecine. L'exemple de la cancérologie est révélateur en ce sens que chaque stade est associé à une présentation clinique particulière, à des biomarqueurs et à une prise en charge spécifique. Ce modèle est applicable pour des pathologies chroniques et progressives afin de séparer les stades précoces des stades plus tardifs.

L'histoire naturelle des pathologies psychotiques est constituée par l'évolution des individus depuis les phases précoces d'abord asymptomatiques puis présentant des symptômes aspécifiques jusqu'aux phases tardives où se révèlent les symptômes davantage identifiables et spécifiques, associés à un retentissement fonctionnel (46). La schizophrénie peut être vue comme une pathologie neuroprogressive et le modèle des stades cliniques a été proposé pour rendre compte de son évolution (47). Le modèle des stades cliniques débouche sur des hypothèses physiopathologiques (48) :

- Les mesures pathologiques doivent être davantage anormales dans les stades avancés.
- Ces mesures doivent changer de manière progressive entre les stades.
- Des traitements moins agressifs doivent être davantage efficaces dans les stades précoces.

Une autre hypothèse pourrait être celle d'une évolution par étape, les facteurs biologiques perturbés à chaque étape pouvant être radicalement différents de ceux mis en jeu à l'étape précédente ce qui impliquerait des traitements spécifiques.

Le modèle actuel distingue 4 stades (tableau 1.1) qui regroupent le simple risque théorique chez les individus à risque génétique (stade 0), le stade de la demande de soin par le patient devant des symptômes aspécifiques ou atténués (stade 1, dit prodromal), le stade du premier épisode psychotique identifié (FEP pour First-Episode of Psychosis correspondant au stade 2), le stade de la psychose proprement dite (stade 3 regroupant les psychoses affectives et non-affectives chroniques ou épisodiques) et enfin le stade d'une maladie résistante qui ne sera pas atteint par l'ensemble des patients (stade 4).

STADE CLINIQUE	DEFINITION	POPULATION DECRITE
0	Augmentation du risque de psychose ou de trouble thymique sans présence de symptômes	Jeunes apparentés au 1 ^{er} degré d'un probant
IA	Symptômes modérés et non spécifiques (symptômes anxio-dépressifs, tolérance diminuée au stress) associé à un retentissement fonctionnel modéré.	Sujets demandeurs de soins (help-seekers)
IB	Symptômes infra-liminaires associés à des déficits cognitifs modérés et à un déclin fonctionnel (GAF<70)	Sujets à ultra-haut risque de psychose (définis par la CAARMS)
II	Symptômes supra-liminaires modérés à sévères associés à des déficits neurocognitifs et un déclin fonctionnel marqué (GAF ≈ 30-50)	Premier épisode psychotique (FEP pour first-episode of psychosis) ou trouble thymique sévère
III	Rémission incomplète ou épisodes récurrents	Patients présentant une psychose chronique
IV	Pathologie sévère et persistante	Patients résistants

Tableau 1.1. Présentation des différents stades cliniques selon McGorry et al 2006 (47)

L'évolution à travers les stades de la maladie fait intervenir d'une part la vulnérabilité et d'autre part des facteurs précipitants ou protecteurs qui influencent l'évolutivité. Le passage d'un état vulnérable à un état pathologique peut être consécutif à des phénomènes externes mais également à de mécanismes internes, déterminés initialement et de révélation plus tardive. Ce débat renvoie à la question récurrente de l'inné et de l'acquis, au poids de la biologie et de l'environnement dans l'émergence de la pathologie mentale, débat qui n'est pas tranché et doit aujourd'hui être dialectiquement dépassé, notamment par l'avènement de l'épigénétique.

En outre, la question de la réversibilité ou de l'irréversibilité de cette évolution reste majeure. En effet, la conception de l'irréversibilité débouche sur une stratégie de prévention uniquement alors qu'un modèle réversible invite à chercher des thérapeutiques permettant la récupération et la rémission. La vision prévalente actuelle est que plus la maladie progresse, moins l'évolution est réversible ; en particulier, la réversibilité complète ou presque complète paraît possible chez les états mentaux à risque mais après une rechute d'un premier épisode, la rémission est plus difficile. L'espoir d'un traitement précoce voire préventif des psychoses repose sur trois conditions essentielles (42). Il est nécessaire de pouvoir détecter les individus à risque de manière fiable à un moment où la maladie n'est pas encore patente. Ces individus détectés doivent présenter un risque accru de développer une psychose. Enfin, une intervention thérapeutique doit pouvoir réduire ce risque. Les deux premières conditions sont actuellement partiellement remplies et la dernière est entièrement du domaine de la recherche.

I.1.B Définition clinique d'état mental à risque

Nous disposons de critères cliniques qui permettent d'identifier les individus présentant des états mentaux à risque et ces individus ainsi identifiés évolueront dans un tiers des cas vers une pathologie psychotique chronique (49). Ces critères cliniques sont attestés actuellement par des échelles cliniques standardisées et plusieurs groupes de patients à risque ont pu être établis pour un âge variant habituellement entre 14 et 30 ans.

On distingue les individus répondant aux critères de symptômes de base qui correspondent à des expériences subjectives ressenties comme anormales par le patient (50); les symptômes de base ne peuvent pas être détectés par l'observation du comportement ou du discours du patient et nécessitent une description par le patient lui-même. Ces symptômes

regroupent une altération des fonctions cognitives et des capacités à ressentir les émotions, une perte d'énergie, une altération des fonctions motrices, corporelles, sensorielles, et autonomes, ou encore une intolérance au stress (51). Ces symptômes sont appelés «symptômes de base» car dans l'esprit de Huber et Gross (29), ils pouvaient se présenter aussi bien de manière pré- et post-psychotique selon trois niveaux d'expression des phénomènes subjectifs : le niveau 1 où les plaintes sont non caractéristiques de la schizophrénie, le niveau 2 où elles sont accompagnées d'un vécu d'étrangeté (altération de la pensée, du langage, de la perception corporelle, de l'action motrice), le niveau 3 où les troubles correspondent aux symptômes psychotiques (délire par exemple). Ces symptômes restent aujourd'hui utilisés dans la détection précoce des états mentaux à risque et plusieurs outils psychométriques ont été développés pour les détecter : l'échelle de Bonn (« Bonn Scale for the Assessment of Basic Symptoms » BSABS, hétéro-évaluation) (52) et l'échelle de Francfort (auto-évaluation) traduite en français (53).

On distingue également les individus présentant un ultra-haut risque de psychose (UHR pour Ultra-High Risk) et qui répondent aux critères d'échelles comme la SIPS (Structured Interview for Prodromal Syndromes) ou la CAARMS (Comprehensive Assessment of At Risk Mental States). Les outils développés sont multiples (figure 1.4) mais seule la CAARMS est traduite et validée en français (54) ; c'est donc cette échelle qui a été utilisée pour l'identification des sujets de notre cohorte (voir en annexe). Parmi les sujets UHR, on distingue les individus présentant des symptômes psychotiques atténués, des symptômes psychotiques transitoires brefs et ceux combinant un facteur trait et un facteur état (personnalité schizotypique ou antécédent de psychose au 1er degré associé à un déclin fonctionnel) (tableau 1.2). Dans tous les cas, il doit exister un déclin dans le fonctionnement au cours de l'année précédente, témoignant d'une évolutivité récente du tableau clinique.

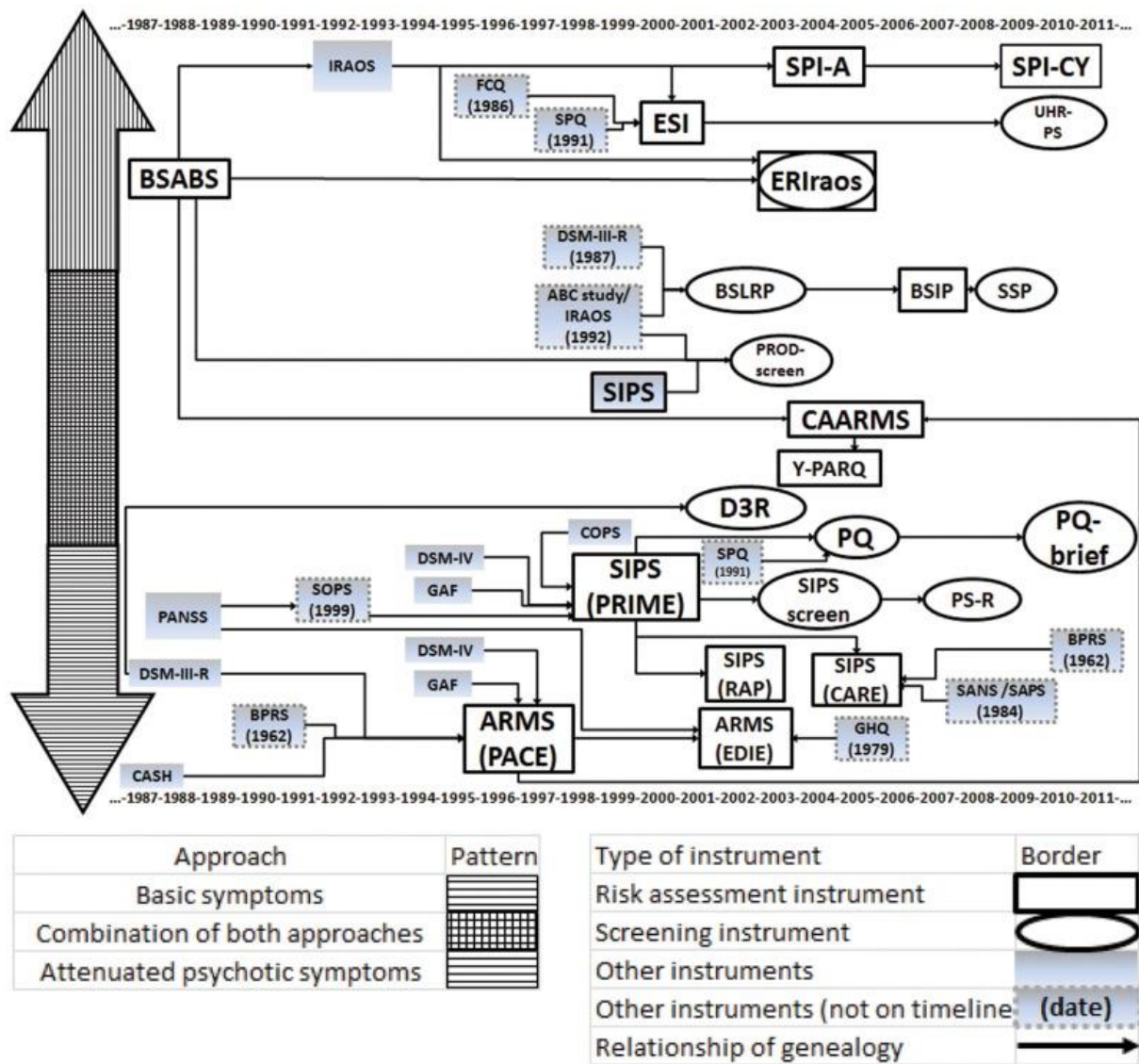


Figure 1.4 extraite de Daneault et al 2015 (55) et retraçant la genèse des différentes échelles utilisées dans la détection des stades prodromaux

Sujet vulnérable	BLIPS (Brief Limited Intermittent Psychosis Syndrome)	APS (Attenuated Psychosis Syndrome)	Psychose
Histoire familiale de psychose ou individu présentant une personnalité schizotypique	Symptômes psychotiques transitoires (< 1 semaine) avec rémission spontanée dans les sous-échelles suivantes : - Contenu inhabituel des pensées - Idées cristallisées non bizarres - anomalies perceptives - désorganisation du discours	Symptômes positifs infra-liminaires atténués soit en terme de fréquence ou d'intensité (< 1 semaine) : - Idées de référence - Pensée magique - distorsions perceptives - idées paranoïdes - troubles du cours de la pensée et du discours	Symptômes psychotiques supra-liminaires concernant les troubles de la pensée, les anomalies perceptives ou la désorganisation du discours présents plus d'une semaine et plus de 3 fois par semaine pendant plus d'une heure
ET déclin fonctionnel ou mauvais fonctionnement persistant			

Tableau 1.2 montrant les différentes catégories de sujets présentant un état mental à risque.

Ces différents critères de détection pourraient être pertinents à différents moments de l'évolution des symptômes prodromaux vers la schizophrénie (56). En effet les symptômes de base semblent apparaître plus tôt que les symptômes des UHR au cours de l'évolution. Dans une cohorte recrutée à Cologne, les symptômes de base apparaissaient dans la moitié des cas plus de 4 ans avant la transition psychotique alors que les sujets UHR convertissent plus rapidement vers la psychose (57). On pourrait ainsi distinguer un état prodromal «précoce» (EIPS pour Early Initial Prodromal State) et un état prodromal «tardif» (LIPS pour Late Initial Prodromal State) (figure 1.5) (58).

La transition psychotique correspond à l'apparition d'une psychose caractérisée chez ces individus à risque. Elle survient dans un tiers des cas au bout de 3 ans de suivi, remplissant donc le critère d'une plus grande proportion d'individus finalement atteints dans ce groupe que dans la population générale (1%) (figure 1.6). Néanmoins, comme seul un tiers des sujets à risque évoluera vers une psychose caractérisée, l'expression « état mental à risque » qui indique que tous n'évolueront pas vers la psychose est préférée à l'appellation « individu prodromique », qui suggérerait que tous évoluent vers une psychose

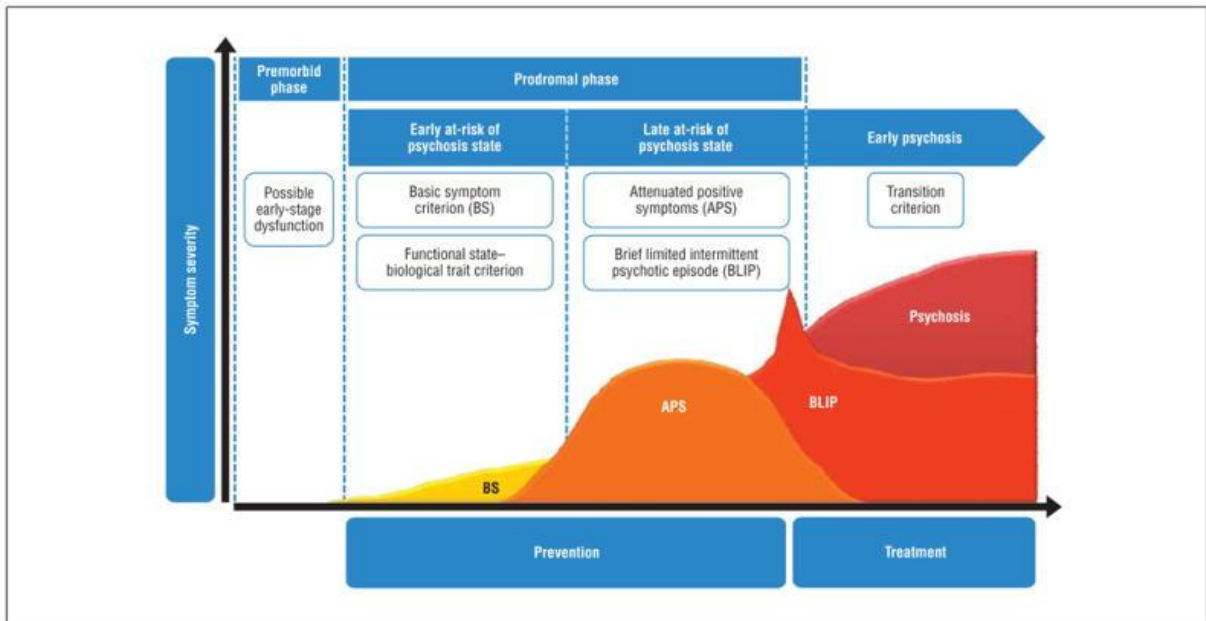


Figure 1.5 extraite de Fusar-Poli et al 2013 (58) et schématisant les stades précédant l'entrée dans la psychose

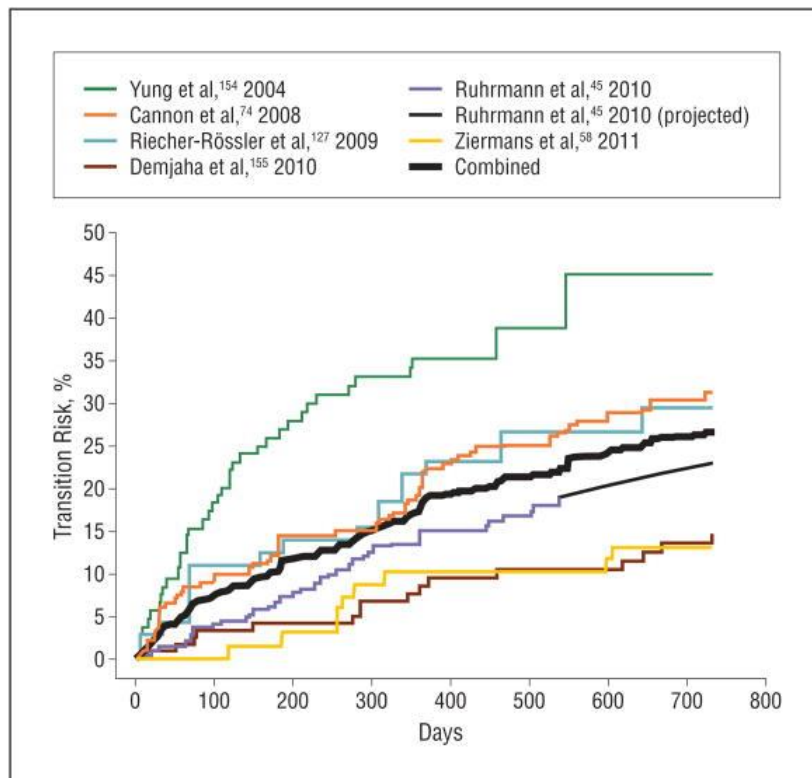


Figure 1.6 extraite de Fusar-Poli et al. (58) et montrant le taux de transition des sujets à risque au cours du suivi dans différentes études.

La transition psychotique peut-être attestée par les mêmes échelles cliniques que celles utilisées pour la caractérisation des sujets à risque et notamment par la CAARMS. La transition psychotique est définie par la présence d'au moins un des symptômes positifs (idées de référence, pensées magiques, anomalies de la perception, idées de persécution, pensées au contenu inhabituel ou discours désorganisé) à une fréquence quotidienne pendant une durée minimale d'une semaine. Cependant, dans certains cas, notamment l'installation d'une symptomatologie déficitaire, les critères DSM peuvent indiquer une entrée en psychose sans que ce seuil ne soit franchi à l'examen par la CAARMS.

I.1.C Comprendre la transition psychotique : les enjeux de recherche

De nombreux défis restent posés par cette approche clinique des états mentaux à risque (59). En termes de caractérisation de la population, il faut améliorer le dépistage des sujets à risque dans la population générale et mieux spécifier le stade évolutif où se trouve le sujet. La caractérisation des individus non transiteurs est également nécessaire mais rarement décrite. Les mécanismes conduisant à la transition psychotique sont largement inconnus, de même que ceux menant à la rémission des symptômes ou à leur aggravation. Des investigations cliniques couplées à des recherches fondamentales avant, au cours et immédiatement après la transition psychotique pourraient permettre de répondre à certains de ces défis et d'identifier des cibles thérapeutiques stoppant ou retardant l'évolution et en particulier l'apparition d'un premier épisode psychotique.

L'une des difficultés est que la définition des états mentaux à risque repose uniquement sur des critères cliniques et admet l'hétérogénéité phénotypique (60). Pour parfaire le diagnostic de ces individus, il pourrait s'avérer utile de développer d'autres critères comme des résultats aux tests cognitifs, des résultats d'imagerie ou des biomarqueurs (61). Un biomarqueur est défini comme une mesure qui quantifie un processus biologique. Il doit être précis, reproductible, acceptable pour le patient, facilement interprétable et posséder de bonnes qualités intrinsèques (sensibilité et spécificité élevées) (62). Les biomarqueurs pertinents doivent suivre l'évolution progressive de la maladie et donc être basés sur la physiopathologie (63). Ils pourraient permettre aussi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, en visant les facteurs d'évolutivité.

Seul un tiers des sujets à risque évolue vers une psychose caractérisée (figure 1.6) et cette différence d'évolution n'est actuellement pas comprise sur le plan biologique et ne peut

pas à l'heure actuelle être correctement pronostiquée. Le développement de critères pronostiques avec une bonne spécificité et une bonne sensibilité est essentiel tant sur le plan clinique, afin de recentrer les prises en charge sur les individus les plus à risque de transition que sur le plan cognitif, pour faciliter les études physiopathologiques. L'identification de ces biomarqueurs pronostiques est un enjeu fondamental pour préciser le devenir des individus et proposer des thérapeutiques ciblées pour ceux qui évolueront vers la psychose.

En effet, actuellement, aucun traitement n'a fait pleinement la preuve de son efficacité dans la prévention de la transition psychotique et la balance bénéfice risque reste largement défavorable à l'utilisation de thérapeutiques préconisées dans les stades plus avancées de la maladie (figure 1.7). Par exemple, les données de la Cochrane (64) concernant l'olanzapine montrent une inefficacité de cet antipsychotique pour prévenir la transition psychotique ; en revanche l'olanzapine a un effet secondaire important sur le poids des sujets. La balance bénéfice/risque est donc largement défavorable.

Le taux limité de transition psychotique dans les cohortes de patients UHR (30 à 40% après 3 ans de suivi) rend encore plus défavorable cette balance puisqu'il implique de traiter de nombreux sujets qui n'évolueront pourtant pas vers la psychose, les exposant ainsi à de lourds effets secondaires pour un effet bénéfique très modéré pour les futurs transiteurs. Des thérapeutiques moins délétères ont été proposées comme la supplémentation en Oméga-3 mais leur efficacité n'a pas encore été pleinement établie (13). Des thérapies cognitivo-comportementales sont proposées et leur efficacité est en cours d'évaluation mais leur multiplicité et leur coût rend difficilement généralisable leur mise en œuvre.

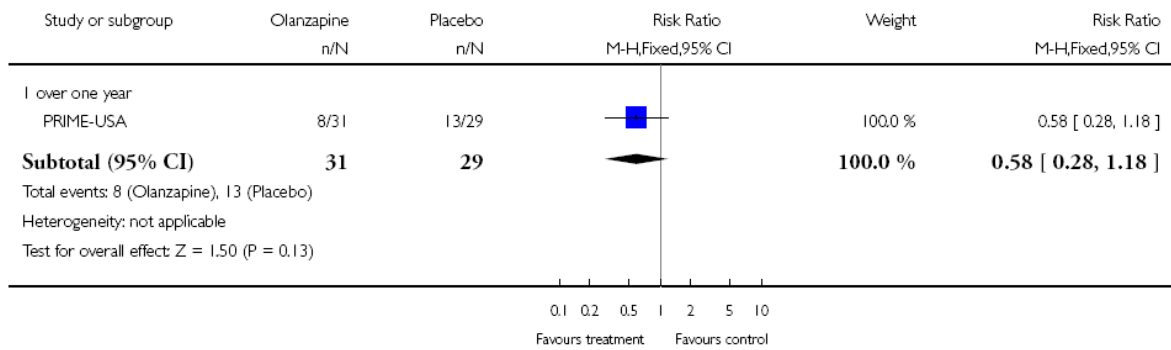
En résumé, dans le domaine biologique, les objectifs sont de déterminer des facteurs biologiques associés aux états mentaux à risque et à la transition psychotique afin d'établir des marqueurs diagnostiques et pronostiques mais aussi de mieux comprendre la physiopathologie afin de proposer des interventions spécifiques efficaces.

Analysis 1.2. Comparison 1 PHASE SPECIFIC TREATMENT (OLANZAPINE) + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE THERAPY vs PLACEBO + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE, Outcome 2 Converted to psychosis: POPS.

Review: Early intervention for psychosis

Comparison: 1 PHASE SPECIFIC TREATMENT (OLANZAPINE) + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE THERAPY vs PLACEBO + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE

Outcome: 2 Converted to psychosis: POPS



Analysis 1.12. Comparison 1 PHASE SPECIFIC TREATMENT (OLANZAPINE) + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE THERAPY vs PLACEBO + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE, Outcome 12 Adverse effects: 4. Average total weight change score (kg) - by 12 months.

Review: Early intervention for psychosis

Comparison: 1 PHASE SPECIFIC TREATMENT (OLANZAPINE) + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE THERAPY vs PLACEBO + NON-SPECIFIC SUPPORTIVE

Outcome: 12 Adverse effects: 4. Average total weight change score (kg) - by 12 months

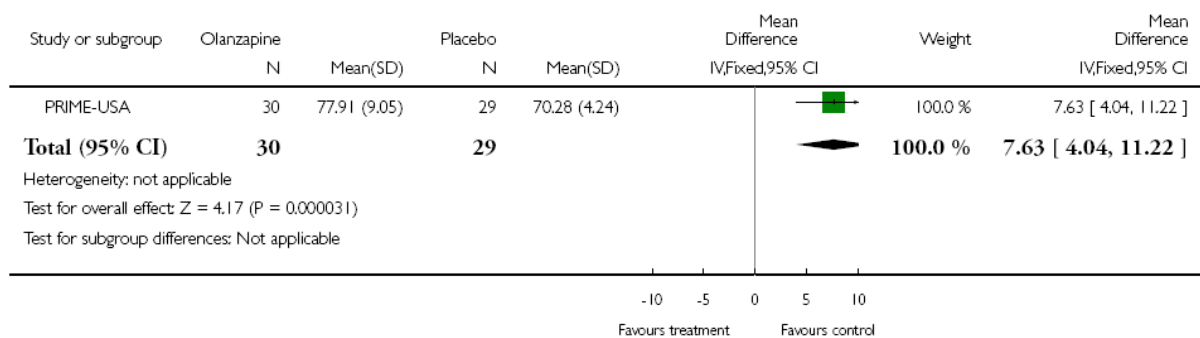


Figure 1.7 extraite de la base de données Cochrane (64) montrant l’inefficacité de l’Olanzapine sur la prévention de la transition psychotique et révélant l’effet délétère sur la prise de poids.

I.2 La théorie épigénétique de la schizophrénie

I.2.A La théorie gène x environnement

La genèse de la schizophrénie est indéniablement liée à des facteurs génétiques. Les études d'adoption montrent que le risque de troubles schizophréniques est le même chez des enfants nés de mères atteintes qu'ils soient élevés par les mères biologiques ou adoptives (65). Un jumeau homozygote d'un patient schizophrène a environ 50% de risque de développer à son tour la maladie (14). Un enfant ayant un de ses parents atteint présente un sur-risque significatif compris entre 10% et 20% de devenir lui-même schizophrène soit 10 à 20 fois plus que la population générale (figure 1.8).

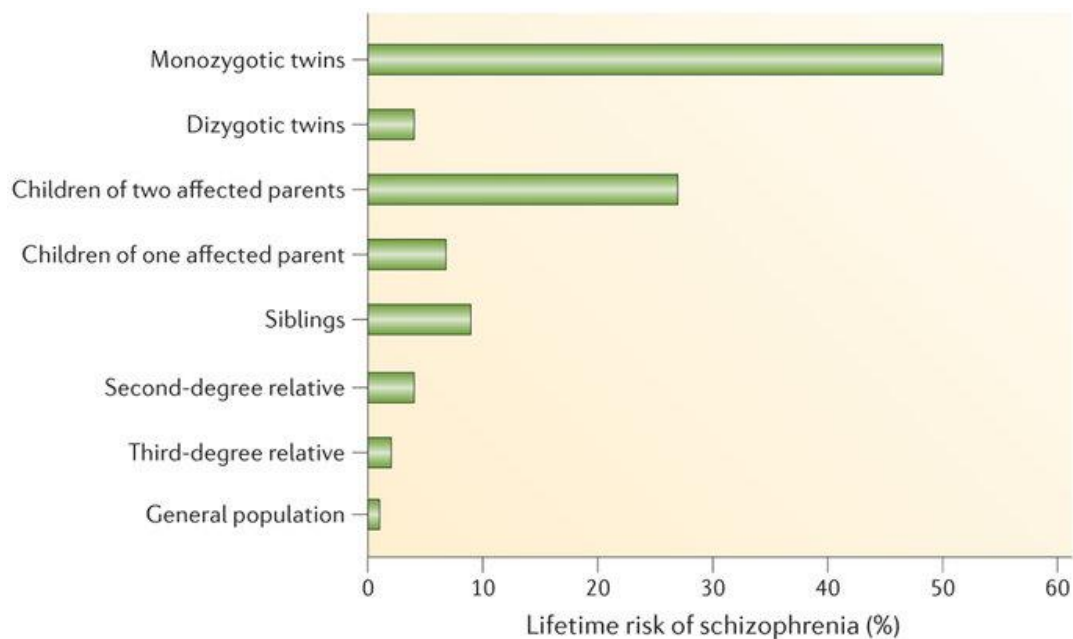


Figure 1.8 extraite de Kahn et al (11) montrant le risque de développer une schizophrénie en fonction de la présence d'apparentés eux-mêmes atteints.

Ces données montrent qu'une analyse mendélienne classique ne permet pas d'expliquer l'émergence de la psychose. La conception actuelle entre dans le cadre du modèle G x E qui suggère des interactions réciproques entre gènes et environnement. Une revue des interactions G x E connues a été publiée par Modinos et al en 2013 (66).

Ces deux facteurs gènes et environnement sont nécessaires pour expliquer l'apparition de la maladie. Ainsi, un individu présentant un risque génétique de psychose (apparenté atteint) présentera des symptômes psychotiques plus importants s'il consomme du cannabis, qu'un individu sans antécédent familial (figure 1.9)

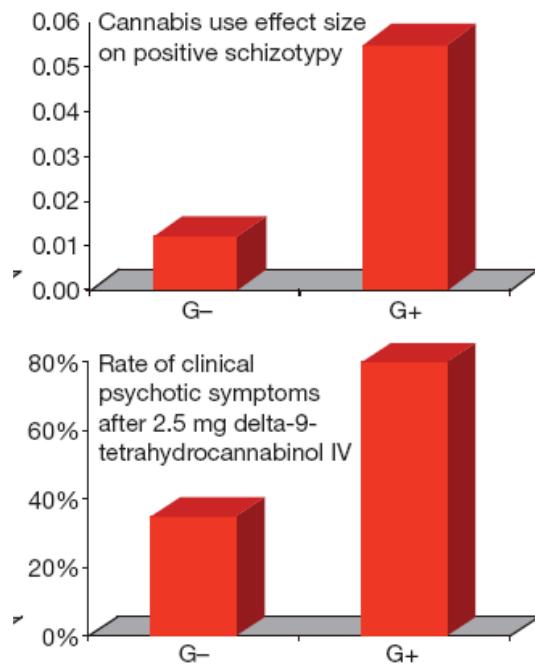


Figure 1.9 extraite de Van Os et al. (66) montrant la plus grande fréquence de symptômes psychotiques chez les individus prenant du cannabis s'ils ont des facteurs de risque génétique associés (G+ correspondant à la présence d'apparentés atteints de psychose)

Ces facteurs n'agiraient pas isolément mais en synergie, l'effet de l'un conditionnant l'autre. Par exemple, la réactivité au stress peut être modulée par certains facteurs notamment génétiques. Ainsi, les patients possédant le génotype Met/Met pour le gène de la Catécholamine-O-Méthyl-Transférase (COMT) ont une augmentation de leur symptomatologie positive et négative en réponse à un stress plus importante que les patients possédant au moins un allèle COMT Val (67). Chez des sujets sains et des patients présentant une schizotypie, le taux de cortisol salivaire augmente au cours de l'adolescence différemment en fonction du génotype de la COMT (68). Chez les patients souffrant de troubles schizophréniques, il existe une interaction entre ce génotype de la COMT et un génotype du gène codant la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR C677T) dans la réponse à un stress psychosocial (69). En outre, le patrimoine génétique d'un individu pourrait déterminer à la fois le développement d'une maladie et l'exposition à un facteur de risque : le risque d'usage du cannabis a par exemple été associé aux mêmes polymorphismes génétiques (SNP) que ceux associés au risque de schizophrénie (70). Le fait que la génétique puisse affecter la tendance des individus à sélectionner des facteurs environnementaux à haut-risque pour la maladie qu'ils présentent conduirait à une contamination de l'environnement par l'héritabilité (71).

L'intrication des gènes et des facteurs environnementaux rend difficile toute investigation univoque. La schizophrénie ne correspond donc pas à l'addition des effets génétiques et environnementaux mais est bien une maladie non-mendélienne multifactorielle (appelée aussi maladie complexe) qui fait intervenir l'interaction entre gènes et facteurs environnementaux schématisée par l'expression G x E (71). L'étiologie de cette pathologie reste encore mal connue, du fait de la multiplicité de ces facteurs ainsi que de la mauvaise compréhension de ces interactions mais l'hypothèse épigénétique est plausible pour expliquer les mécanismes de ces interactions. Cette hypothèse permettrait de dépasser les anciens modèles se heurtant à la distinction entre l'inné et de l'acquis et d'émettre une théorie uniciste des maladies psychiatriques reposant sur des bases moléculaires.

I.2.B Les différents mécanismes épigénétiques

L'épigénétique renvoie à une expression créée dès le XIXe siècle, redéfinie par le biologiste du développement Conrad Waddington (18) comme l'interaction des gènes avec leur environnement déterminant le phénotype : “the interactions of genes with their environment which bring the phenotype into being”. Depuis les années 1990, le mot désigne les mécanismes régulant l'expression des gènes sans changement de la séquence d'ADN (72). Cette appellation inclut l'ensemble des mécanismes impactant la structure de la chromatine (figure 1.10) : supra-organisation de la chromatine et attachement à la matrice nucléaire, enroulement de l'ADN autour des nucléosomes, modification covalente des queues des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation...) et méthylation de l'ADN. Un autre mécanisme modifiant l'expression des gènes correspond à la régulation par les ARN non-codants (et notamment les microARN).

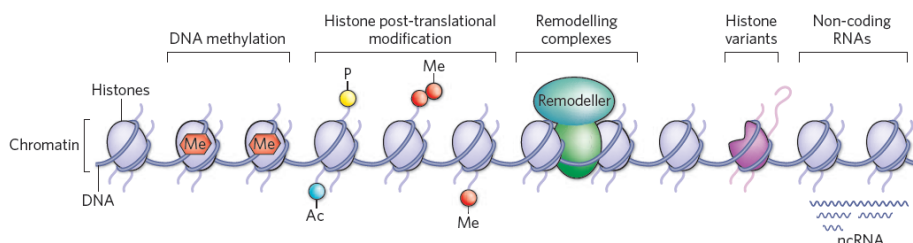


Figure 1.10 extraite de Dulac 2010 (73) et recensant plusieurs mécanismes épigénétiques décrits chez l'Homme.

L'ensemble de ces informations épigénétiques représente l'épigénome. Le panel de variations épigénétiques est très développé chez les vertébrés contribuant à l'évolution vers une complexité croissante. L'épigénome est très variable entre les cellules et détermine la spécificité tissulaire. S'il peut fluctuer au cours du temps, il possède toutefois une certaine stabilité c'est-à-dire que les informations épigénétiques peuvent être transmises au cours des divisions cellulaires que ce soit à travers la mitose et la méiose ; elles sont donc héréditaires (74). Elles ont d'abord été étudiées dans l'inactivation du chromosome X, dans l'empreinte parentale, dans le développement et la différenciation tissulaire et dans l'expression génique, en particulier les séquences rétrovirales. La possibilité d'être modifiée au cours de la vie, sous l'influence de l'environnement ou de manière stochastique, a conduit les chercheurs à étudier l'épigénome dans de nombreuses maladies humaines (71). Les mécanismes épigénétiques n'entraîneraient pas uniquement des changements durables dans l'activité des gènes mais aussi des modifications transitoires de leur transcription de manière à moduler rapidement leur activité dont dépendront des fonctions plastiques notamment les fonctions cérébrales (75,76).

I.2.B.a Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN survient sur le 5^e carbone des cytosines (formant des 5-méthylcytosines) suivies de guanine (dinucléotides CpG). Le génome humain possède environ 29 millions de CpG, réparties de manière hétérogène sur l'ensemble du génome : les CpG sont plus rares dans les introns, les régions 3' non transcrites et les régions intergéniques qu'au sein des exons et des sites d'épissage alternatif (77). Chez les vertébrés, le génome est globalement méthylé mais la méthylation survient de manière non-homogène au sein du génome : les portions méthylées incluent les éléments transposables, le corps des gènes et les portions d'ADN intergénique ; les portions déméthylées du génome (1 à 2% du génome) se retrouvent principalement dans les régions contenant de nombreuses CpG successives (îlots CpG ou CGI qui correspondent dans la moitié des cas à des sites de démarrage de la transcription de gènes ou d'ARN non codants déjà identifiés) et dans les promoteurs des gènes (dont plus de la moitié sont également des CGI –CpG islands) (figure 1.11). Les CGI sont des portions d'ADN d'environ 500 paires de bases où la fréquence des dinucléotides CpG est plus élevée que dans le reste du génome (environ 65% de GC contre 40% dans l'ensemble du génome) (78).

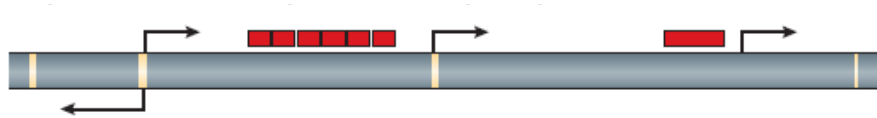


Figure 1.11 : schéma d'une portion d'ADN extrait de Suzuki & Bird 2008 (78). Les carrés rouges représentent des zones méthylées et les flèches des sites de démarrage de la transcription

Il est généralement considéré que l'hyperméthylation de régions normalement déméthylées conduirait à inhiber l'expression génique. En effet, la méthylation de l'ADN au sein des promoteurs et des CGI est inversement corrélée à l'expression des gènes adjacents : les gènes activés présentent une déméthylation de leur promoteur et leur inhibition est liée à une méthylation de leur promoteur. En revanche, la méthylation de la région codante pourrait permettre de réduire le « bruit » transcriptionnel c'est-à-dire le démarrage d'une transcription dans une portion non adéquate du gène (figure 1.12).

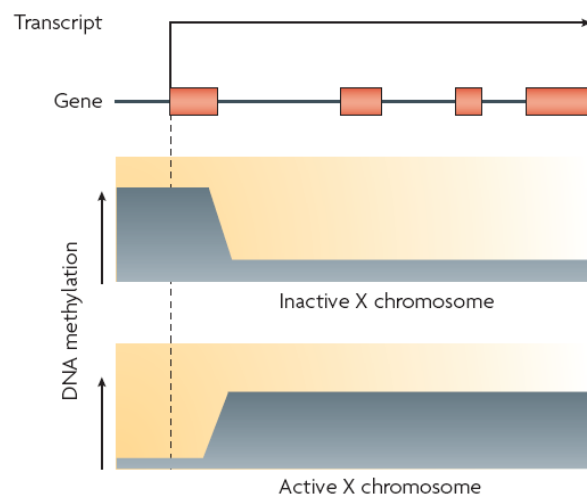


Figure 1.12 : schéma extrait de Suzuki & Bird 2008 (78) montrant le profil de méthylation d'un gène situé sur le chromosome X en fonction de l'activité transcriptionnelle.

Cependant le caractère causal de la méthylation sur l'expression n'est pas affirmé (77). En effet, des observations ont montré que certains gènes pourtant déméthylés étaient réprimés donc la méthylation n'est pas essentielle à leur répression ; des modifications de l'expression génique peuvent survenir sans modification de la méthylation du promoteur du gène correspondant. L'effet de la méthylation dépendrait du nombre de CpG présentes dans la région ; ainsi il est peu probable que la méthylation joue un rôle important au niveau des gènes possédant un promoteur pauvre en CpG. Le niveau de méthylation pourrait en fait correspondre à une simple marque consécutive à d'autres mécanismes de régulation de la transcription : le

niveau de méthylation pourrait être une conséquence de l'activité transcriptionnelle ; il a en effet été démontré que la fixation de certains facteurs de transcription pouvait conduire à une déméthylation locale. Toutefois, les corrélations entre l'activité transcriptionnelle et le niveau de méthylation restent admises.

Le maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires est assuré par l'enzyme DNMT1 alors que les DNMT3a et DNMT3b permettraient l'instauration de la méthylation de novo (figure 1.13).

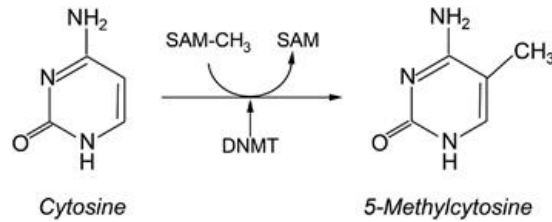


Figure 1.13 extraite de Gibney ER et al. 2010 (79) montrant la réaction chimique permettant la conversion d'une cytosine non méthylée en cytosine méthylée sous l'action d'une enzyme DNMT. (SAM = S-Adénosylméthionine ; DNMT = ADN méthyltransférase)

Les mécanismes conduisant à une méthylation de novo par les DNMT3 ne sont pas encore connus avec certitude mais plusieurs mécanismes ont été proposés (figure 1.14) :

- Reconnaissance directe de l'ADN par le domaine PWWP (contenant des motifs proline P et tryptophane W) des DNMT3
- Recrutement des DNMT3 par d'autres protéines comme les répresseurs de transcription (TF)
- Ciblage des séquences d'ADN à méthyler par des voies d'extinction de la transcription (TGS pour transcriptional gene silencing) en réponse à des signaux d'ARN interférents (ARNi)

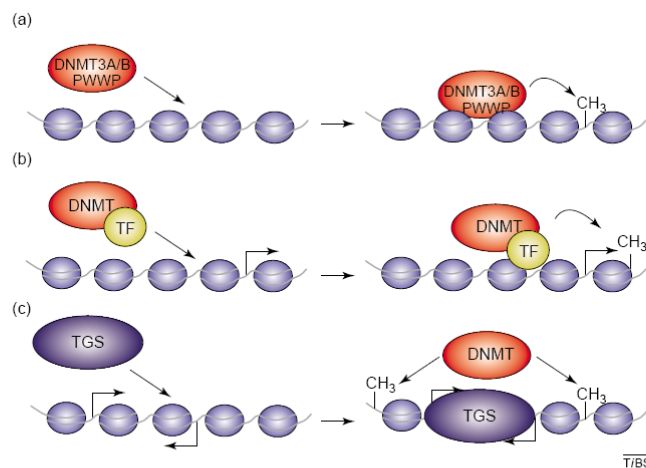


Figure 1.14 extraite de Klose & Bird 2006 (80) et schématisant les 3 mécanismes permettant la méthylation de novo de l'ADN pour les enzymes DNMT3. (DNMT = ADN méthyltransférase ; TF = facteur de transcription)

La méthylation de l'ADN au niveau du promoteur des gènes jouerait un rôle répressur vis-à-vis de la transcription des gènes en inhibant la fixation des facteurs de transcription dont les séquences ne reconnaîtraient plus l'ADN méthylé mais aussi en recrutant des protéines possédant des methyl-CpG-binding domains (MBP) (figure 1.15). Les MBP utiliseraient des co-répresseurs qui inhiberaient la transcription mais empêcheraient également le remodelage de la chromatine nécessaire à la transcription.

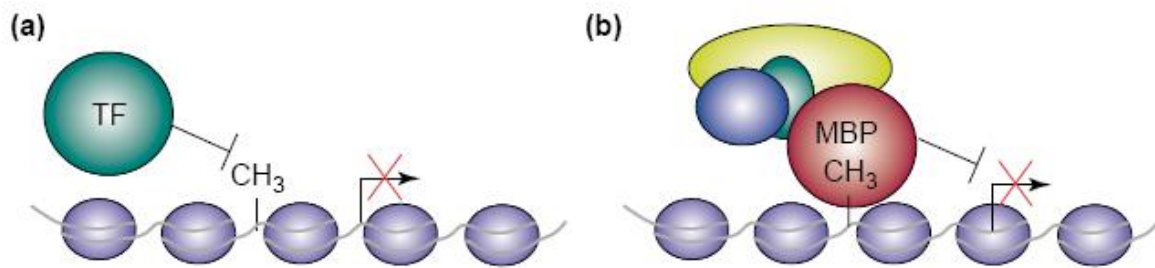


Figure 1.15 extraite de Klose & Bird 2006 (80) schématisant les hypothèses sur le lien entre méthylation de l'ADN et inhibition de la transcription.

La famille des MBP comprend MeCP2 dont des anomalies ont été associées à des troubles psychiatriques (figure 1.16 – voir également chapitre I.3.A).

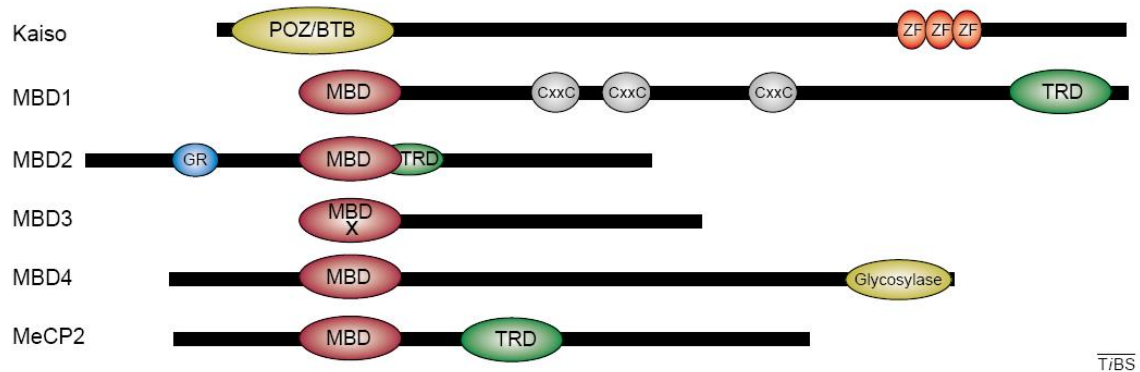


Figure 1.16 extraite de Klose & Bird 2006 (80) représentant les protéines de la famille des MBD (methyl-CpG-binding domains).

MeCP2 n'agirait pas comme un répressur global de l'expression génique mais modulerait plutôt un sous-groupe spécifique de gènes méthylés présentant une séquence A/T spécifique. Ces gènes incluent le BDNF, certains gènes induits par la réponse aux glucocorticoides (comme FKBP5) ou des gènes à empreinte parentale (81,82). La dérégulation de la transcription peut donc être relativement précise et non nécessairement globale.

En marge de ces mécanismes impliquant les promoteurs des gènes, la méthylation de l'ADN survient également au niveau du corps des gènes, dans les exons comme dans les introns, et est également associée à une diminution de l'expression des gènes. Cette diminution d'expression pourrait être liée à une répression de l'élongation de la transcription par réduction de l'accessibilité à la chromatine (figure 1.17).

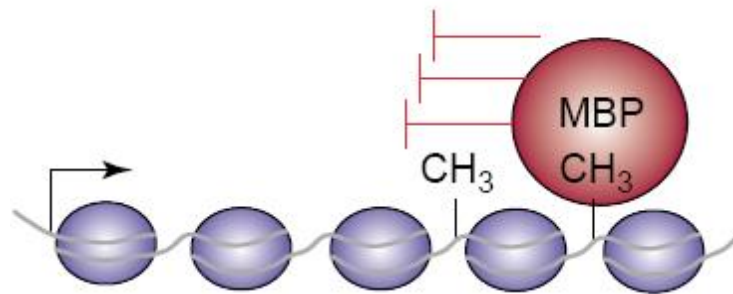


Figure 1.17 extraite de Klose & Bird 2006 (80) schématisant l'impact de la méthylation du corps des gènes dans la transcription. (MBP = protéines avec un domaine methyl-CpG-binding)

Une autre modification nucléotidique, l'hydroxyméthylation des cytosines (5-hydroxymethyl-cytosine ou hmdC) a été décrite dans le tissu cérébral (figure 1.18) ; il pourrait s'agir soit d'une modification finale soit d'une forme intermédiaire de déméthylation par la voie de l'oxydation qui pourrait permettre de réguler l'expression génique.

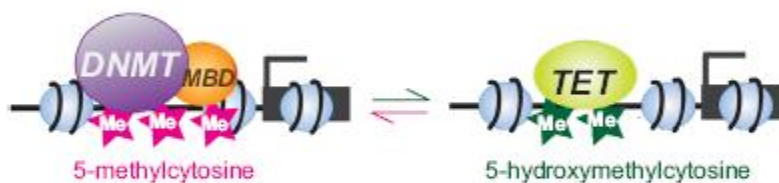


Figure 1.18 extraite de Szutorisza & Hurda 2016 (83) présentant la réaction chimique conduisant à l'hydroxyméthylation de l'ADN.

I.2.B.b Les modifications post-traductionnelles des histones

Parmi les mécanismes épigénétiques, on recense également les modifications post-traductionnelles des histones. Les histones sont des protéines localisées dans le noyau cellulaire et qui permettent de former les nucléosomes. Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine chez les eucaryotes et correspond au filament d'ADN double brin enroulé autour d'un octamère d'histones : environ 150 paires de bases d'ADN s'enroulent sur un tour trois quarts autour de deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (figure 1.19).

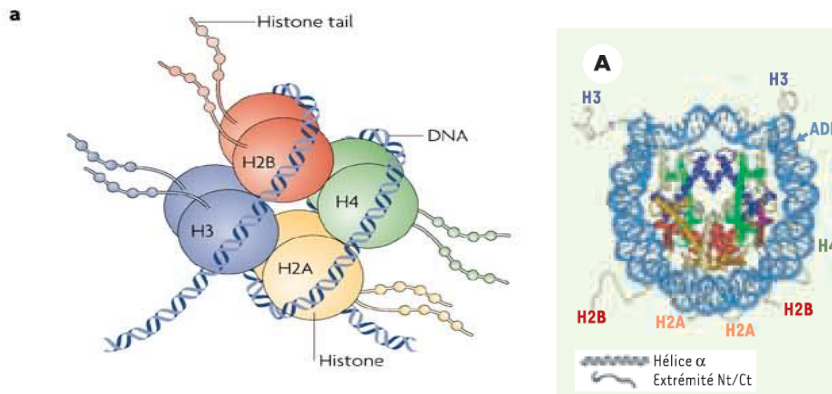


Figure 1.19 : à gauche schéma de profil de l'enroulement de l'ADN autour de l'octomère d'histones extraite de Tsankova et al 2007 (84) – à droite, représentation en vue supérieure extraite de Ray-Gallet et al 2005 (85)

Le degré de condensation de l'ADN autour des nucléosomes est variable. Il est faible dans l'euchromatine que l'on dit « ouverte » et accessible à la machinerie des ARN polymérase. Il est élevé dans l'hétérochromatine, que l'on dit « fermée » et « inaccessible » à la machinerie de transcription. Les modifications covalentes post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones (queues des histones H3 and H4), déterminées par des enzymes spécifiques régulent ce degré de condensation. Ces modifications peuvent comprendre acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation, sumoylation, biotinylation et ADP ribosylation et agiraient le plus souvent en se combinant les unes aux autres (figure 1.20).

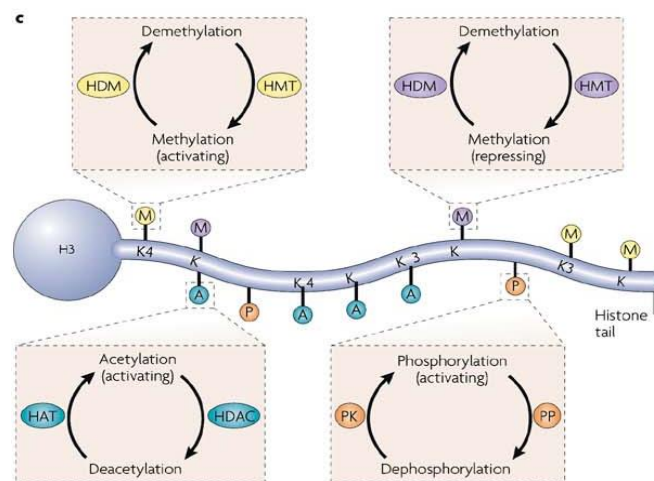


Figure 1.20 : schéma des différentes modifications post-traductionnelles des histones extrait de Tsankova et al 2007 (84)

Outre la régulation de la compaction de l'ADN (action en cis), les modifications des histones pourraient également agir comme un code (le « code des histones ») (86) permettant

le recrutement de protéines capables de modifier la structure de la chromatine (action en trans) (figure 1.21).

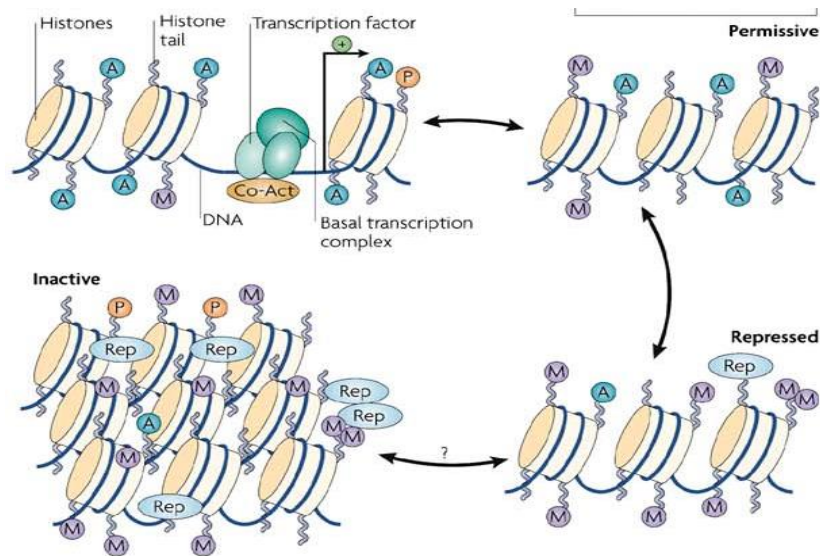


Figure 1.21 extraite de Tsankova et al 2007 (84) schématisant le rôle du code histone dans la régulation de la transcription. (Rep = repressueur de la transcription ; Co-Act = co-activateur de la transcription ; A = acétylation ; M = méthylation ; P = phosphorylation)

La chromatine non active présente typiquement des niveaux d'acétylation faibles alors que les marques d'activité de la transcription correspondent à une hyperacétylation. L'acétylation des histones survient au niveau des résidus lysines. L'ajout d'un groupe acétyl impulse une charge négative à l'acide aminé ce qui tend à faciliter un relâchement localisé de la chromatine. L'acétylation favorise la transcription par au moins deux mécanismes différents : en favorisant une conformation chromatinienne plus ouverte permettant la machinerie de transcription d'accéder à l'ADN, en servant directement comme sites de reconnaissance pour des facteurs augmentant la transcription. Les niveaux d'acétylation des histones sont contrôlés par deux familles de protéines d'actions antagonistes : les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC) (figure 1.26). Une HAT catalyse le transfert d'un groupe fonctionnel acétyl de l'acétyl-coenzyme A à une lysine située sur une histone. Cette réaction est reversée par les HDAC qui seraient impliquées dans l'inhibition de la transcription.

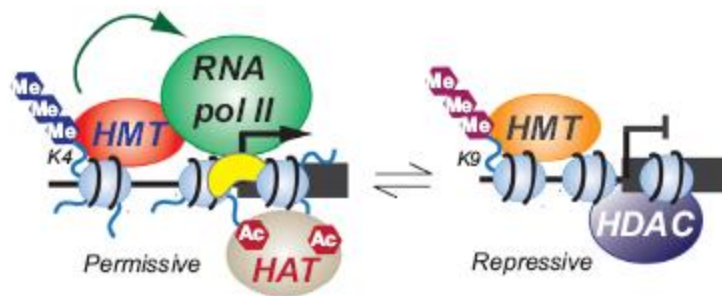


Figure 1.22 : schéma extrait de Szutorisz & Hurd (83) montrant la réaction chimique permettant l'acétylation des histones. (HDAC = histone désacétylase ; HAT = histone acétyltransférase ; K = lysine ; RNA pol II = ARN polymérase II ; Ac = groupement acétyle ; Me = groupement méthyle ; HMT = histone méthyltransférase)

I.2.B.c Les micro-acides ribonucléiques

La régulation par les microARNs est un troisième mécanisme épigénétique. Les microARNs correspondent à des ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides et qui régulent l'expression des gènes possédant une séquence 3' UTR complémentaire de leur séquence. En se fixant sur le transcrite de ces gènes, ils génèrent un ARN double brin qui sera dégradé par la cellule conduisant ainsi à une extinction post-transcriptionnelle (figure 1.23).

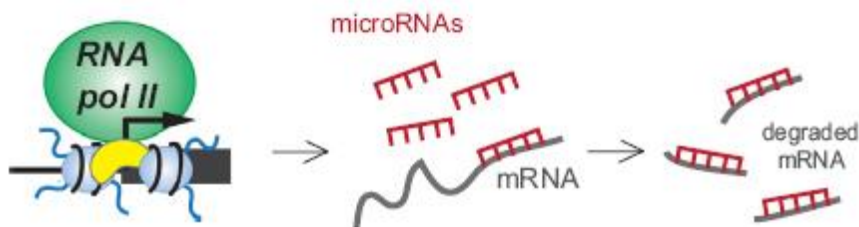


Figure 1.23 : schéma extrait de Szutorisz & Hurd (83) montrant l'action des miARN

Il existe des maladies psychiatriques associées à des défauts de production de ces miARNs. Ainsi, dans le syndrome de Di George associée à la schizophrénie, le gène DGCR8 permettant la synthèse des pré-miARN est délété (déletion 22q11) (87).

I.2.B.d Interaction entre processus épigénétiques

Des interactions entre ces différents mécanismes épigénétiques ont été décrites (88). En effet, les DNMT, en plus de leur activité méthyltransférase, peuvent se lier avec les HDAC et les HMT (histone méthyltransférases). L'addition d'un groupement méthyle pourrait être couplé à des modifications d'acétylation des histones et aboutir à la répression indirecte de la transcription (figure 1.24).

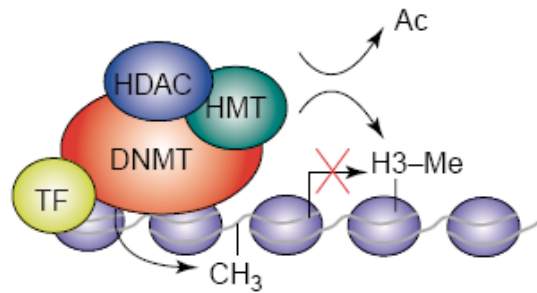


Figure 1.24 extraite de Klose & Bird 2006 (80) schématisant les interactions entre enzymes impliquées dans les mécanismes épigénétiques.

Il existerait également un couplage entre méthylation de l'ADN et méthylation des histones par la protéine MBD1 (figure 1.25 – voir également figure 1.16).

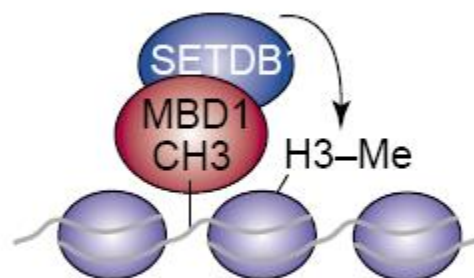


Figure 1.25 extraite de Klose & Bird 2006 (91) montrant le rôle possible de MBD1 dans la méthylation conjointe de l'ADN et des histones.

D'autres acteurs comme les heat-shock factors (HSF) pourraient également être impliqués dans le couplage de plusieurs modifications épigénétiques en réponse à des stimuli variés (89) : ces facteurs de transcriptions sont au carrefour de la régulation du remodelage de la chromatine, des enzymes modifiant les histones et de la synthèse des ARN non-codants.

I.2.B.e Dynamique de l'épigénome

L'épigénétique, située à l'interface entre l'environnement et la génétique, possède la caractéristique d'être plastique. Les facteurs environnementaux impliqués dans les modifications épigénétiques sont divers, regroupant des facteurs nutritionnels, chimiques et physiques : régime alimentaire, composés xénobiotiques (notamment les drogues et les toxiques), radiations à faible dose, exercice physique, indices comportementaux notamment le comportement maternel (74). La première mise en évidence de la modification de l'épigénome par des facteurs psychosociaux a été décrite chez le rat (90). Depuis, ces modifications épigénétiques sous l'influence des rapports psychosociaux ont été étudiées chez l'homme mais les résultats ne sont pas encore définitifs (91). Une accumulation de données suggère que les processus épigénétiques peuvent être influencés par l'exposition à des facteurs d'environnement d'une manière globale ou au niveau de certains loci spécifiques (92). L'épigénome est particulièrement sensible aux perturbations durant des fenêtres développementales clefs, surtout en période prénatale caractérisée par une division cellulaire rapide et la mise en place des signaux épigénétiques standards qui guideront le développement et la différenciation tissulaires (93). D'autres périodes critiques de développement existent pendant la période post-natale et notamment à l'adolescence. L'environnement maternel post-natal semble avoir une influence directe sur les profils de méthylation de plusieurs gènes notamment le gène codant pour les récepteurs aux glucocorticoïdes (94). L'environnement peut donc avoir un impact sur l'épigénome lors de ces périodes mais aussi durant l'âge adulte et même dans les neurones matures (95).

L'épigénome peut également se modifier en l'absence de facteurs environnementaux de manière stochastique. Durant la mitose, le profil de méthylation de l'ADN est transmis de la cellule mère à la cellule fille avec un degré de fidélité 10^3 fois plus faible que pour la réplication de l'ADN : le taux d'erreur est de $1/10^6$ concernant la réplication de l'ADN et de $1/10^3$ concernant la transmission des marques épigénétiques (71). Ainsi, au cours des divisions cellulaires, des différences épigénétiques s'accumulent conduisant à des épimutations et pouvant générer des variations dans l'expression des gènes correspondant.

Ces modifications épigénétiques sont déterminantes pour la plasticité du tissu cérébral dans lequel la multiplication cellulaire est quasi-inexistante. L'implication de modifications de l'épigénome ont été démontrées dans plusieurs mécanismes cérébraux notamment le neurodéveloppement, le renforcement des connexions synaptiques (potentialisation à long terme) mais aussi des processus plus intégrés comme la mémoire, la mise en place des

addictions ou des processus exécutifs permettant le contrôle comportemental (73). Des anomalies épigénétiques existent dans les pathologies neuropsychiatriques.

I.2.C Les modifications épigénétiques dans la schizophrénie

L'intérêt pour les explorations épigénétiques en psychiatrie est récent. La première publication évoquant cette hypothèse dans la schizophrénie remonte à 1975 (96) ; s'intéressant à l'ultra-structure de la chromatine dans les neutrophiles de 10 patients schizophrènes comparés à 10 contrôles, Issidorides et al. ont conclu que l'hétérochromatine des schizophrènes était moins compacte ce qui pourrait traduire une plus grande sensibilité des histones H1 aux signaux de décondensation ; les auteurs postulent que cette sensibilité pourrait être liée à une augmentation de la phosphorylation de ces histones. Cette découverte, associant des anomalies primaires de l'épigénétique à la schizophrénie a ouvert la voie à d'autres explorations qui se sont perfectionnées en suivant l'évolution des découvertes et des techniques d'exploration de l'épigénome. L'année 2002 marque un essor des études consacrées à la mise en évidence d'une perturbation épigénétique dans la schizophrénie.

Les premières études qui se sont intéressées au rôle des modifications de la méthylation de l'ADN dans les psychoses ont exploré des gènes candidats. Ainsi des anomalies de méthylation des gènes COMT, RELN, DRD2 et SOX10 ont été rapportées chez des sujets atteints comparativement à des contrôles en utilisant des méthodes de PCR méthylation spécifique et/ou de séquençage après traitement au bisulfite. Cependant, ces études sont restées limitées et n'ont pas toujours été reproduites. Désormais les paradigmes reposent davantage sur une approche pan-génomique. L'utilisation de paires de jumeaux discordants pour le phénotype psychotique est une approche très intéressante pour la détection d'épimutations associées à la maladie car elle permet une comparaison des profils méthylomiques de deux séquences d'ADN identiques (97).

Les mécanismes épigénétiques les plus explorés dans la psychose sont les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et les miARN (98). La bibliographie systématique réalisée par Teroganova et al. (99) montre une succession d'études disparates concernant la méthylation dans les tissus périphériques chez les schizophrènes sans possibilité de méta-analyser les données en raison de la grande hétérogénéité des techniques utilisées.

En revanche, les explorations épigénétiques dans la transition psychotique sont inexistantes dans la littérature. Nous avons participé à une revue de la littérature sur les découvertes épigénétiques dans la schizophrénie (**article en annexe**).

I.3 L'origine des modifications épigénétiques

Ces modifications épigénétiques à long-terme peuvent survenir de manière aléatoire (modifications primaires) ou après un signal transitoire et persistant à distance de ce signal (modifications secondaires). La part des changements stochastiques par rapport aux changements induits par l'environnement n'est pas connue. Il est probable que des variations tels que les polymorphismes au niveau des gènes codant les enzymes impliquées dans le maintien de l'épigénome (**article en annexe**) ou la disponibilité des co-facteurs impliqués dans la synthèse des groupements méthyles jouent un rôle.

I.3.A L'implication de la machinerie épigénétique

L'épigénétique est un concept regroupant des mécanismes biologiques variés, et l'altération de certaines fonctions peut conduire à des pathologies. Les maladies liées à un défaut primaire des mécanismes épigénétiques peuvent être regroupées sous le nom d'épigénopathies. On distingue notamment les pathologies liées à une dérégulation de la méthylation de l'ADN, les pathologies liées à des anomalies de la régulation post-transcriptionnelle des histones, les pathologies liées à des anomalies d'épissage des ARNm et à la maturation et la dérégulation des miARNs (100). Les protéines intervenant dans les processus épigénétiques peuvent être divisées en 3 catégories : les protéines « writers » à l'origine des modifications, les protéines « erasers » qui effacent les modifications précédentes et les protéines « readers » qui repèrent les modifications et déclenchent des modifications biologiques (variation de la transcription par exemple) (figure 1.26).

Les mécanismes épigénétiques sont cruciaux pour le développement cérébral. Longtemps imaginés comme restreints aux cellules en division, ces mécanismes ont en réalité un rôle crucial dans le fonctionnement neuronal (101). Outre le développement cérébral, ces mécanismes permettent la plasticité. L'activité neuronale peut en effet modifier l'épigénome des neurones et ces modifications épigénétiques peuvent en retour influencer les futures réponses neuronales. Leur implication dans le fonctionnement mais aussi les dysfonctionnements cérébraux est donc patent. Des anomalies concernant les différents gènes impliqués dans la régulation épigénétique (appelés ensuite « gènes de l'épigénétique ») ont été décrites dans de nombreux troubles neuropsychiatriques (figure 1.27).

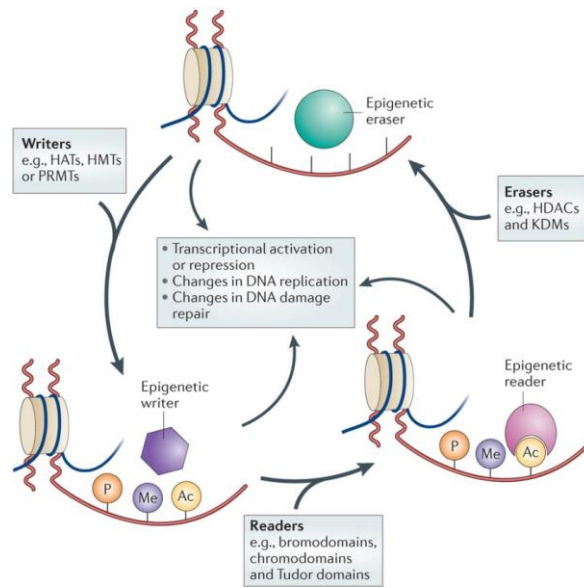


Figure 1.26 extraite de Falkenberg & Johnstone 2014 (102) schématisant les différents types de protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques.

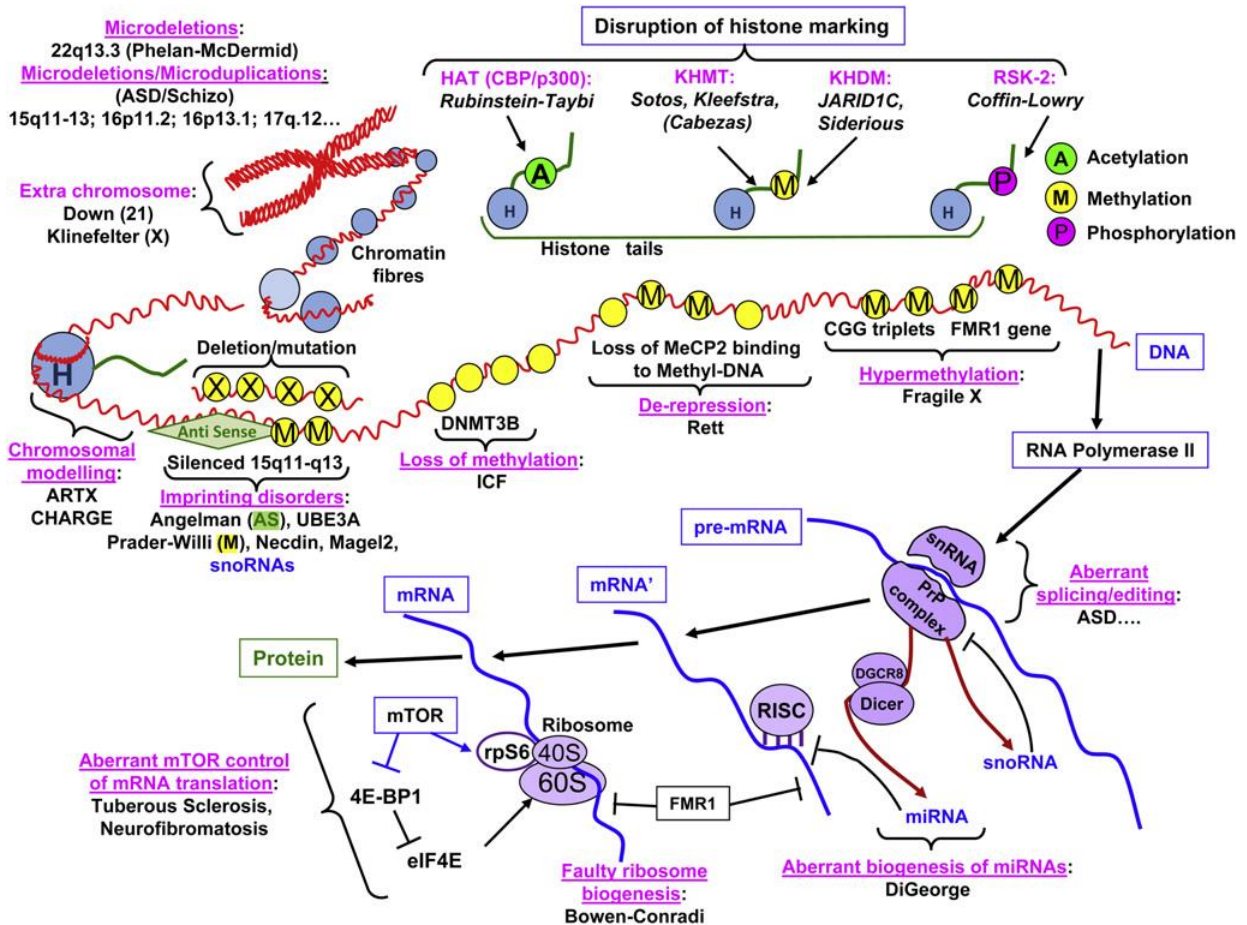


Figure 1.27 extraite de Millan 2013 (100) schématisant les processus épigénétiques altérés dans différentes pathologies neuropsychiatriques.

Les gènes de l'épigénétique sont impliqués dans de nombreuses fonctions cognitives. En particulier, la méthylation de l'ADN a été impliquée dans les processus de plasticité et les changements synaptiques (103). L'enzyme ADN méthyltransferase 3B (DNMT3B) qui impacte la méthylation de l'ADN présente des polymorphismes qui ont été associés à des variables neurocognitives et psychopathologiques. Par exemple, le rôle des polymorphismes de la DNMT3B sur le QI et la mémoire de travail en lien avec des variations environnementales a été proposé. Les DNMTs, dont les activités sont généralement connues pour être étroitement liées aux mitoses avec les niveaux les plus importants observés durant le développement précoce, sont aussi fortement exprimées dans les neurones du système nerveux central adulte (104). De plus, la méthylation de l'ADN semble être variable dans le cerveau adulte et liée à l'induction de plasticité synaptique et à la formation de la mémoire associative (105).

Le tableau 1.3 (non exhaustif – pour une revue complète voir Kleefstra et al 2014 (106)), construit manuellement à partir de la base de données OMIM, résume les affections liées à des anomalies dans les principaux gènes épigénétiques à l'origine de pathologies neurodéveloppementales et psychiatriques. En particulier, des cas de schizophrénie ont été mis en lien avec des gènes codant pour l'épigénétique. Parmi les gènes dont des mutations ponctuelles ont été récemment identifiées dans la schizophrénie, on trouve le gène SETD1A qui est un composant d'un complexe histone méthyltransferase (HMT) permettant la méthylation du résidu Lysine 4 de l'histone 3 (107).

En outre, des voies métaboliques conduisant à des produits nécessaires pour la conservation ou la modulation de l'épigénome peuvent également être impliquées dans des pathologies psychiatriques. C'est le cas du métabolisme mono-carboné qui produit les groupements CH₃ pour permettre la méthylation de l'ADN. L'apport par voie alimentaire de certains composés notamment vitaminique est également essentiel à la machinerie épigénétique (108).

Mécanismes	Gènes impliqués	Anomalie génétique	Implications cliniques
Méthylation de l'ADN	DNMT1	SNV	Neuropathie, surdité, ataxie cérébelleuse, narcolepsie et démence précoce
	DNMT3A	SNV	Syndrome Tatton-Brown-Rahman associant une grande taille, des anomalies faciales et un retard mental
	DNMT3B	SNV	Syndrome ICF (immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies) sans retentissement neuropsychiatrique
Acétylation des histones	HDAC4	SNV - délétion	Brachydactylie et retard mental
	HDAC6	SNV Lié à l'X	Chondrodysplasie avec platyspondylie, brachydactylie, microphthalmie et hydrocéphalie
	HDAC8	anomalie d'épissage de l'exon 2	Syndrome de Wilson-Turner associant un retard mental, des anomalies faciales et chez l'homme, une gynécomastie et un hypogonadisme
	HDAC8	SNV	Syndrome Cornelia de Lange avec un déficit intellectuel variable
	KAT 3A (CREBBP)	del16p13.3 et SNV	Syndrome Rubinstein-Taybi associant une microcéphalie, des pouces et hallux larges, un retard de croissance, un déficit intellectuel et un comportement atypique avec hypersociabilité, fluctuations thymiques et TOC
	KAT6A (MOZ)	SNV	Retard mental autosomique dominant 32
	KAT6B (MORF)	SNV	Syndrome Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson (SBBYS) et syndrome genito-patellaire associant une hypoplasie rotulienne et un retard mental

Méthylation des histones	EHMT1 (KMT)	del9p34 et SNV	Syndrome de Kleefstra associant un retard mental sévère, une hypotonie, une microcéphale et une épilepsie
	KDM5C (JARID1C)	SNV Lié à l'X	Syndrome Claes-Jensen associant une microcéphalie et un retard mental
	KDM6A	SNV	Syndrome Kabuki associant une dysmorphie faciale, des anomalies squelettiques, un déficit intellectuel léger ou modéré et un retard de croissance postnatal
Régulation des miARN	DGCR8	del22q11	Schizophrénie, TOC

Tableau 1.3 construit à partir de la base de donnée OMIM et recensant les gènes de l'épigénétique impliqués dans les pathologies humaines (en particulier les pathologies neurodéveloppementales)

L'appellation SNV (Single Nucleotide Variant) regroupe dans ce tableau des mutations ponctuelles et des indels.

Plusieurs hypothèses physiopathologiques concernant la schizophrénie ont conduit à étudier le métabolisme du cycle monocarboné (C1). En effet, cette voie métabolique est un « hub » central, nécessaire à de nombreuses fonctions (109). Son interaction avec les voies régulant certains neurotransmetteurs (glutamate, dopamine) a été démontrée. Elle est également impliquée dans les mécanismes mitochondriaux (figure 1.28), les voies biologiques du stress oxydatif et de l'inflammation qui ont été décrites dans les pathologies psychiatriques (110). D'autres arguments existent en faveur de l'implication du métabolisme de l'homocystéine et plus généralement du métabolisme monocarboné dans la psychose. MTHFR est une enzyme clef de ce métabolisme qui catalyse la production du 5-méthyltétrahydrofolate, un substrat pour la re-méthylation de l'homocystéine en méthionine (figure 1.29). Une méta-analyse récente suggère une vulnérabilité génétique au niveau du gène codant pour MTHFR chez les patients atteints de schizophrénie, trouble bipolaire et dépression unipolaire, vulnérabilité qui affecterait le métabolisme de l'homocystéine et par un effet global la régulation épigénétique (111). En outre, MTHFR a également été associé à une réponse pathologique au stress psychosocial (69).

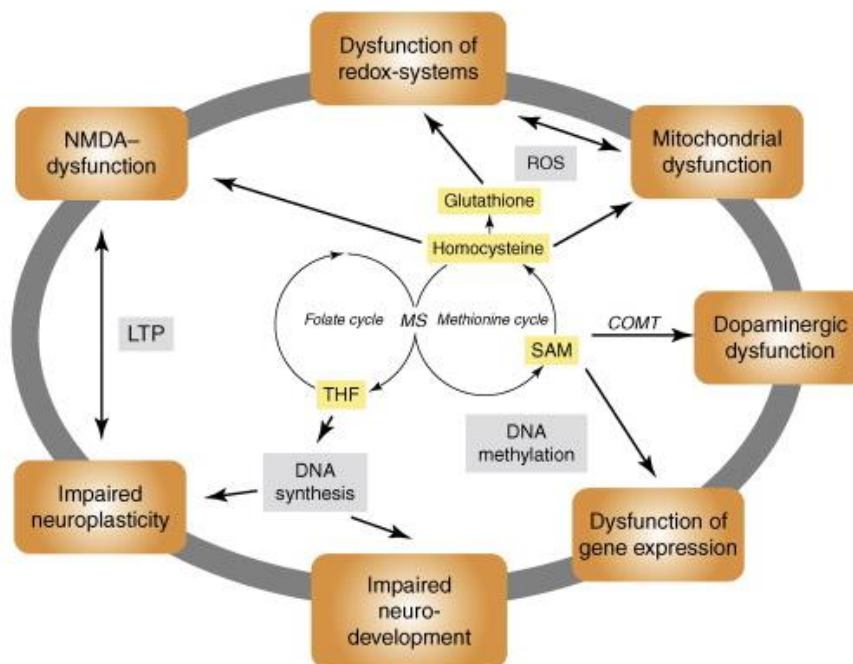


Figure 1.28 extraite de Krebs et al 2009 (141), montrant l'importance du métabolisme monocarboné dans des fonctions essentielles au fonctionnement cérébral.

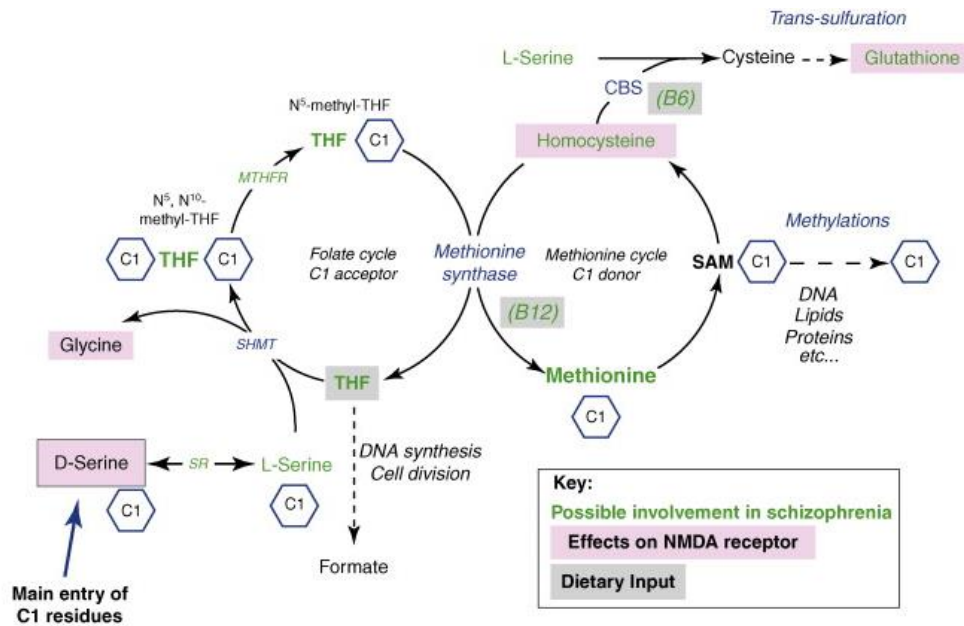


Figure 1.29 extraite de Krebs et al 2009 (141) schématisant le fonctionnement du métabolisme monocarbone et l'organisation en deux cycles (un cycle donneur de C1 et un cycle accepteur de C1).

L'implication du métabolisme du C1 dans la schizophrénie pourrait expliquer pourquoi l'ajout de L-méthionine (convertie en SAM, S-adenosyl-L-méthionine, dans l'organisme) a pu entraîner une aggravation des symptômes psychotiques chez des patients (112). Des taux anormaux du produit de dégradation de la méthionine, l'homocystéine, ont été retrouvés chez des patients schizophrènes (113). Des taux élevés d'homocystéine durant la grossesse pourraient également agir comme facteur de risque pour la schizophrénie dans la descendance (114).

I.3.B L'impact de l'environnement

La schizophrénie est une maladie complexe dont la physiopathologie ne peut se résumer à des facteurs génétiques. Son émergence nécessite la présence de facteurs environnementaux. Pour identifier ces facteurs environnementaux, des études épidémiologiques ont été nécessaires (115). Elles ont permis d'identifier différents facteurs, peu spécifiques, associés à la maladie. Cependant ces études sont soumises à des facteurs confondants et notamment au risque d'attribuer l'effet d'un facteur environnemental à un autre ; le plus souvent les facteurs

environnementaux identifiés correspondent à des « proxies ». De plus, l'interaction G x E n'est pas unidirectionnelle et le plus souvent ces études ne tiennent pas compte du poids de la génétique qui peut pourtant déterminer la rencontre avec le facteur environnemental ou médier son effet. Ainsi, le calcul du score polygénique dans une cohorte de patients schizophrènes a été appliqué à une cohorte de patients consommateurs de cannabis et des résultats significatifs ont associé ce score à l'expérimentation du cannabis ($P = 2.6 \times 10^{-4}$), ainsi qu'à la quantité absorbée ($P = 3.0 \times 10^{-3}$) (70). Un haplotype dans le gène CNR1 a été associé à la protection contre les effets psychotomimétiques du cannabis (116).

Concernant l'identification des facteurs environnementaux, une simple association statistique ne suffit donc pas à affirmer son implication dans la physiopathologie de la maladie et le lien causal nécessite des arguments scientifiques adéquats. Il s'agit d'établir entre les symptômes et le facteur environnemental un lien « dose/effet », une séquence temporelle logique et une plausibilité socio-biologique (115).

Selon cette méthodologie, plusieurs facteurs environnementaux ont pu être identifiés dans la schizophrénie. L'exposition à ces facteurs pourrait survenir de manière précoce ou retardée (figure 1.30).

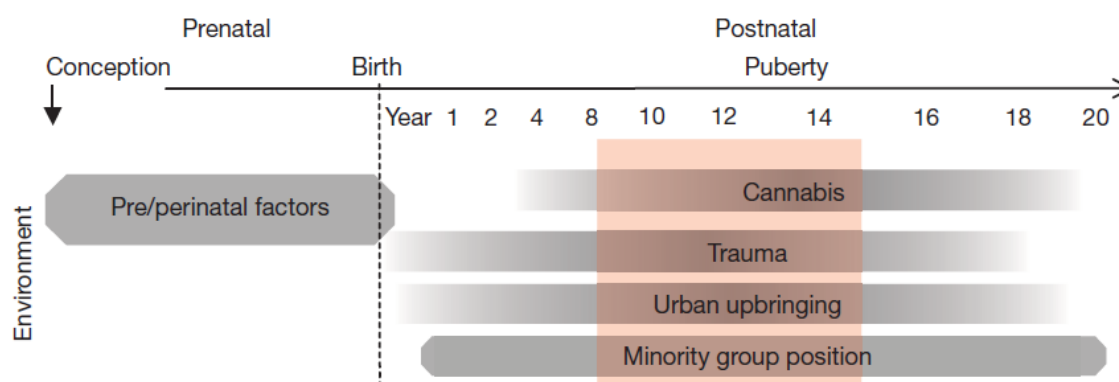


Figure 1.30 extraite de Van Os et al. 2010 (115) schématisant l'implication des facteurs environnementaux les plus fréquemment associés à la schizophrénie

Parmi les facteurs prénataux, on recense une large variété de facteurs incriminés dont peu ont des évidences élevées et toujours avec des Odds Ratio faibles ou moyens. Cet écueil peut être lié au manque de systématisation dans le recensement des facteurs environnementaux rendant difficile les répliques. Ainsi, les facteurs psychologiques maternels pendant la grossesse, la multiparité, la place dans la fratrie n'ont pas été répliqués. L'évidence est maximale pour l'exposition prénatale à une infection maternelle en particulier infection à HSV-

2, aux gonocoques et les infections respiratoires (risque maximal dans la première partie de la grossesse) et des études ont montré l'importance de facteurs immunologiques ainsi que le risque de naissance en hiver (qui pourrait aussi être associé à des carences). Le taux de certains métabolites chez la mère pendant la grossesse comme le rétinol, la vitamine D, les folates et l'homocystéine ont été associés à l'apparition de la maladie chez l'enfant. De nombreuses complications obstétricales sont également en lien avec la schizophrénie dans la descendance notamment l'accouchement prématuré, le saignement pendant la grossesse, des anomalies placentaires, les nœuds du cordon ombilical, une présentation fœtale atypique, une incompatibilité rhésus, un score d'Apgar bas. Ces facteurs pourraient déclencher des manifestations hypoxiques chez l'enfant mais également des mécanismes neuronaux plus complexes (117). Une étude épidémiologique en Suède comparant les enfants nés à terme (37-41 semaines), à des enfants prématurés (32 - 36 semaines) a montré un risque augmenté de 1.6 (95% CI, 1.1-2.3) de développer une psychose et ce risque est augmenté de 2.5 (95% CI, 1.0-6.0) pour les grands prématurés (inférieur à 32 semaines) ce qui établit un effet dose. La méthylation de l'ADN semble pouvoir être modifiée par ces différents facteurs prénataux notamment par la prématurité (118). Les indicateurs de développement fœtal comme une petite taille, un petit périmètre crânien, des poids de naissance extrêmes pourraient refléter le mauvais développement in utero soit par l'effet de facteurs environnementaux soit par l'expression d'une anomalie du développement précoce, cause d'un futur trouble neurodéveloppemental (119). Le contexte familial est également impliqué avec l'impact de l'âge paternel qui serait à l'origine de mutations de novo ; il est plausible que cet âge paternel soit également associé à des variations du méthylome qui se modifie avec l'âge. Un bas niveau socio-économique, des difficultés familiales (mauvaises relations, instabilité familiale, conflits...) et un faible niveau d'éducation parentale augmentent le risque de schizophrénie dans la descendance.

Parmi les facteurs post-nataux on distingue ceux survenant à un âge précoce du développement et participant à la vulnérabilité individuelle et ceux survenant à un âge plus tardif, pendant la pré-adolescence ou l'adolescence et représentant davantage des facteurs déclenchants.

Ainsi, les traumatismes psychiques incluant la négligence et les abus physiques ou sexuels ont été associés à la psychose et n'auraient pas les mêmes conséquences suivant l'âge de survenue. Les études prospectives ont orienté vers un lien causal des traumatismes dans l'enfance et éliminé les biais d'interprétation et de remémorisation (120). Les traumatismes et l'éducation précoce peuvent jouer un rôle sur la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HHS) (121) occasionnant une vulnérabilité au stress ultérieur.

L'usage de cannabis provoque des symptômes psychotiques chez des sujets sains (122) et exacerbe les symptômes des patients schizophrènes (123). Il a été suggéré que le risque génétique pour la schizophrénie pouvait aussi être à l'origine d'un comportement d'abus de cannabis (70) mais des études longitudinales révèlent également que la prise de cannabis peut survenir avant l'apparition de la schizophrénie. Le lien causal dans le déclenchement de la maladie n'est pas affirmé avec certitude mais une méta-analyse montre que l'association reste tout de même élevée en particulier pour les forts consommateurs (124). Des cohortes prospectives ont montré une association significative avec une taille d'effet moyenne entre le mésusage de cannabis à l'adolescence et l'augmentation du risque psychotique ultérieur (125,126).

La position groupale minoritaire a été identifiée comme facteur de risque de psychose, quelque soit l'origine ethnique, qu'il s'agisse de migrants récents ou non (2^e génération) voire même de non-migrants. Plutôt que les migrations populationnelles, le facteur environnemental à risque pourrait davantage être en lien avec l'isolement d'un individu au sein d'un groupe social « discriminant » et l'absence de support social, indépendamment de sa culture (127).

L'urbanité est associée à l'apparition de la schizophrénie et le changement de mode de vie pour un retour en milieu rural conduit à la réduction du risque (128,129). Ce facteur semble indépendant des précédents mais pourrait être soumis à des biais, notamment à des migrations secondaires à des symptômes pré-existants (130) ou encore à un meilleur accès diagnostique dans certaines zones urbaines.

Même si peu de données comparent les facteurs environnementaux impliqués dans la schizophrénie avec ceux impliqués dans d'autres pathologies psychiatriques, les études épidémiologiques suggèrent que ces facteurs ne sont pas spécifiques d'une manifestation phénotypique particulière. Pris individuellement ces facteurs n'apparaissent pas suffisants pour expliquer à eux seuls l'apparition de la maladie. Ils impactent la biologie à plusieurs niveaux et la modulation de leurs effets par le patrimoine biologique propre à chaque individu pourrait expliquer les différences phénotypiques observées en réponse à un même stressor.

D'un point de vue biologique, ils peuvent mettre en jeu l'axe HHS en stimulant la production de cortisol et déboucher sur des variations comportementales. L'effet du cortisol pourrait être médié par son action sur la sécrétion de neurotransmetteurs. Mais il peut également impacter la conformation de la chromatine et moduler l'expression des gènes par des mécanismes directs et indirects variés (figure 1.31).

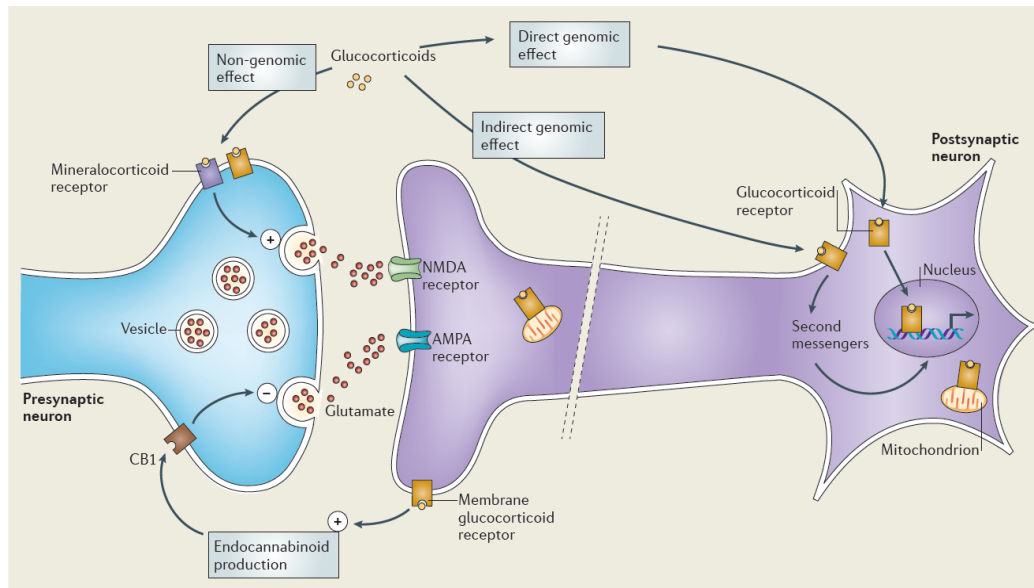


Figure 1.31 extraite de Popoli et al 2011 (131) schématisant les effets multiples du cortisol sur la synapse.

La dérégulation de la réponse biologique au stress pourrait constituer le point de convergence de plusieurs facteurs environnementaux identifiés comme associés à la schizophrénie ; les traumatismes dans l'enfance, la vie en milieu urbain, les tracas quotidiens, la position groupale minoritaire agissent sur l'axe HHS. Ainsi, les traumatismes dans l'enfance réduisent la réactivité matinale de sécrétion de cortisol à l'âge adulte (132). Grandir en milieu urbain est corrélé à une augmentation ultérieure de la réactivité au stress (133) et un support social perçu comme inadéquat a été associé à un niveau de cortisol plus élevé (134).

La dérégulation biologique de l'axe HHS peut être investiguée par la sécrétion du cortisol qui provoque des modifications cérébrales. Ainsi, le cortisol conduit à une dérégulation de la neurotransmission (131). Une étude en PET a montré que le niveau de cortisol en réponse à un stress était corrélé au relargage de dopamine striatale et que ce relargage était plus élevé chez les sujets à risque de psychose que chez les contrôles (135). Cette étude est une réplification d'études précédemment conduites avec d'autres technologies d'imagerie (136,137).

Ainsi, il semble plausible que l'exposition à des stressseurs puisse déclencher une perturbation du métabolisme cérébral et conduire à l'émergence de la psychose (138).

Cette dérégulation ne serait cependant pas spécifique et semble survenir dans d'autres pathologies psychiatriques notamment trouble bipolaire (139), autisme (140), dépression (141).

Les modifications biologiques induites par le stress au cours de la transition psychotique pourraient s'exprimer autrement que par des modifications du cortisol périphérique. D'abord,

le profil cérébral du cortisol n'est pas aisément corrélé aux profils périphériques (sanguin ou salivaire). En outre, d'autres molécules pourraient intervenir. Le stress environnemental pourrait conduire à l'émergence de la psychose selon des mécanismes cellulaires ou moléculaires plus complexes notamment l'expression ou la modulation de récepteurs aux glucocorticoïdes (142). Le stress peut également induire des modifications épigénétiques.

Une étude publiée dans Science en 2013 (143) précise que chez des souris ayant subi un isolement social à l'adolescence (E), des anomalies comportementales surviennent de manière significative à l'âge adulte mais uniquement lorsque celles-ci sont prédisposées génétiquement (GxE) (G correspondant à la mutation du gène DISC1 connu pour être un facteur de risque génétique de la schizophrénie). Cet effet n'est pas retrouvé lors de l'administration d'un antagoniste de la corticostérone suggérant que la dérégulation de l'axe du stress est nécessaire à cette perturbation comportementale. Ces perturbations comportementales chez les souris présentant les facteurs de risque génétique et environnementaux sont liées à l'augmentation de la transmission dopaminergique et à des modifications épigénétiques comme la méthylation du gène de la Tyrosine Hydroxylase. Chez l'homme les données concernant les modifications épigénétiques sous l'impact du stress sont encore éparpillées. Elles sont inexistantes dans le champ de la psychose. Par analogie avec d'autres pathologies psychiatriques, notamment la dépression, on peut identifier des gènes candidats ou des voies biologiques dont la méthylation est dérégulée sous l'influence du stress : FKBP5(91), BDNF (144), GR, NR3C1, 5HTT (145), les voies autour de la plasticité neuronale (146), du développement et de la morphogénèse, de la mort cellulaire (147) ou sur d'autres gènes candidats (148). De plus, les molécules intervenant dans la « heat-shock response » peuvent à la fois être mises en jeu par le stress psychosocial (149) et conduire à une dérégulation épigénétique (89). L'étude de cette piste serait donc intéressante.

La transition psychotique en tant que processus au cours duquel un sujet présentant un état mental à risque déclenche un trouble psychotique n'est pas explicable par une approche génétique seule. Le patrimoine génétique d'un individu est fixé depuis la conception alors que le processus de transition psychotique ne survient généralement qu'au cours de l'adolescence.

Ce constat suggère que des mécanismes survenant au cours de la vie d'un individu vulnérable vont le précipiter dans un trouble psychotique caractérisé. Après une transition psychotique, l'individu demeure dans ce nouvel état physiopathologique sans retour ad integrum. L'apparition différée de la maladie et l'installation dans un état pathologique quasi-

irréversible suggère à la fois que des mécanismes moléculaires plastiques peuvent apparaître au cours du développement et que ces mécanismes conservent une certaine stabilité moléculaire. A la vue de nos connaissances actuelles, les facteurs environnementaux pourraient être impliqués dans la modification durable de l'expression des gènes au cours de la psychose. L'épigénétique possède ces caractéristiques d'être stable mais modifiable au cours de la vie d'un individu sous l'influence de facteurs externes. L'hypothèse épigénétique est donc plausible pour expliquer la transition psychotique.

Travail Expérimental

L'objectif de la thèse était d'identifier des facteurs biologiques influençant la transition psychotique en nous appuyant sur les données cliniques et biologiques de la cohorte ICAAR (Influence du cannabis sur le devenir psychopathologique des sujets à haut risque de transition psychotique), cohorte collectée dans le cadre du Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC AOM07-118). Les hypothèses actuelles nous ont amené à explorer l'épigénétique dans un paradigme longitudinal où la méthylation de l'ensemble des gènes des individus était étudiée suivant leur évolution vers la psychose ou non (Article 1). Afin d'établir si ces modifications épigénétiques présentaient un aspect fonctionnel, cette étude méthylomique a été complétée par une approche transcriptomique par séquençage d'ARN (Article 2). Les modifications épigénétiques peuvent être primaires en lien avec des particularités dans les processus qui les contrôlent ou secondaires à des facteurs environnementaux. Nous avons voulu explorer ces deux hypothèses. Dans la cohorte ICAAR, nous avons exploré le métabolisme mono-carboné (C1) qui est utilisé pour la synthèse des groupements méthyles permettant la méthylation de l'ADN (Article 3). Enfin, nous avons exploré, dans notre cohorte et dans les données de la littérature, le taux de cortisol salivaire chez les individus présentant une psychose débutante, en fonction de leur profil clinique et de leur pronostic (Article 4).

II.1 Description de la cohorte ICAAR et Paradigme expérimental

Les résultats présentés dans cette thèse sont ceux de la cohorte longitudinale, multicentrique et non-interventionnelle ICAAR recrutée de 2009 à 2014 au sein du C'JAAD situé dans le Centre Hospitalier Sainte Anne (Paris, France). Les agréments éthiques ont été obtenus suivants les procédures françaises (Comité de Protection des Personnes Ile de France III – Paris) et européennes et en respectant les accords d'Helsinki. Tous les patients ont donné leur accord écrit avant leur inclusion et après information complète sur l'étude. La cohorte ICAAR regroupe 336 individus. Les critères d'inclusion correspondait à une altération du

fonctionnement global (score à l'échelle Social and Occupational Functioning Assessment Scale <70) durant l'année précédente associée à des symptômes psychiatriques ou une plainte cognitive subjective. Les critères d'exclusion comprenaient une pathologie psychiatrique caractérisée (suivant les critères du DSM-IV-TR), des maladies somatiques sévères et non stabilisées incluant les pathologies neurologiques, des traumatismes crâniens ou un QI inférieur à 70, un traitement antipsychotique en cours (> 100 mg d'équivalent chlorpromazine depuis plus de 12 semaines). Les individus recrutés étaient caractérisés comme des sujets non à risque (HSC pour help-seekers contrôles), des sujets à ultra-haut risque (UHR regroupant sujets vulnérables, BLIPS et APS) ou des sujets ayant présenté un premier épisode psychotique (FEP pour first-episode of psychosis) selon les critères de la CAARMS. Les sujets remplissant les critères de psychose dès l'inclusion étaient investigués à la première évaluation mais ne participaient pas à l'étude longitudinale. Les individus HSC et UHR inclus étaient suivis pendant 1 an, avec des tests et retests cliniques, cognitifs et biologiques au temps initial (M0), après 6 mois (M6) et après 1 an (MF) ou immédiatement après une transition psychotique (MF). La transition psychotique était caractérisée par la CAARMS et une réunion consensuelle avec étude des dossiers individuels a statué sur chacun des dossiers des patients transiteurs.

Dans notre travail nous nous sommes concentrés sur les modifications biologiques accompagnant la transition psychotique. D'autres analyses sont en cours, explorant la valeur prédictive et les aspects cliniques et plus spécifiquement les modifications liées aux consommations de cannabis.

L'épigénétique possède ces caractéristiques d'être stable mais modifiable au cours de la vie d'un individu. Nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle la transition psychotique s'accompagnerait de modification de l'état de méthylation du génome. Notre paradigme expérimental (figure 2.1) reposait sur l'étude longitudinale des changements biologiques d'un individu. Nous nous sommes attachés à rechercher des anomalies épigénétiques chez des sujets transiteurs (UHR-P) comparativement à des sujets contrôles (UHR-NP et NUHR). Ces recherches ont porté sur la méthylation de l'ADN et sur l'analyse de la transcription de l'ensemble des gènes d'un individu au niveau périphérique.

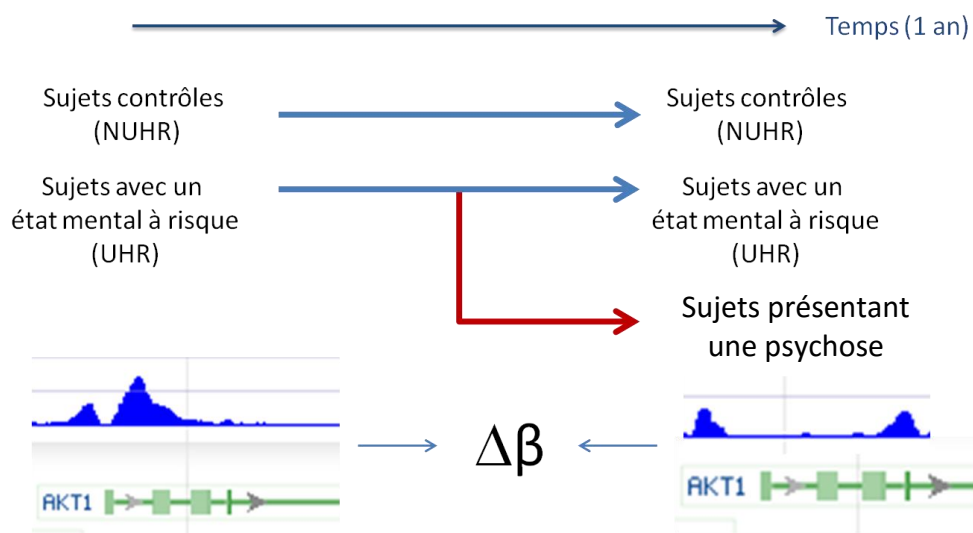


Figure 2.1 : paradigme expérimental. Les flèches bleues indiquent l'évolution au cours du temps. La flèche rouge représente une transition psychotique. Les densitogrammes représentent le niveau de méthylation d'une portion de génome (ici promoteur du gène AKT1). $\Delta\beta$ renvoie à la différence entre la méthylation finale et la méthylation initiale pour une CpG donnée.

II.2 Analyse méthylo-mique de la transition psychotique

Parmi les mécanismes épigénétiques, la méthylation de l'ADN est le mécanisme le mieux connu. Cependant, les variations longitudinales de méthylation au cours du temps n'ont jusqu'à présent jamais été étudiées chez les sujets entrant dans la psychose. Notre étude a été la première à explorer la méthylation au cours de la transition psychotique ce qui a nécessité une approche exploratoire, conduite sans hypothèse a priori sur des gènes ou des CpG candidats. Les moyens techniques d'exploration pan-génomique de la méthylation sont multiples et dépendent du nombre d'échantillons et de CpG à analyser (figure 2.2). En raison de la possibilité d'explorer simultanément plusieurs individus, de l'absence de biais, de sa bonne couverture (485 000 CpG correspondant à la quasi-totalité des gènes), la puce Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) a été retenue ; elle a déjà été utilisée dans le champ psychiatrique avec des résultats satisfaisants (99). Cette puce est fiable comme le montre une étude de cross-validation par plusieurs techniques de séquençage (150).

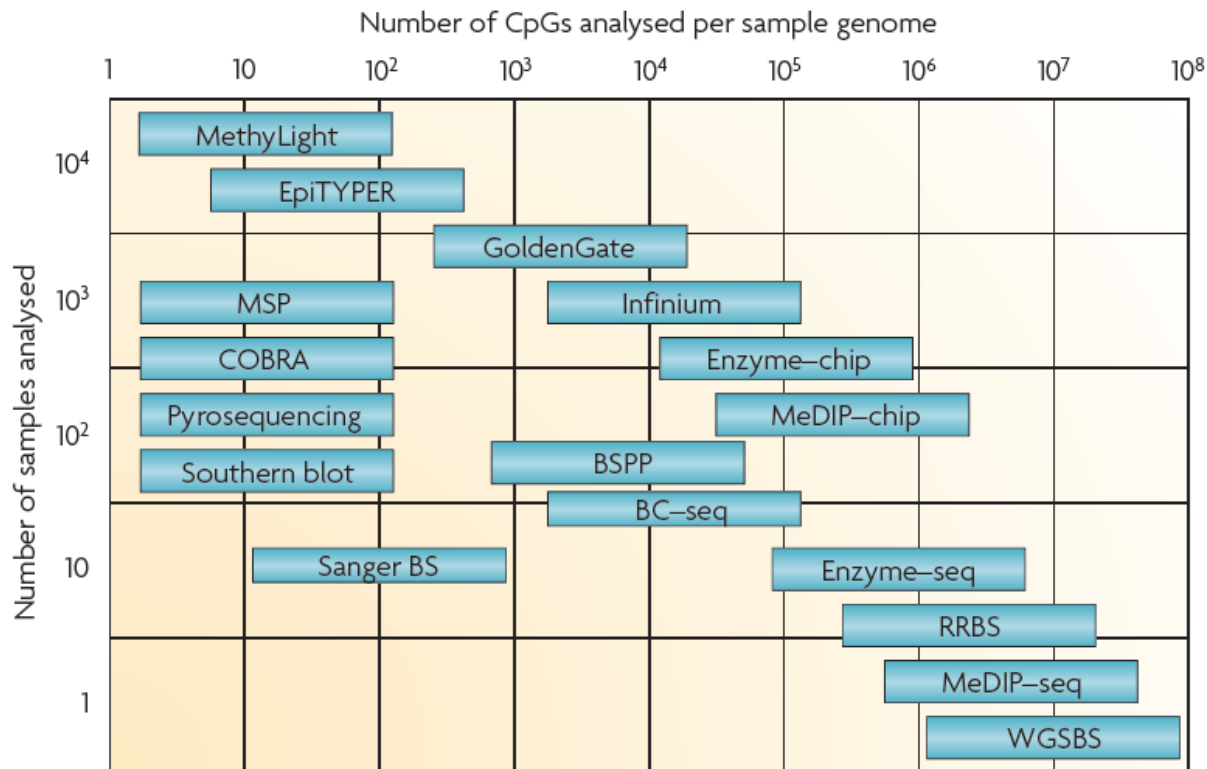


Figure 2.2 : méthodes d'investigations du méthylome en fonction du nombre d'échantillons et du nombre de CpG à analyser - extrait de Laird PW 2010 (151) (RRBS = Reduced representation bisulfite sequencing ; MeDIP = Methylated DNA immunoprecipitation)

L'approche mise en place dans cette étude était innovante par son aspect longitudinal : le sujet était son propre témoin et l'analyse portait sur des différences de méthylation au cours du temps et non sur le niveau de méthylation à un instant précis.

L'ADN de 42 sujets inclus dans la cohorte ICAAR, ayant deux temps de mesure (M0 et MF), a été extrait. Les prélèvements sanguins ont été effectués à température ambiante et stockés immédiatement à -80°C pour éviter toute modification de la méthylation. L'extraction d'ADN sanguin a reposé sur un protocole par précipitation à partir de leucocytes circulants (**annexe**) permettant de préserver les marques épigénétiques. L'ADN extrait a été traité au bisulfite puis analysé par la puce Illumina Human Meth450K. Cette puce est basée sur un double signal de fluorescence : une sonde s'hybridant sur les loci méthylés et une sonde s'hybridant sur les mêmes loci lorsque qu'ils sont déméthylés (figure 2.3).

Infinium HumanMethylation450 BeadChip

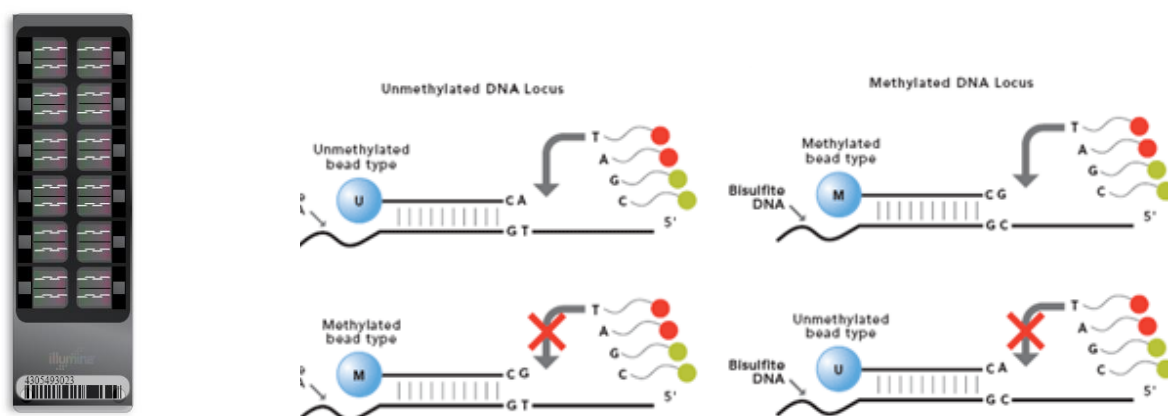


Figure 2.3 expliquant le système de double hybridation pour l'étude du méthylome de la puce Meth450 selon l'information donnée par le constructeur Illumina.

Les résultats correspondent à des fichiers d'intensité de phosphorescence (fichiers idat). L'analyse bio-informatique de ces fichiers bruts a été réalisée en partenariat avec l'équipe Stat-Gen à l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Nous avons utilisé l'outil « SVA » pour vérifier l'absence de « surrogate variables » avant de poursuivre les analyses (152). L'identification de « surrogate variables » repose sur la construction de covariables directement à partir de données de grande dimension ; après identification et estimation, ce type de variable peut être utilisé pour ajuster les données sur des facteurs confondants non connus et non prévus (figure 2.4). L'algorithme n'a pas détecté de

variables confondantes inconnues, en particulier aucun effet batch n'a été trouvé dans nos données.

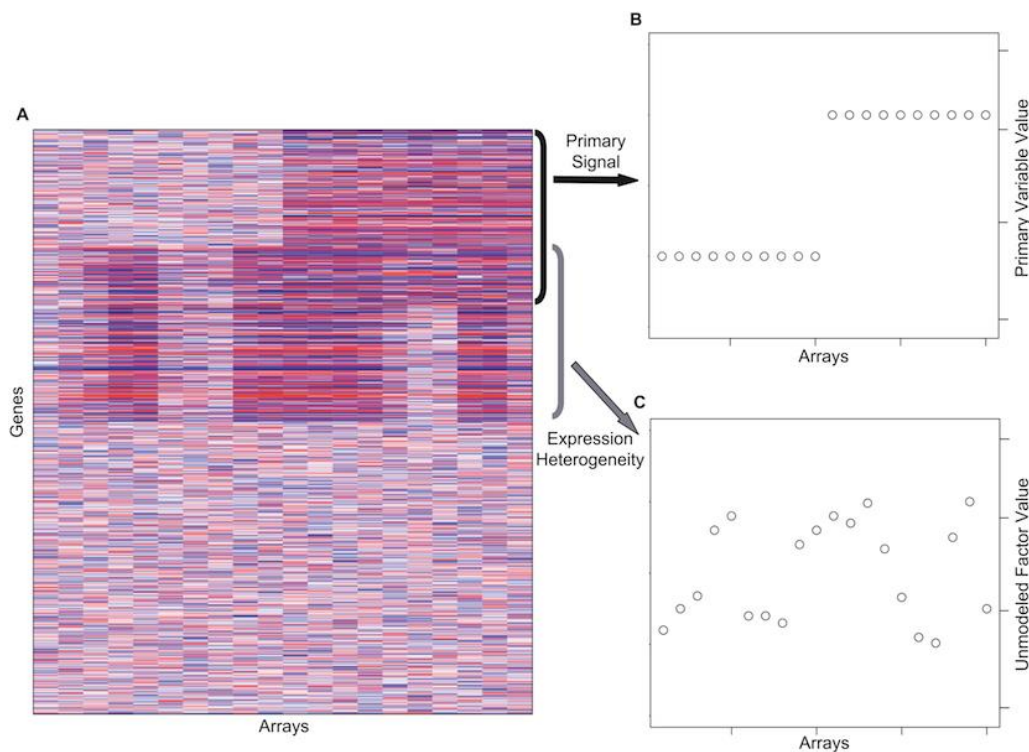


Figure 2.4 : principe de l'analyse et de l'ajustement sur des surrogate variables, extrait de Leek et al 2007 (153)

Les prélèvements sanguins des patients n'ayant pas bénéficié de cytométrie de flux (FACS) avant l'analyse, le signal de méthylation pourrait refléter un changement dans la répartition des cellules leucocytaires au cours du temps (154). Un algorithme, basé sur l'analyse de loci dont la variation permet de retrouver les populations cellulaires a posteriori, a permis de mesurer les différents types de population cellulaires (algorithme EstimateCellCounts du package minfi) (155). Ces données obtenues pour chaque patient ont pu être utilisées pour ajuster les données brutes.

Un modèle linéaire d'association entre différence longitudinale de méthylation pour chaque CpG et évolution clinique a été testé avec le package Limma (156) :

$$MF - M0 = \text{transition psychotique} + \text{sexe}$$

En analysant nos meilleurs résultats à l'aide des logiciels EnrichR (157) et ConsensusPathDB (158), deux réseaux de gènes incluant huit gènes ressortent comme significatifs. Ce résultat peut s'interpréter comme la modification concomitante de la méthylation de plusieurs CpG sur différents gènes convergents vers la même voie biologique. Cette analyse repose sur l'hypothèse que les mécanismes épigénétiques pourraient modifier un

réseau de gène davantage qu'un gène isolé. L'analyse par CpG isolée reste encore largement pratiquée dans la littérature mais rien ne permet d'affirmer sa validité biologique. En effet, les données scientifiques actuelles portent à croire que seules les modifications de méthylation au niveau des CpG présentes dans les îlots et dans les promoteurs des gènes sont fonctionnelles. Un nouveau type d'analyse bio-informatique a donc récemment émergé afin d'identifier les DMR (Differentially Methylated Regions) par opposition aux DMP (Differentially Methylated Positions, correspondant à des CpG isolées). Cette analyse est implementée dans l'algorithme « minfi » sous la fonction « bumpHunter ». Cette analyse s'est révélée très intéressante dans notre cohorte et nous avons pu identifier 2 DMR significatives après filtrage des résultats (suppression des DMR comportant une seule CpG et des DMR incluant le CMH sur le chromosome 6 qui est un faux positif récurrent). Nous avons secondairement conduit une analyse à M0 puis à MF pour identifier et comparer les DMR entre les 2 groupes. Ainsi, certaines DMR sont présentes dès M0 alors que d'autres n'apparaissent qu'au cours de la transition psychotique. Ces DMR modifiées au cours de la transition se retrouvent au niveau de gènes impliqués dans la régulation du stress oxydatif. Cependant, les faibles effectifs dans les groupes ne permettaient pas d'atteindre des différences significatives et cette analyse n'a été conduite qu'à titre exploratoire.

Les résultats obtenus avec la puce selon une approche pangénomique nécessitaient d'être confirmés par une technique plus ancienne et davantage validée sur le plan méthodologique. La méthode choisie pour confirmer ces résultats a été le pyroséquençage car cette technique permet l'exploration de CpG préalablement ciblées et est très efficace pour déterminer de faibles différences de l'ordre de quelques pourcents. Nous avons utilisé les mêmes solutions d'ADN que celles utilisées pour la puce de méthylation. Le protocole a été mis au point à partir du protocole de Tost & Gut (159) avec le soutien de la plateforme pour l'épigénomique fonctionnelle rattachée à l'UMR7216 Epigénétique et Destin Cellulaire (CNRS, Inserm et Université Paris Diderot). Une copie de ce protocole est disponible en **annexe**. Ces travaux ont donné lieu à la publication ci-après.

ORIGINAL ARTICLE

Methylomic changes during conversion to psychosis

O Kebir^{1,2,3,4,9}, B Chaumette^{1,2,3,4,9}, F Rivollier^{1,2,3,4}, F Miozzo^{5,6,7}, LP Lemieux Perreault⁸, A Barhdadi⁸, S Provost⁸, M Plaze^{1,2,3,4}, J Bourgin^{1,2,3,4}, the ICAAR team¹⁰, R Gaillard^{1,2,3,4}, V Mezger^{5,6,7}, M-P Dubé⁸ and M-O Krebs^{1,2,3,4}

The onset of psychosis is the consequence of complex interactions between genetic vulnerability to psychosis and response to environmental and/or maturational changes. Epigenetics is hypothesized to mediate the interplay between genes and environment leading to the onset of psychosis. We believe we performed the first longitudinal prospective study of genomic DNA methylation during psychotic transition in help-seeking young individuals referred to a specialized outpatient unit for early detection of psychosis and enrolled in a 1-year follow-up. We used Infinium HumanMethylation450 BeadChip array after bisulfite conversion and analyzed longitudinal variations in methylation at 411 947 cytosine–phosphate–guanine (CpG) sites. Conversion to psychosis was associated with specific methylation changes. Changes in DNA methylation were significantly different between converters and non-converters in two regions: one located in 1q21.1 and a cluster of six CpG located in GSTM5 gene promoter. Methylation data were confirmed by pyrosequencing in the same population. The 100 top CpGs associated with conversion to psychosis were subjected to exploratory analyses regarding the related gene networks and their capacity to distinguish between converters and non-converters. Cluster analysis showed that the top CpG sites correctly distinguished between converters and non-converters. In this first study of methylation during conversion to psychosis, we found that alterations preferentially occurred in gene promoters and pathways relevant for psychosis, including oxidative stress regulation, axon guidance and inflammatory pathways. Although independent replications are warranted to reach definitive conclusions, these results already support that longitudinal variations in DNA methylation may reflect the biological mechanisms that precipitate some prodromal individuals into full-blown psychosis, under the influence of environmental factors and maturational processes at adolescence.

Molecular Psychiatry advance online publication, 26 April 2016; doi:10.1038/mp.2016.53

INTRODUCTION

The identification of clinical ultra-high-risk state for psychosis (hereinafter UHR; also known as the ‘at-risk mental state’) has been a relatively recent development in the field of psychiatry, and it has provided a means to capture the prepsychotic phase and to describe individuals with prodromal symptoms that may transition into psychosis and schizophrenia.¹ Operational criteria for UHR have been proposed,² based on specific comprehensive interviews. In individuals reaching these criteria, the conversion rate of individuals at UHR to full-blown psychosis is 30–40% in the following 24 to 36 months.³ Nevertheless, the populations reaching UHR criteria remain heterogeneous with the possibility of several outcomes, including symptomatic regression or development of non-psychotic disorders, rather than psychosis, which underscores the need for more predictive markers. Deciphering the biological mechanisms underlying the onset of psychosis requires longitudinal measures in help-seeking patients that includes characterization of their outcomes.

Understanding the different pathophysiological pathways leading to conversion to psychosis is a major issue of the field. The literature about conversion to psychosis, however, is still maturing and molecular findings remain limited. From the molecular point

of view, conversion to psychosis is viewed as the complex interaction between biological vulnerability and exposure to many potentially harmful environmental risk factors.⁴ This is in line with the overall gene × environment interaction hypothesis in schizophrenia, whereby the influence of the environment is thought to induce epigenetic changes.⁵ Until now, however, the epigenetic signature of conversion to psychosis has not been studied. Epigenetic regulation involves dynamic processes that have a role in controlling gene expression levels, among which histone posttranscriptional modifications and methylation of genes on cytosine–phosphate–guanine (CpG) dinucleotides have been the main focus of the research. New methylomic technologies enable investigation of CpG methylation sites at the genomic scale. A large methylome-wide-association study recently compared patients with established schizophrenia to controls and found 139 differentially methylated CpGs, including *FAM63B* and *RELN*.⁶

To our knowledge, no previous study has considered pangenomic methylation longitudinal changes accompanying conversion to psychosis. In this study, we explored blood methylation biomarkers associated with conversion to psychosis in a methylomic association study involving young help-seeking individuals who were enrolled in a longitudinal follow-up

¹Université Paris Descartes, PRES Université Paris Sorbonne Paris Cité, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, UMR S 894, Paris, France; ²INSERM, Laboratoire de Physiopathologie des Maladies Psychiatriques, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, UMR S 894, Paris, France; ³CNRS, GDR3557-Institut de Psychiatrie, Paris, France; ⁴Faculté de Médecine Paris Descartes, Centre Hospitalier Sainte-Anne, Service Hospitalo-Universitaire, Paris, France; ⁵CNRS, UMR7216 Épigénétique et Destin Cellulaire, Paris, France; ⁶Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁷Département Hospitalo-Universitaire DHU PROTECT, Paris, France and ⁸Université de Montréal, Beaulieu-Saucier Pharmacogenomics Center, Montréal Heart Institute, Montréal, QC, Canada. Correspondence: Professor M-O Krebs, Laboratoire de Physiopathologie de Maladies Psychiatriques, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Service Hospitalo-Universitaire, INSERM U894—Université Paris Descartes, 2 ter rue d’Alesia, Paris 75014, France.
E-mail: marie-odile.krebs@inserm.fr

⁹These authors contributed equally to this work.

¹⁰Members of the ICAAR team are listed alphabetically before References.

Received 22 July 2014; revised 28 February 2016; accepted 2 March 2016

program. We were able to detect significant differentially methylated regions (DMRs). We conducted an original exploration of multiple CpG sites followed by pathway and cluster analyses of the top methylation changes. Then we confirmed the top findings using pyrosequencing.

MATERIALS AND METHODS

Population

Our study was approved by the institutional ethics committee 'Comité de protection des personnes, Ile-de-France III, Paris, France', and written informed consent was obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki. Help-seeking individuals (16–30 years) consecutively referred to the Adolescent and Young Adults Assessment Centre (Service Hospitalo-Universitaire, Hôpital Sainte-Anne, Paris, France) between 2009 and 2013 were enrolled in the ICAAR collaborative study promoted by Sainte-Anne Hospital as already described.⁷ Inclusion criteria were alterations in global functioning (Social and Occupational Functioning Assessment Scale score < 70) during the past year that were associated with psychiatric symptoms and/or subjective cognitive complaints. Exclusion criteria included manifest symptoms of psychosis, pervasive developmental or bipolar disorders and individuals with other established diagnoses, such as obsessive-compulsive disorder (fulfilling Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition criteria). Other exclusion criteria were: current antipsychotic treatment (> 100 mg Chlorpromazine equivalent) for > 12 weeks, psychoactive substance dependence or abuse during the previous year and/or > 5 years, serious or non-stabilized somatic and neurological disorders head injury and intelligent quotient < 70. All subjects were examined with the Comprehensive Assessment for at-risk mental state (CAARMS,⁸ in its translated version⁹) by specifically trained psychiatrists followed by a consensus meeting for best-estimate diagnoses. Individuals fulfilling the criteria for at-risk mental state were characterized as UHR; conversion to psychosis was characterized using the CAARMS-defined psychosis onset threshold (that is, supra-threshold psychotic symptoms—thought content, perceptual abnormalities and/or disorganized speech—present for > 1 week) (see Supplementary Table S1) was used. All subjects excepted those above the psychosis threshold at baseline (M0) were included in the longitudinal follow-up, whether or not they were UHR. Subjects who reach the psychosis threshold during follow-up were classified as converters. The clinical assessment and blood sample collection were repeated after 6 and 12 months or after psychosis onset. In this study, 39 individuals were included and enrolled in the longitudinal follow-up, among whom 14 subsequently developed full-blown psychosis (converters), whereas 25 did not (non-converters). There were no significant differences between these two groups at baseline in sex ratio, age, follow-up duration, body mass index, substance abuse or psychotropic treatment introduction (Table 1). Of the 25 non-converters individuals, 13 were UHR and 12 were non-UHR at baseline. Non-UHR individuals had variable subthreshold symptoms (anxiety and depressive symptoms) without reaching criteria of a fully characterized disorder.

Genome-wide analysis of DNA methylation

Preparation. For each individual, genomic DNA (500 ng) was extracted from whole blood and treated with sodium bisulfite using the EZ-96DNA Methylation KIT (Catalog No D5004, Zymo Research, Irvine, CA, USA) following the manufacturer's standard protocol. Methylation was measured at M0 and after the longitudinal follow-up (MF) by the same technique at the same time for all samples. Genome-wide DNA methylation was assessed using Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA), which interrogates the DNA methylation profile of > 485 000 CpG loci across the genome at single-nucleotide resolution.

Data preprocessing and clean up. Illumina GenomeStudio software (Illumina) was used to extract signal intensities for each probe. All computations and statistical analyses were performed within the R statistical analysis environment (<http://www.r-project.org>), and all scripts are available on request from the authors. R packages methylumi and watermelon were used for data quality check and normalization. Steps used for data clean-up procedure and normalization comprised gender check between phenotype file and methylation data set and evaluation of single-nucleotide polymorphism genotypes concordance between the two samples from the same individuals. Subsequent clean-up steps comprised flagging and removing individuals with no result or gender discrepancies

Table 1. Clinical description of population

	Converters	Non-converters	Significance
	n = 14	n = 25	
<i>Clinical variables mean (s.d.)</i>			
Sex ratio (M/F)	9/5	13/12	$P = 0.52^a$
Age	21.9 (3.6)	23.8 (4.1)	$P = 0.17^b$
Body mass index	20.9 (3.5)	21.9 (4.7)	$P = 0.66^b$
<i>Follow-up</i>			
Biological interval in months	10.1 (7.2)	11.4 (5.8)	$P = 0.62^b$
Clinical follow-up in months	10.7 (7)	12.7 (5.7)	$P = 0.22^b$
<i>Substance use (user/non-user)</i>			
Lifetime cannabis use	7/7	5/20	$P = 0.07^a$
Alcohol use (once a week during 6 months)	6/8	13/12	$P = 0.74^a$
Daily/regular tobacco use	7/7	10/15	$P = 0.39^a$
<i>Psychotropic treatment during follow-up</i>			
Antipsychotic or valproate introduction	6/8	4/21	$P = 0.12^a$
Other psychotropic medication introduction	4/10	2/23	$P = 0.16^a$

Abbreviations: F, female; M, male. Biological interval represents time between the two blood samples. Clinical follow-up represents time between inclusion and final status assessments. ^a P is given by Fisher's test. ^b P is given by non-parametric Mann-Whitney test.

or discordant genotypes, samples with $\geq 1\%$ of sites with a detection P -value ≥ 0.05 , probes with beadcount < 3 in $\geq 5\%$ of samples, probes with $\geq 1\%$ of samples with a detection P -value ≥ 0.05 . Additionally, probes on chromosomes X and Y, single-nucleotide polymorphism probes, probes with a single-nucleotide polymorphism at the CpG site and non-specific probes that map to more than one location in the genome were removed.¹⁰ The initial methylation data file includes 485 577 probes, and after normalization and data clean up, 411 947 probes were kept for the final analysis (Supplementary Table S2). R Minfi package was used for supplementary quality control (Supplementary Figures S1 and S2), and no sample was removed. No batch effect was detected (according to Combat R Package using SVA function). Cellular populations were estimated by EstimateCellCounts function (Minfi package).

Association analysis. Global methylation change was investigated by computing the difference between mean methylation changes for all probes in each individual and comparing converters to non-converters. DMRs were investigated using Minfi package in R (script available upon request). In summary, time and group were used as factors in a linear model adjusted by cellular populations with a paired design. DMR analysis was performed using bumpHunter function (bootstrap with 1000 permutations and a methylation differential cutoff of 10). Significance was established for *fwer* correction < 0.1.

Multi-CpG analysis. Because methylation changes could occur in different CpG from various genes converging to the same pathways, we developed a new pipeline to examine methylation longitudinal changes at each CpG site. Linear model with moderated t -statistic was used.¹¹ Statistical analysis was performed with R script (using R Limma Package) testing the following model: Difference in methylation (MF – M0) = psychosis (converters vs non-converters) + gender. The multiple-testing-adjusted significance threshold for probe-wise analysis was established at $P = 1.2 \times 10^{-7}$ (0.05/411 947 analyzed probes). QQ-plot is displayed in Supplementary Figure S3. Top results of this analysis were pasted in ConsensusPathDB¹² and Enrichr¹³ and an overrepresentation analysis based on Reactome, wikipathways and KEGG database was used with a hypergeometric correction to explore whether our top findings are linked to specific biological pathways more than expected by chance. Clustering analysis of the same top results was performed using the MultiExperimentViewer software (version 4.9.0).¹⁴ Methylation differential rates were inputted and normalized by genes.

Table 2. DMRs identified by Minfi (absolute β value >10; number of CpG >1)

Chromosome	Start	End	β value	Number of CpG	P-value	fwer
chr1	146549909	146550467	0.19	4	0.00007	0.026
chr1	110254662	110254835	0.14	6	0.00068	0.092
chr5	1594282	1594733	0.13	7	0.00076	0.116
chr3	195489306	195489782	0.15	3	0.00182	0.225
chr5	1856713	1857477	0.13	4	0.00372	0.355
chr11	325915	325964	0.15	2	0.00452	0.475
chr19	17599784	17600122	0.14	2	0.00705	0.572
chr2	121496875	121497334	-0.13	2	0.01013	0.647
chr15	101093834	101093900	0.13	2	0.01055	0.655
chr5	176797999	176798049	-0.13	2	0.01303	0.705
chr19	13875014	13875111	-0.13	2	0.01517	0.725
chr17	724273	724374	0.12	2	0.03272	0.812
chr8	143751796	143751801	-0.12	2	0.03554	0.819
chr22	24348549	24348715	-0.11	3	0.03692	0.677
chr1	110254919	110255096	0.12	2	0.04309	0.835
chr9	128776861	128777132	-0.12	2	0.05500	0.862
chr19	55013946	55013954	-0.11	2	0.10390	0.92
chr22	50981121	50981406	0.11	2	0.11146	0.927
chr17	4081325	4081428	0.10	2	0.12249	0.931

Abbreviations: CpG, cytosine-phosphate-guanine; DMR, differentially methylated region.

Table 3. Significant pathways in overrepresentation analysis of the multi-CpG pipeline

Biological pathway	Genes	Corrected Q-value
Axon guidance	NRP1: neuropilin 1; CHL1: cell adhesion molecule L1-like; EFNA3: ephrin-A3; COL9A2: collagen, type IX, alpha 2; AP2A2: adaptor-related protein complex 2	0.012
IL-17 signaling pathway	IL17RE: interleukin-17 receptor E; AKT1: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1; TRAF3IP2: TRAF3 interacting protein 2	1.7×10^{-4}

Abbreviation: CpG, cytosine-phosphate-guanine.

For hierarchical clustering, we used 'K-Nearest Neighbors imputation engine' (number of neighbors = 10) and 'Average linkage clustering' using Pearson correlation and asked to construct a gene/sample tree.

Confirmation by pyrosequencing

Infinium HumanMethylation450 BeadChip is a current and reliable array to detect CpG methylation.¹⁵ However, we propose to compare some of our findings using a technical reference based on pyrosequencing.¹⁶ After bisulfite conversion by EpiTect Plus Bisulfite Kits (Qiagen, Hilden, Germany) and DNA purification on column, non-methylation specific PCR were achieved using Platinum Taq DNA polymerase kit (Invitrogen—Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). MAEL promoter was used as positive control for the bisulfite treatment¹⁷ in bisulfited and non-bisulfited samples (Supplementary Figures S4 and S5). Two findings were assessed: we chosen to confirm one specific CpG selected from the top results of multi-CpGs analysis (CpG located in CHL1 gene) and one significant DMR in GSTM5 (the only one significant DMR including a promoter) identified by the Minfi package. Primers were designed by the PyroMark Assay design Software 2.0 (Qiagen), and technical conditions for PCR are shown in Supplementary Table S3; examples of results are shown in Supplementary Figure S6. Biotinylated primers were used to keep the single DNA strand for pyrosequencing. Pyrosequencing was performed using PyroMark Q24 (Qiagen) according the manufacturer's instructions, and data about methylation in each CpG were extracted and analyzed using the PyroMark Q24 2.0.6.20 software (Qiagen).

RESULTS

Longitudinal global methylation change in converters vs non-converters

No significant changes in global methylation were associated with the occurrence of conversion to psychosis ($P = 0.41$).

Longitudinal methylation changes at specific regions in converters vs non-converters

After paired analysis, we identified two significant DMRs (fwer < 0.1), including at least two CpGs. The region including HLA-DQ and HLA-DRB (chromosome 6 [32523136; 32633163]) was excluded because of frequent recurrence of this finding by the Minfi package, suggesting spurious results due to the algorithm (according to its authors). The two DMRs were identified in chromosome 1: first region located in [146549909;146550467] corresponding to 1q21.1 and second region in [110254662; 110254835] including the GSTM5 gene promoter. Significant and suggestive results are shown in Table 2. These DMRs are quite stable across time, which could suggest that differences in methylation pattern in these regions could predate conversion to psychosis. We conducted a transversal exploratory analysis comparing subjects at M0 and subjects at MF (Supplementary Table S4). Fifteen DMRs were concordant before and after conversion but three appeared different across groups after transition only. Interestingly, two of these three DMRs were in 22q11 region and are located near GSTT1 and GSTP1, two genes from the same family as GSTM5.

Longitudinal methylation changes in CpG sites between converters and non-converters

We tested whether changes of methylation in different CpG sites located in distinct genes were associated with psychotic transition. Longitudinal methylation changes at specific CpGs associated with conversion to psychosis are shown in a Manhattan plot (Supplementary Figure S7, see also the top 100 CpGs in Supplementary Table S5). None of the individual CpG changes alone reached significance at a genome-wide level. The best

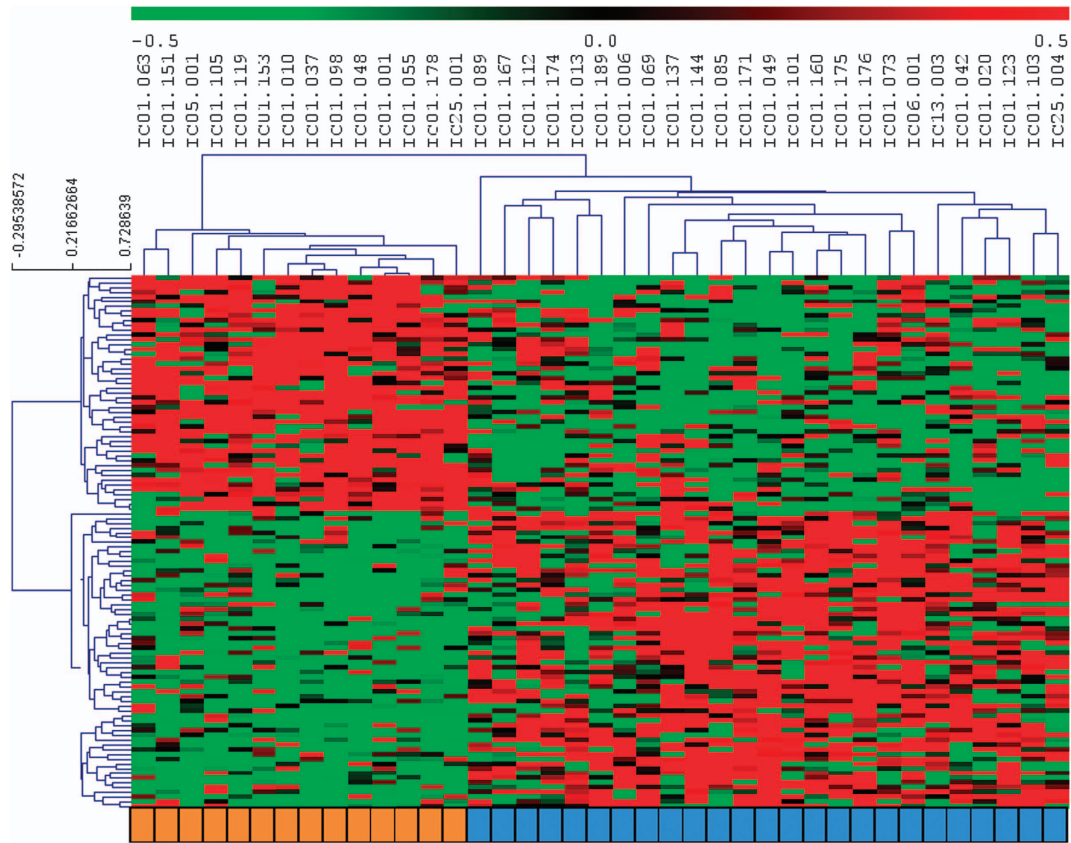


Figure 1. Multi-CpGs clustered and classified as converters (in orange) and non-converters (in blue). CpG, cytosine–phosphate–guanine.

associated CpG sites with conversion to psychosis (top 100 CpGs) were kept for biological pathways analysis and revealed two networks implicating eight genes: an axon guidance pathway and the interleukin (IL)-17 signaling pathway (Table 3).

We performed a cluster analysis of individual data from the top 100 CpGs. Hierarchical clustering of the methylation changes of these top 100 CpGs successfully discriminated between the converters and non-converters (Figure 1). We examined whether the prescription of psychotropic treatment in 10 individuals (6 converters and 4 non-converters) during follow-up could account for the observed methylomic changes. We tested whether the same top CpGs sites display significant methylation modifications in patients in whom medication (antipsychotics or valproate) is initiated compared with those who have no treatment changes. Only two DNA methylation profiles showed a significant difference in methylation change in relation to medication initiation (cg 09270366 located in the inositol-polyphosphate 5-phosphatase gene (nominal $P=0.0019$) and cg 05768558 located in the Lin28 homolog A gene (nominal $P=0.03$)).

Confirmation of significant results by pyrosequencing

We performed pyrosequencing of CHL1 gene (ch3: 240139) in the 78 samples. Pyrosequencing results were significantly correlated with Meth450K beadchip results ($P=0.005$; Spearman's $\rho=0.32$).

We also performed pyrosequencing of GSTM5. It shows large and significant differences between converters and non-converters regardless of the time of assessment (Figure 2; Supplementary Figure S8), with converters showing hypermethylation of GSTM5 promoter. Whereas bio-informatical analyses identified a cluster of six differentially methylated CpG, pyrosequencing further revealed that four additional CpGs located in the promoter, not targeted by the Meth450 beadchip, showed significant methylation change.

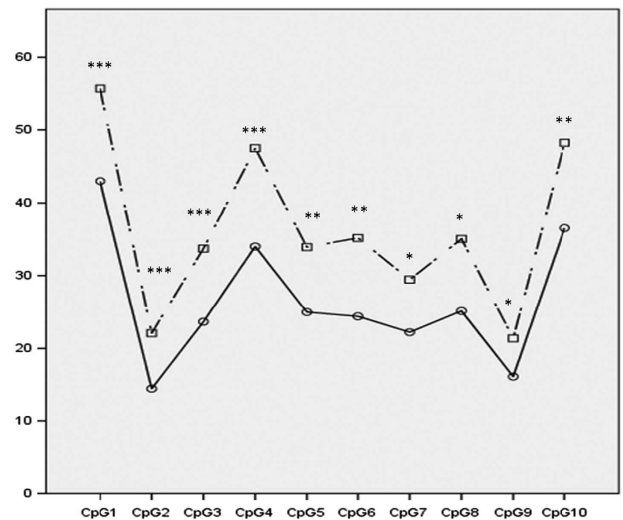


Figure 2. Mean of methylation in each CpG (cytosine–phosphate–guanine) located in the GSTM5 promoter. Full line = non-converters; dash line = converters. Mann-Whitney test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study represents the first genome-wide analysis of DNA methylation profiles in individuals during conversion to psychosis and one of its strengths is the longitudinal design. We observed that conversion to psychosis was not associated with a global change in methylation and there was no individual CpG significantly associated with psychotic

transition, in line with previous findings showing that one individual CpG is rarely associated with one disease. By contrast, we found that conversion to psychosis was associated with specific methylation changes in genes involved in axon guidance, as well as genes of the IL-17 pathway and the glutathione-S-transferase family.

Both genome-wide and confirmatory experiments suggested that methylation changes, especially in the 1q21.1 region and in the promoter of the GSTM5 gene, were associated with psychosis onset. Deletion of 1q21.1 region has previously been associated with schizophrenia.¹⁸ This deletion classically encompasses several genes, including HYDIN2 associated with macrocephaly and autism, suggesting an alteration of neurodevelopment.¹⁹ GSTM5 is a member of glutathione-S-transferase family and is implicated in the synthesis of glutathione and protection against oxidative stress, which seems to be part of the pathophysiology of schizophrenia.²⁰ Oxidative stress has recurrently been suggested to be related to different stages of schizophrenic illness.²¹ GSTM5 is selectively expressed in the brain²² and is the most commonly expressed member of its gene family in this tissue.²³ Its involvement in dopamine metabolism has also been suggested.²⁴ Moreover, its expression has been shown to be decreased in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia.²⁵ Furthermore, GSTM5 levels displayed an inverse correlation with promoter DNA methylation in brain tissue, supporting the idea that GSTM5 CpG methylation status controls gene expression.²⁶ Interestingly, our exploratory approach provided evidence that two other genes of GST family might be differentially methylated after conversion to psychosis: the GSTT1 and GSTP1 regions were hypomethylated and hypermethylated in converters, respectively, without differences between the groups at baseline. These findings suggest the possibility that conversion to psychosis may depend on the specific control of oxidative metabolism and balance between these genes.

Cluster analysis showed that a subset of top CpGs with the most significant changes in methylation during psychotic conversion correctly classified converters and non-converters, with no influence of medication initiation. Pathway analysis revealed that these top epigenetic changes were overrepresented in certain biological pathways, including an axon guidance pathway and the IL-17 pathway. The axon guidance pathway included the neural cell adhesion protein CHL1 gene (cell adhesion molecule L1-like), which codes for the L1CAM2 protein. The L1 family encompasses immunoglobulin-class recognition proteins that promote axon growth and migration in developing neurons.²⁷ In preclinical models, a deficit of CHL1 in adult mice impairs working memory,²⁸ social behavior and synaptic transmission.²⁹ Genetic variants in the CHL1 gene have been found to be associated with schizophrenia.^{30–32} Neuropilin1 (NRP1), also included in this pathway, acts as a receptor that mediates axonal inhibition or repulsion. Neuropilin1 colocalizes with L1CAM2 in the thalamic axons³³ and in immature neurons,³⁴ they interact together in growth cone collapse, a process important for developing axons.³³ EFNA3, the third gene found in our analysis, is highly expressed in mature neurons, suggesting that an imbalance in expression exists during cerebral maturation between CHL1, NRP1 and EFNA3. EFNA3 encodes ephrin-A3, which is a critical protein for the regulation of synaptic function and plasticity in astrocytes.³⁵ The second signaling pathway, namely the IL-17 pathway, is involved in the regulation of inflammatory factors and in the immune response to bacterial pathogens. Variations in genes involved in immune response is a recurrent finding in association studies of schizophrenia.^{36,37} A recent proteomic study identified ILs as potential diagnostic biomarkers in the onset of psychosis.³⁸ Differences in the level of several inflammatory cytokine were found in individuals with schizophrenia compared with healthy controls, with a positive correlation between the levels of cytokines in the IL-17 pathway and scores on the Positive and Negative Symptoms Scale.³⁹ This pathway

includes AKT1, a serine–threonine kinase and a critical mediator of growth-factor-induced neuronal survival in the developing nervous system.⁴⁰ Decreased AKT1 protein levels and phosphorylation activity were documented in the lymphocytes and brains of individuals with schizophrenia.^{41,42} In addition, it was reported that AKT1 genetic variants were associated with schizophrenia, in relation to cannabis use.⁴³

The genome-wide approach, without predefined candidate regions, was crucial for identifying new relevant regions that undergo differential methylation or demethylation changes in converters and non-converters across the baseline and follow-up intervals. Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip interrogates about 485 000 CpG sites after bisulfite conversion of unmethylated cytosines. This design is valuable as it does not require the selection of a small number of 'candidate' genes or methylation sites. Further, we compared these results with a reference method based on pyrosequencing; the correlation was significant between the beadchip and pyrosequencing as reported in the literature.¹⁵ Pyrosequencing identified additional differentially methylated neighboring CpGs in GSTM5 promoter (four additional CpGs not initially interrogated by the Meth450K array), further strengthening the methylomic results.

The genes identified in our study had not been previously reported in methylomic studies of schizophrenia.^{6,44,45} These differences may be due to the fact that, in addition to methodological issues (notably differences in methylome coverage), we employed an original methodology based on longitudinal variation in methylation levels, which cannot easily be compared with methylation measurements from single time point studies in subjects with established schizophrenia. Moreover, in two of the three published studies, patients were aged 30 years older, on average, than our participants and methylation changes with age.⁴⁶

The present work was conducted in adolescents and young adults consecutively referred to a clinic specialized for early detection of psychosis and enrolled in a longitudinal follow-up program. We did not find any differences in environmental exposure between those who converted to psychosis and those who did not, and the methylation changes associated with conversion to psychosis were not related to the initiation of medication. The observed modifications in methylation are thus more likely to be linked to psychosis conversion than to medication initiation or other environmental changes. Even if the sample sizes were sufficient to identify some significant DMRs, larger samples are needed to identify other DMRs. Another issue to identify DMRs is the molecular and clinical heterogeneity between individuals, a well-known issue in the genetics of psychosis.⁴⁷ The sample size could not allow us to overpass this heterogeneity.

The amplitude of methylation changes in DMR was similar to that found in previous studies in peripheral tissues comparing individuals with psychiatric disorders and healthy controls^{44,48} and seems to be biologically relevant (>10%). However, our observations suggest that individual methylation levels are relatively stable. The extent to which these findings (which were based on peripheral markers) reflect methylation processes in the brain cannot be definitively concluded. Mounting evidence favors a relative concordance between methylation profiles in the brain and blood peripheral cells,^{49,50} although the amplitude of peripheral methylation levels might be lower for the equivalent loci in central tissues.⁴⁵ Blood and brain convergence has been investigated by the beadchip suggesting that subset of peripheral data may proxy methylation status of brain tissue.⁵¹ Within-subjects design, as we performed here, are recommended.

Our study has several strengths: We conducted a long-term prospective follow-up in both individuals at UHR for psychosis and non-UHR subjects. We used rapidly frozen samples enabling the study of a larger number of methylation sites (even more labile ones). We report longitudinal variations in methylation, which are more suitable for reflecting dynamic epigenetic processes

compared with single time point analyses. We used a genome-wide strategy rather than limited candidate genes strategy. We used newly developed pathway and clustering analyses to investigate the functional relevance of top CpG methylation sites. Several issues need to be addressed in future studies, however, including the problem of clinical heterogeneity and the possible influence of a larger number of environmental factors (for example, early stressful events). It will also be important to make direct measures of maturational changes (for example, using brain imaging) and to examine interactions between CpG methylation and other mechanisms of epigenetic regulation. Finally, inter-individual heterogeneity raises a yet-to-be-investigated hypothesis that private epimutations might be involved in the conversion to psychosis.

In conclusion, we found that the conversion to psychosis in young help seekers is accompanied by epigenetic changes in genes involved in relevant genes and pathways. We also identified possible candidate mechanisms, including alterations in oxidative stress regulation, axon guidance and in inflammatory pathways. These candidate genes could represent multiple theaters for the disruption in homeostasis that accompanies the emergence of full-blown psychosis. At this point, it is unknown whether the observed methylation changes have a causal role in the processes leading to psychosis or whether they are simply reflective of psychosis onset. These new observations shed light on the biological processes underlying the interactions between early vulnerability, late environmental response and maturational processes at adolescence that can precipitate some UHR individuals into full-blown psychosis. This exploratory study is a first step toward the identification of epigenetic changes accompanying the onset of psychosis and opens new perspectives for early intervention and prevention in psychosis. Replications in larger and/or independent samples are warranted to reach definitive conclusions. Future developments should also investigate the functional impact of these methylation changes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients and parents who participated in the ICAAR study and all other practitioners involved in the ICAAR study, the staff of the Clinical research center (Marie José Dos Santos, Caroline Gaillard, Aurélien Bongrand, Michèle Alabi) and C'JAAD (Centre d'Evaluation pour Jeunes Adultes et Adolescents, especially François Chauchot, Anne Gut, Emilie Magaud, Célia Mam-Lam-Fook, Mathilde Kazes) at Service Hospitalo-Universitaire, Centre Hospitalier Sainte-Anne for their role in subject's assessment and follow-up as well as the data management, with a special thanks to Caroline Gaillard. We also thank the URC Paris Centre Descartes (AP-HP), INSERM and DRCI for reglementary and technical assistances. We are extremely grateful to Laure Ferry, Assistant Engineer in charge of the Functional Epigenomic Platform in UMR7216, for her excellent technical training of the pyrosequencing experiments, to Guillaume Velasco (Assistant Professor, UPD, for his invaluable help and advices and to the UMR7216 Platform Committee (Slimane Ait-Si-Ali, Jean-François Ouimette, Guillaume Velasco and Pierre Antoine-Defossez) for selecting our project. Thanks to Marwa Kharrat for her technical help in the initial steps of pyrosequencing. We acknowledge Simon Girard for his very crucial statistical advices, Bill P Godsil for the english editing and also to Kasper Daniel Hansen and Andres Houseman for their help in the use of bio-informatical pipelines. This work was supported by the French Gouvernement Agence Nationale pour la Recherche grant (ANR, 08-MNP-007) and by the French Ministry for Health grant Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC, AOM-07-118). Centre Hospitalier Sainte-Anne promoted the study. Additional financial supports were obtained from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, recurrent funding and fellowships BC), Université Paris Descartes (recurrent funding), Fondation pour la Recherche Médicale (CML) and Fondation Deniker and Fonds Québécois de Recherche sur la Société et la Culture-INSERM joint grant (MOK, OK). The sponsors had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis or interpretation of the data; preparation, review or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication. VM's laboratory, including FM by a

postdoctoral fellowship, has been supported by Agence Nationale pour la Recherche (Program SAMENTA ANR-13-SAMA-0008-01).

MEMBERS OF THE ICAAR TEAM

Célia Mam-Lam-Fook, Charlotte Alexandre, Emilie Magaud, Gilles Martinez, Mathilde Kazes, Mélanie Chayot, Olivier Gay, Zeldia Prost.

REFERENCES

- 1 Yung AR, McGorry PD. The initial prodrome in psychosis: descriptive and qualitative aspects. *Aust N Z J Psychiatry* 1996; **30**: 587–599.
- 2 Correll CU, Hauser M, Auther AM, Cornblatt BA. Research in people with psychosis risk syndrome: a review of the current evidence and future directions. *J Child Psychol Psychiatry* 2010; **51**: 390–431.
- 3 Fusar-Poli P, Bonoldi I, Yung AR, Borgwardt S, Kempton MJ, Valmaggia L et al. Predicting psychosis: meta-analysis of transition outcomes in individuals at high clinical risk. *Arch Gen Psychiatry* 2012; **69**: 220–229.
- 4 European Network of National Networks studying Gene-Environment Interactions in Schizophrenia (EU-GEI), van Os J, Rutten BP, Myin-Germeys I, Delespaul P, Viechtbauer W et al. Identifying gene-environment interactions in schizophrenia: contemporary challenges for integrated, large-scale investigations. *Schizophr Bull* 2014; **40**: 729–736.
- 5 Rivollier F, Lotersztajn L, Chaumette B, Krebs M-O, Kebir O. Epigenetics of schizophrenia: a review. *Encephale* 2014; **40**: 380–386.
- 6 Aberg KA, McClay JL, Nerella S, Clark S, Kumar G, Chen W et al. Methylome-wide association study of schizophrenia: identifying blood biomarker signatures of environmental insults. *JAMA Psychiatry* 2014; **71**: 255–264.
- 7 Chaumette B, Kebir O, Mam Lam Fook C, Morvan Y, Bourgin J, Godsil BP. Salivary cortisol in early psychosis: new findings and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 2015; **63**: 262–270.
- 8 Yung AR, Yuen HP, McGorry PD, Phillips LJ, Kelly D, Dell'Olio M et al. Mapping the onset of psychosis: the Comprehensive Assessment of At-Risk Mental States. *Aust N Z J Psychiatry* 2005; **39**: 964–971.
- 9 Krebs M-O, Magaud E, Willard D, Elkhazen C, Chauchot F, Gut A et al. Assessment of mental states at risk of psychotic transition: Validation of the French version of the CAARMS. *L'Encephale* 2014; **40**: 447–456.
- 10 Price ME, Cotton AM, Lam LL, Farré P, Emberly E, Brown CJ et al. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics Chromatin* 2013; **6**: 4.
- 11 Diboun I, Wernisch L, Orengo CA, Koltzenburg M. Microarray analysis after RNA amplification can detect pronounced differences in gene expression using limma. *BMC Genomics* 2006; **7**: 252.
- 12 Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D793–D800.
- 13 Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013; **14**: 128.
- 14 Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 2003; **34**: 374–378.
- 15 Roessler J, Ammerpohl O, Gutwein J, Hasemeier B, Anwar SL, Kreipe H et al. Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc. *BMC Res Notes* 2012; **5**: 210.
- 16 Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2007; **2**: 2265–2275.
- 17 Xiao L, Wang Y, Zhou Y, Sun Y, Sun W, Wang L et al. Identification of a novel human cancer/testis gene MAEL that is regulated by DNA methylation. *Mol Biol Rep* 2010; **37**: 2355–2360.
- 18 Rees E, Walters JTR, Georgieva L, Isles AR, Chambert KD, Richards AL et al. Analysis of copy number variations at 15 schizophrenia-associated loci. *Br J Psychiatry* 2014; **204**: 108–114.
- 19 Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet* 2009; **84**: 148–161.
- 20 Do KQ, Cabungcal JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 2009; **19**: 220–230.
- 21 Koga M, Serritella AV, Sawa A, Sedlak TW. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophr Res* 2016 (in press).
- 22 Listowsky I. A subclass of mu glutathione S-transferases selectively expressed in testis and brain. *Methods Enzymol* 2005; **401**: 278–287.
- 23 Knight TR, Choudhuri S, Klaassen CD. Constitutive mRNA expression of various glutathione S-transferase isoforms in different tissues of mice. *Toxicol Sci* 2007; **100**: 513–524.

- 24 Hayes KR, Young BM, Pletcher MT. Expression quantitative trait loci mapping identifies new genetic models of glutathione S-transferase variation. *Drug Metab Dispos* 2009; **37**: 1269–1276.
- 25 Gawryluk JW, Wang J-F, Andreatza AC, Shao L, Yatham LN, Young LT. Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; **14**: 1069–1074.
- 26 Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, Vauléon E, Boniface R, Guenot F *et al*. DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics* 2010; **11**: 701.
- 27 Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 2007; **10**: 19–26.
- 28 Kolata S, Wu J, Light K, Schachner M, Matzel LD. Impaired working memory duration but normal learning abilities found in mice that are conditionally deficient in the close homolog of L1. *J Neurosci* 2008; **28**: 13505–13510.
- 29 Morellini F, Lepsveridze E, Kähler B, Dityatev A, Schachner M. Reduced reactivity to novelty, impaired social behavior, and enhanced basal synaptic excitatory activity in perforant path projections to the dentate gyrus in young adult mice deficient in the neural cell adhesion molecule CHL1. *Mol Cell Neurosci* 2007; **34**: 121–136.
- 30 Chen Q-Y, Chen Q, Feng G-Y, Lindpaintner K, Chen Y, Sun X *et al*. Case-control association study of the close homologue of L1 (CHL1) gene and schizophrenia in the Chinese population. *Schizophr Res* 2005; **73**: 269–274.
- 31 Sakurai K, Migita O, Toru M, Arinami T. An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002; **7**: 412–415.
- 32 Tam GWC, van de Lagemaat LN, Redon R, Strathdee KE, Croning MDR, Malloy MP *et al*. Confirmed rare copy number variants implicate novel genes in schizophrenia. *Biochem Soc Trans* 2010; **38**: 445–451.
- 33 Wright AG, Demyanenko GP, Powell A, Schachner M, Enriquez-Barreto L, Tran TS *et al*. Close homolog of L1 and neuropilin 1 mediate guidance of thalamocortical axons at the ventral telencephalon. *J Neurosci* 2007; **27**: 13667–13679.
- 34 McIntyre JC, Titlow WB, McClintock TS. Axon growth and guidance genes identify nascent, immature, and mature olfactory sensory neurons. *J Neurosci Res* 2010; **88**: 3243–3256.
- 35 Filosa A, Paixão S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B *et al*. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat Neurosci* 2009; **12**: 1285–1292.
- 36 Corvin A, Morris DW. Genome-wide association studies: findings at the major histocompatibility complex locus in psychosis. *Biol Psychiatry* 2014; **75**: 276–283.
- 37 Andreassen OA, Harbo HF, Wang Y, Thompson WK, Schork AJ, Mattingsdal M *et al*. Genetic pleiotropy between multiple sclerosis and schizophrenia but not bipolar disorder: differential involvement of immune-related gene loci. *Mol Psychiatry* 2014; **20**: 207–214.
- 38 Chan MK, Krebs M-O, Cox D, Guest PC, Yolken RH, Rahmoune H *et al*. Development of a blood-based molecular biomarker test for identification of schizophrenia before disease onset. *Transl Psychiatry* 2015; **5**: e601.
- 39 Dimitrov DH, Lee S, Yantis J, Valdez C, Paredes RM, Braidá N *et al*. Differential correlations between inflammatory cytokines and psychopathology in veterans with schizophrenia: potential role for IL-17 pathway. *Schizophr Res* 2013; **151**: 29–35.
- 40 Lai W-S, Xu B, Westphal KGC, Paterlini M, Olivier B, Pavlidis P *et al*. Akt1 deficiency affects neuronal morphology and predisposes to abnormalities in prefrontal cortex functioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 16906–16911.
- 41 Balu DT, Carlson GC, Talbot K, Kazi H, Hill-Smith TE, Easton RM *et al*. Akt1 deficiency in schizophrenia and impairment of hippocampal plasticity and function. *Hippocampus* 2012; **22**: 230–240.
- 42 Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y *et al*. Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population. *Biol Psychiatry* 2004; **56**: 698–700.
- 43 Di Forti M, Iyegbe C, Sallis H, Koliakou A, Falcone MA, Paparelli A *et al*. Confirmation that the AKT1 (rs2494732) genotype influences the risk of psychosis in cannabis users. *Biol Psychiatry* 2012; **72**: 811–816.
- 44 Nishioka M, Bundo M, Koike S, Takizawa R, Kakiuchi C, Araki T *et al*. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. *J Hum Genet* 2013; **58**: 91–97.
- 45 Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F *et al*. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 4786–4796.
- 46 Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML *et al*. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 10604–10609.
- 47 Purcell SM, Moran JL, Fromer M, Ruderfer D, Solovieff N, Roussos P *et al*. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature* 2014; **506**: 185–190.
- 48 Wong CCY, Meaburn EL, Ronald A, Price TS, Jeffries AR, Schalkwyk LC *et al*. Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol Psychiatry* 2013; **19**: 495–503.
- 49 Masliah E, Dumaop W, Galasko D, Desplats P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics* 2013; **8**: 1030–1038.
- 50 Kaminsky Z, Tochigi M, Jia P, Pal M, Mill J, Kwan A *et al*. A multi-tissue analysis identifies HLA complex group 9 gene methylation differences in bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2012; **17**: 728–740.
- 51 Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V *et al*. Correspondence of DNA methylation between blood and brain tissue and its application to schizophrenia research. *Schizophr Bull* 2015; **42**: 406–414.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

II.3 Analyse transcriptomique

Si des différences de méthylation de l'ADN au cours de la transition psychotique ont été mises en évidence et confirmées, l'impact fonctionnel de ces variations reste inconnu. Pour comprendre leur implication en termes d'expression des gènes, nous avons conduit une analyse transcriptomique. La transcriptomique est l'étude du nombre d'ARN messagers (ARNm) transcrits et reflète donc l'expression génique. Etudier le niveau d'expression des gènes précédemment définis comme dysméthylés au cours de la transition psychotique serait un argument démontrant que des changements de méthylation peuvent avoir un effet fonctionnel sur l'expression des gènes et qu'ils peuvent être liés à la transition psychotique.

Nous avons opté pour une approche sans hypothèse a priori, en utilisant une technique de RNAseq. Le RNAseq est une technique de séquençage à haut débit bien validée qui permet d'étudier la séquence mais aussi l'expression différentielle de l'ensemble des gènes d'un échantillon et des différents transcrits d'un même gène (notamment dans le cas de gènes avec épissage alternatif) (160). Certaines puces de transcription permettent également des études pan-génomiques mais l'avantage du RNAseq est de permettre la découverte de nouveaux transcrits non encore répertoriés et d'investiguer toutes les isoformes d'un gène même celles encore inconnues. De plus, l'existence de promoteurs alternatifs, potentiellement impliqués dans la physiopathologie de la schizophrénie (161) peut être investiguée par cette approche. Enfin, le RNAseq est un outil permettant d'identifier des transcrits de fusion qui pourraient jouer un rôle dans certaines formes rares de schizophrénie (162). En accédant à la séquence exonique « exprimée », le RNAseq pourrait permettre de rechercher des mutations rares différentes de celles retrouvées par séquençage d'exome (163). Tous ces aspects étaient importants à explorer, conduisant au choix de réaliser un RNAseq sur des échantillons sélectionnés.

D'autres techniques d'exploration de la transcription existent, notamment la PCR quantitative (Q-PCR). Cette technique permet d'étudier l'expression d'un seul gène ou au mieux d'un nombre limité de gènes (Q-PCR multiplex). Nos résultats de méthylation et de transcriptions les plus probants ont été soumis à une confirmation par Q-PCR. Le détail du protocole figure en **annexe**.

Trois analyses bio-informatiques ont donc été réalisées à partir des données de RNAseq: cufflinks - edgeR - DESeq. Ces analyses reposent soit sur l'analyse des read counts soit sur celle des FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per million fragments Mapped) (tableau 2.1).

METHODOLOGIE	FPKM	READ COUNTS
PRINCIPE	Le nombre de séquences ARN lues est pondéré par la taille du gène	Le nombre de séquences ARN lues est donné en valeur brute
INTERET	Estimation plus précise de l'expression réelle d'un gène	Pas de normalisation nécessaire pour les comparaisons différentielles
ALGORITHMES CORRESPONDANTS UTILISES	Cufflinks	edgeR DESeq

Tableau 2.1 : comparaison des deux méthodes d'analyse des données RNAseq

Nous avons déterminé la meilleure de ces analyses à partir des QQ-plot. D'après les QQ-plots, le package edgeR était celui qui était le plus fiable pour les données recueillies à MF : la distribution des p-values ressemblant à celle attendue. Cufflinks présentait un risque de faux positifs et DESeq un risque de faux négatifs. La concordance entre ces 3 packages a permis de retrouver un même gène dérégulé qui est donc très vraisemblablement un vrai positif. Il est intéressant de noter que la p-value pour ce gène dans chacun des packages est différente alors que le fold-change de l'expression reste stable. Cela pourrait suggérer que la donnée la plus fiable serait le fold-change qui est pourtant souvent regardée dans un 2^e temps, uniquement pour des résultats dont la significativité est établie.

Les résultats ont fait l'objet d'un poster présenté au XXIII^e World Congress of Psychiatric Genetics 2015 à Toronto (Canada) (**poster en annexe**).

II.3.A Comparaison des futurs transiteurs et des contrôles à M0

Les trois algorithmes ont été utilisés pour déterminer les gènes et les transcrits différentiellement exprimés à M0 entre les futurs transiteurs et les NUHR. Trois analyses ont donc été réalisées : cufflinks - edgeR - DESeq. La figure 2.5 présente le density plot de l'ensemble des transcrits ; le Volcano Plot montrant la p-value et le fold change pour chaque gène est représenté par la figure 2.6.

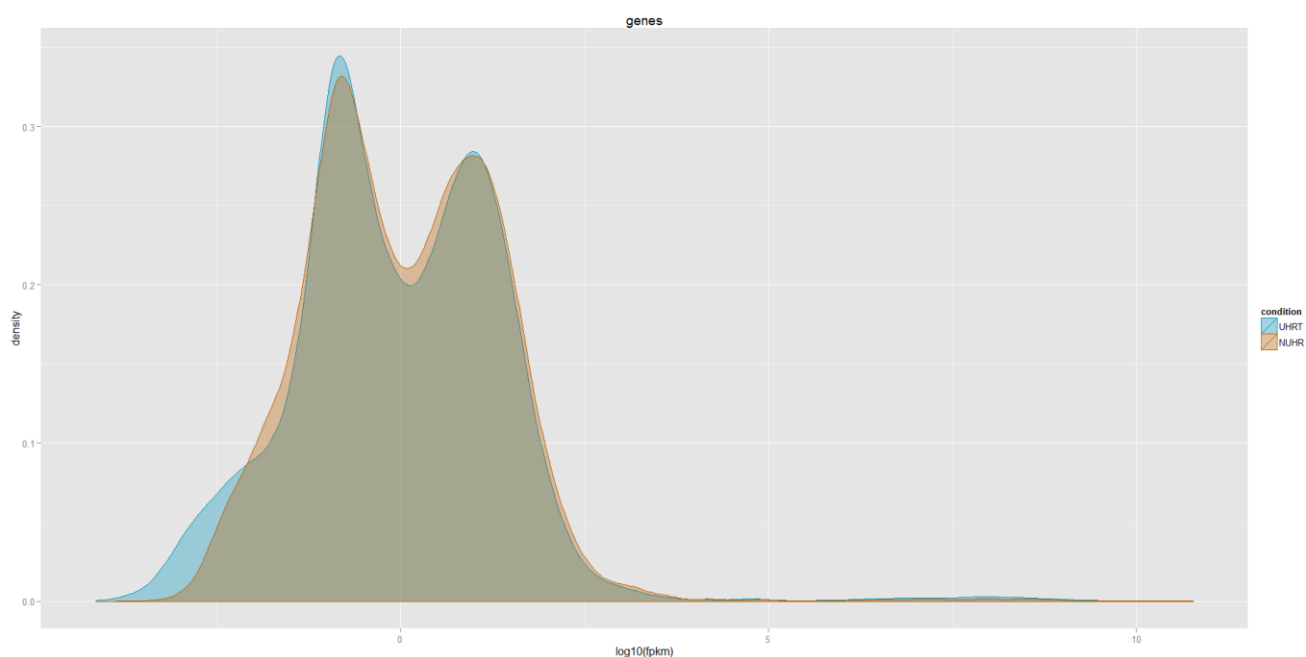


Figure 2. 5 : Density plot donnant le niveau d'expression pour chaque gène. Il n'y a pas de différence évidente d'expressivité des gènes entre les deux groupes.

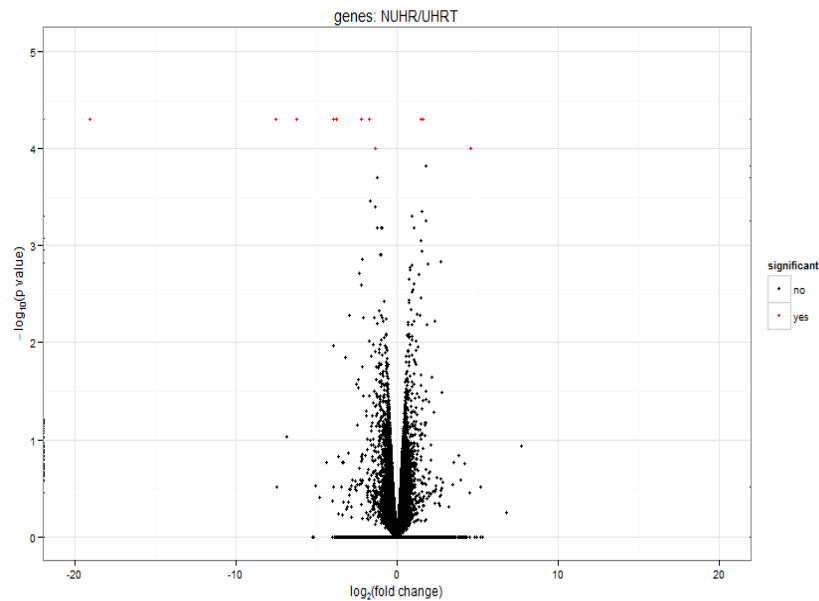


Figure 2.6 : Volcano Plot représentant pour chaque gène (symbolisé par un point) la p-value (significativité des différences d'expression) entre les deux groupes en fonction du fold change (niveau de différence d'expression) – en rouge, les gènes significatifs

Les résultats les plus significatifs sont présentés dans le tableau 2.2.

GENES IDENTIFIES PAR CUFFDIFF	Fold Change	Q-value
CHR1:89595583-89595609	condition	0,043
CHR11:133860201-133860224	condition	0,043
RNASE2*	-1,5	0,043
LINC00226	19,1	0,043
CHR15:48605641-48613248*	3,9	0,043
SLC12A1	3,7	0,043
CHR16:79970698-79970713	condition	0,043
KHSRP	1,7	0,043
CLC	-1,6	0,043
LOC101929733	condition	0,043
ALPI*	condition	0,043
CHR2:190377035-190377057*	condition	0,043
CHR3:150509730-150509754	condition	0,043
CHR6:126748302-126748323*	condition	0,043
AEBP1	7,5	0,043
CHR7:30216576-30216972	condition	0,043
TMEM176B*	2,2	0,043
CPSF1*	6,2	0,043
CHR9:29298531-29298555	condition	0,043
VANGL2*	-4,6	0,078
IGL	1,3	0,078

GENES IDENTIFIES PAR EDGE R		
GENE	Fold Change	FDR
ALPI	-9,3	0,000
VANGL2	-4,8	0,000
GPR156	-4,5	0,016
C19ORF76*	-2,0	0,033
HUNK	-2,4	0,087
STAC	-2,5	0,087
CCL23	-2,8	0,138
HSD17B12*	0,9	0,159
GPR142	-2,9	0,260
ERN2	-3,9	0,354
ODZ3	-4,7	0,575
LAG3	-1,0	0,578
LYPD2	-2,4	0,641
HUS1B	-2,7	0,757
CLC	-1,6	0,914
SERPINE2*	1,3	0,914
MOCOS	5,4	0,914
KIAA1598	1,0	0,914
RNASE2	-1,5	0,914
CCDC24	-1,0	0,914
GENES IDENTIFIES PAR DESEQ		
GENE	Fold Change	p_ajusté
HSD17B12	0,8	0,020
HS3ST1	0,8	0,660
SERPINE2*	0,8	0,660
HUNK	-0,8	0,824
CCDC24	-0,8	0,824
LAG3	-0,7	0,866
SEPT-10	0,6	0,866
KIAA1598	0,7	0,866
CMPK2	0,7	0,866
SOWAHC	0,6	0,866
NINL	0,7	0,866
VSIG10	-0,7	0,866
HUS1B	-0,5	0,866
ADAMTS5	0,8	0,866

Tableau 2.2 : Gènes identifiés comme dérégulés à M0 selon les 3 algorithmes différents. « Condition » signifie que le gène n'est exprimé que dans un seul groupe de patients. En rouge figurent les gènes qui sont identifiés comme dérégulés par au moins 2 algorithmes. Les gènes marqués d'une * sont également retrouvés comme dérégulés à MF selon le même algorithme.

II.3.B Comparaison des patients psychotiques et des contrôles à MF

Les mêmes analyses ont été menées à MF avec les 3 pipelines. De manière intéressante, certains gènes semblent toujours dérégulés à MF alors qu'ils étaient déjà différentiellement exprimés à M0 (résultats marqués d'une * dans le tableau précédent). Ce résultat suggère que leur transcription pourrait être altérée avant même le premier épisode psychotique. En revanche, le gène SLC7A8, transporteur du tryptophane et retrouvé par les 3 algorithmes (voir poster présenté au WCPG en **annexe**), semble spécifiquement dérégulé à MF. Il en est de même pour les gènes PMP22 et CCR5 retrouvés par au moins 2 algorithmes à MF uniquement.

II.3.C Expression différentielle au cours de la transition psychotique

Une analyse longitudinale différentielle a été conduite à partir de l'approche read counts à l'aide des deux packages edgeR et DESeq en utilisant une matrice de contraste étudiant l'interaction *groupe : temps*. Le logiciel Cufflinks ne permet pas de rechercher des différences selon un tel paradigme. Le seul résultat significatif et retrouvé par les deux algorithmes est le gène HSPB7. D'autres résultats avec une p-value nominale intéressante sont également communs aux 2 analyses. Nous avons réalisé des Q-PCR (protocole en **annexe**) afin de confirmer certains résultats obtenus par RNAseq sur l'ensemble de la cohorte ICAAR, incluant les échantillons déjà utilisés pour le RNAseq (validation biologique). Le gène CPT1A a ainsi été confirmé. En revanche HSPB7 était trop peu souvent exprimé pour conclure. De même, nous avons réalisé des Q-PCR pour vérifier si les modifications de méthylation observées au cours de la transition psychotique étaient également associées à des différences d'expression ce qui était le cas pour NRP1. Cette analyse constitue une analyse par concordance car conduit à recouper les résultats obtenus au cours de la transition psychotique par deux techniques différentes. Parmi les résultats significatifs du RNAseq, la différence d'expression des gènes n'étaient pas liés à des DMP ni à des DMR. Ce résultat suggère que la dérégulation transcriptomique au cours de la transition psychotique pourrait être liée à d'autres mécanismes épigénétiques (voir chapitre 1.2) notamment les modifications des histones. D'autres analyses multi-omiques sont en cours de gestation et seront proposées dans la discussion. Les données transcriptomiques au cours de la transition psychotique font l'objet d'un article soumis.

Longitudinal analyses of blood transcriptome during conversion to psychosis

Chaumette B^{1,2}, Kebir O^{1,2}, Pouch J³, Ducos B^{3,4}, Selimi F⁵, ICAAR study group^a, Gaillard R^{1,2}, Krebs MO^{1,2,*}

- 1 Université Paris Descartes; Univ Sorbonne Paris Cité; INSERM, Laboratoire de Physiopathologie des Maladies Psychiatriques, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, UMR 894, GDR3557-Institut de Psychiatrie, Paris 75014, France
 - 2 Centre Hospitalier Sainte-Anne, Service Hospitalo-Universitaire, Paris, France
 - 3 Plateforme qPCR-HD-GPC, Ecole Normale Supérieure, Fondation Pierre-Gilles de Gennes, PSL Research University, Paris 75005, France
 - 4 Laboratoire de Physique Statistique, Ecole normale Supérieure, PSL Research University, Université Paris-Diderot Sorbonne Paris-Cité, Sorbonne Universités Univ Paris 06, CNRS UMR8550, Paris 75005, France
 - 5 Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France; CNRS UMR 7241; and INSERM U1050, Paris 75005, France.
- * Corresponding author
- a Members of the ICAAR Study Group who contributed to this paper are as follows: Trial Coordination: M.O. Krebs. Coordinating teams: Clinical: J Bourgin, M Plaze, M Kazes, G Martinez; Biology: O Kebir, B Chaumette ; Brain imaging: M Plaze, O Gay; Cognition: I Amado, E Magaud. Data Management and Statistical Analysis: C Gaillard, B Chaumette. Centers: Coordinating Center, Paris Sainte-Anne Hospital — SHU : MO Krebs, M Plaze, E Magaud, M Kazes, C Mam-Lam-Fook, C Daban, O Gay, J Bourgin, G Martinez, S13 : M-N Vacheron, A Viala, Addictology center X Laqueille, A Dervaux, S17 F Petitjean, O Canceil, S18 B Garnier, M Fishmann-Mathis, Paris Cochin Hospital Maison des Adolescents B Gal, JP Benoit, MR Moro; Sainte-Anne Hospital Clinical evaluation and research Center staff (CERC).

Keywords: transcriptome, mRNA, schizophrenia, at-risk mental state, prodromal

Number of words in abstract: 63

Number of words in main text: 974

Abstract

The biological processes associated with the onset of schizophrenia remain largely unknown. We conducted the first longitudinal transcriptomic analysis in blood samples from young individuals at ultra-high risk of conversion to psychosis. We identified 14 genes and 2 gene networks differentially expressed during psychotic transition and confirmed the differential expression of CPT1A and NRP1, genes involved in fatty-acid metabolism and axon guidance, respectively.

II.4 Anomalies du cycle monocarboné chez les individus présentant un état mental à risque

Afin de déterminer si les modifications de méthylation pouvaient être liées à des anomalies globales de la synthèse des groupements méthyles, nous avons recherché si des anomalies du métabolisme du C1 pouvaient être associées à des statuts cliniques au sein de la cohorte ICAAR. Au sein de la cohorte, plusieurs patients présentaient des carences en folate, en vitamine B12 et une hyperhomocystéinémie. Certaines de ces anomalies biologiques s'expliquaient mutuellement puisque les carences en folates sont connues pour donner des hyperhomocystéinémie. L'explication pouvait également être liée à l'association de variants génétiques moins fonctionnels sur les enzymes du métabolisme mono-carboné. Le métabolisme C1 implique des enzymes variées dont plusieurs polymorphismes ont été associés à des maladies humaines. Parmi les différents polymorphismes des enzymes clés du cycle monocarboné pouvant conduire à des anomalies de la dégradation de l'homocystéine (164), nous avons étudié les SNP listés ci-dessous :

- Cystathionine β synthase : CBS T833C (rs5742905)
- Méthylène-tétrahydrofolate réductase : MTHFR C677T (rs1801133) et A1298C (rs1801131)
- Méthionine synthase reductase : MTRR A66G (rs1801394)
- Méthionine synthase : MTR A2756G (rs1805087)

Les deux polymorphismes de MTHFR séparés par moins de 100 bp (rs1801131-rs1801133) formaient un haplotype (figure 2.7)

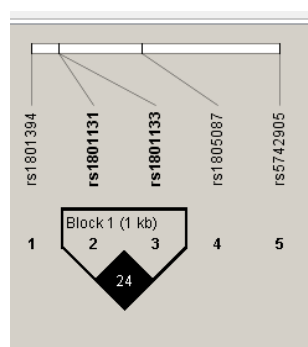


Figure 2.7 montrant l'haplotype formé par deux SNP de MTHFR (R-square = 24)

Cet haplotype n'est cependant pas associé à la psychose dans notre cohorte ICAAR selon le logiciel Haploview (tableau 2.3).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
AT	0.358	60.0 : 98.0, 159.0 : 295.0	0.445	0.5049
AC	0.340	53.0 : 105.0, 155.0 : 299.0	0.019	0.8915
CC	0.302	45.0 : 113.0, 140.0 : 314.0	0.308	0.5786

Tableau 2.3 montrant la non-association entre les différents haplotypes du gène MTHFR et le statut clinique.

Nous avons voulu répliquer les données de la littérature et vérifier que ces polymorphismes et l'expression des gènes correspondants étaient plus fréquemment associés à des anomalies biologiques touchant les vitamines B9 et B12 et conduisant à une hyperhomocystéinémie dans notre cohorte.

La schizophrénie étant une maladie hétérogène, nous avons conduit une analyse par cluster non-supervisé afin d'identifier des sous-groupes sur des bases biologiques. Cette analyse a révélé l'existence d'un sous-groupe avec des valeurs biologiques à risque, sans doute lié à un fonctionnement différent des enzymes du C1. Les individus présents dans ce sous-groupe présentent différentes pathologies (dépression, schizophrénie, bipolarité, troubles envahissants du développement) mais ont la particularité d'avoir des symptômes négatifs prononcés. En revanche l'appartenance à ce groupe à risque biologique ne permettait pas d'expliquer la transition psychotique ce qui suggère que les modifications de méthylation observées au cours de ce processus ne sont pas gouvernées par des anomalies primaires de la machinerie épigénétique.

Ces analyses ont donné lieu à un article soumis.

One-carbon metabolism in psychiatric disorders: Evidence for an at-risk subgroup

Chaumette Boris, MSc ^{1,2}, Kebir Oussama, MD-PhD ^{1,2}, Saffroy Raphaël MD ³, ICAAR study group^a, Martinez Gilles MD, Msc ^{1,2}, Gaillard Raphaël MD, PhD ^{1,2}, Plaze Marion MD, PhD ^{1,2}, Krebs Marie-Odile MD, PhD ^{1,2,*}

1 Université Paris Descartes; Bio Sorbonne Paris Cité; INSERM, Laboratoire de Physiopathologie des Maladies Psychiatriques, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, UMR 894, GDR3557-Institut de Psychiatrie, Paris, France

2 Centre Hospitalier Sainte-Anne, Service Hospitalo-Universitaire, Paris, France

3 Laboratoire de Biochimie et Oncogénétique des tumeurs solides - Hôpital Paul Brousse - Villejuif, France

* Corresponding author: Marie-Odile Krebs – mo.krebs@ch-sainte-anne.fr – Service Hospitalo-Universitaire – Centre Hospitalier Sainte Anne - 7 rue Cabanis – 75014 Paris (France)

a ICAAR study group : Members of the ICAAR Study Group who contributed to this paper are as follows: Trial Coordination: M.O. Krebs. Coordinating teams: Clinical : J Bourgin, M Plaze, M Kazes, G Martinez; Biology — O Kebir, B Chaumette ; Brain imaging —M Plaze, O Gay; Cognition — I Amado, E Magaud. Data Management and Statistical Analysis: C Gaillard, B Chaumette. Centers: Coordinating Center, Paris Sainte-Anne Hospital — SHU : MO Krebs, M Plaze, E Magaud, M Kazes, C Mam-Lam-Fook, C Daban, O Gay, J Bourgin, G Martinez, S13 : M-N Vacheron, A Viala, Addictology center X Laqueille, A Dervaux, S17 F Petitjean, O Canceil, S18 B Garnier, M Fishmann-Mathis, Paris Cochin Hospital Maison des Adolescents B Gal, JP Benoit, MR Moro; Sainte-Anne Hospital Clinical evaluation and research Center staff (CERC).

Keywords: homocysteinemia, vitamin, schizophrenia, depression, at-risk mental state, prodromal

Number of words in abstract: 302

Number of words in main text: 2790

Abstract

Importance: C1 metabolism, via the folate and methionine pathways, leads to homocysteine synthesis and is of particular relevance in human biology and medicine. While the clinical impact of C1 metabolism has been reported in various diseases, including cardiovascular and neurological illnesses, its involvement in psychiatric disorders is poorly understood.

Objective: To explore the clinical implication of C1 metabolism in psychiatry with an integrative approach.

Design: This study explored the levels of the principal product (homocysteine), its cofactors (folate, vitamin B12), the functional genotypes of enzymes (cystathionine beta synthase, methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase reductase and methionine synthase), as well as their expression (RNA messenger) in two independent cohorts recruited in a psychiatric hospital center (Ste Anne hospital – Paris –France) between 2009 and 2014.

Settings: This study combined data from an ambulatory referral center and in-hospitalized care to facilitate the translation to clinical practice.

Participants: The first cohort included young help-seekers showing different forms of psychological distress: anxious-depressive states, prodromal psychotic symptoms, or first-episode of psychosis. To test the replicability, as well as feasibility in routine care, we also investigated a second cohort that included psychotic and mood disorder inpatients.

Main outcomes: Impact of C1 metabolism in specific clinical presentation was hypothesized.

Results: Three biological clusters were identified in the discovery cohort and replicated in the second: a large majority of individuals were characterized by “intermediate metabolism”, some individuals exhibited “optimal functioning”, and a minority displayed “at-risk metabolism” (low folate and vitamin B12 levels, elevated homocysteinemia). This third cluster was not related to a specific categorical diagnosis, but was associated with negative dimension and resistant phenotypes.

Conclusion and Relevance: The at-risk subgroup could benefit from personalized therapy via folate supplementation, which is an acceptable and widely-available treatment. Early folate supplementation could be useful to prevent symptomatic emergence, or therapeutic resistance, in these specific patients.

II.5 Implication du stress dans la transition psychotique

S'il n'y a pas d'évidence montrant que le métabolisme C1 est à l'origine des modifications de méthylation observées au cours de la transition psychotique, il est probable que l'environnement puisse jouer un rôle dans ces modifications longitudinales. Les facteurs environnementaux connus pour être impliqués dans la psychose mettent pour la plupart en jeu l'axe du stress et donc son hormone finale : le cortisol. Les données concernant les taux de cortisol basal dans la schizophrénie sont en faveur d'un hypercorticisme (figure 2.8) mais celles concernant les états mentaux à risque sont moins évidentes. Nous avons tout d'abord effectué une revue systématique de la littérature pour répondre à cette question. Ces travaux ont été publiés dans la revue française L'Encéphale (**article en annexe**).

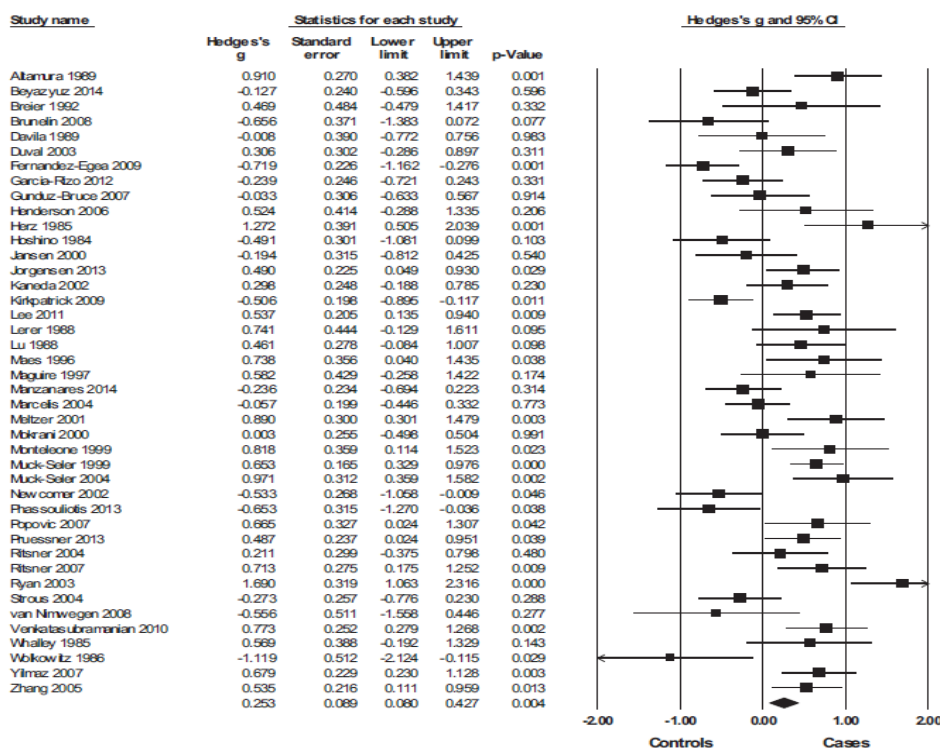


Figure 3 Forest plot for comparison of schizophrenia and controls.

Figure 2.8 extraite de Girskhin et al (139) montrant les résultats d'une méta-analyse sur l'association entre cortisol matinal et diagnostic de schizophrénie

Cette revue a mis en lumière les insuffisances actuelles de la littérature. En particulier, de nombreux articles sont publiés mais avec des résultats contradictoires et des méthodes ou des paradigmes variés. Nous avons donc poursuivi notre recherche bibliographique par une méta-analyse incluant les résultats de la cohorte ICAAR. En effet, environ la moitié des patients de la cohorte ICAAR ont été investigués par des salivettes permettant de recueillir et de doser le cortisol salivaire. Le niveau basal de cortisol salivaire n'était pas différent entre les UHR et les HSC ce qui suggère que les anomalies rapportées dans la littérature seraient davantage liées au stress de l'émergence de la pathologie psychiatrique qu'à des anomalies spécifiques à la transition psychotique. En outre, la comparaison avec les FEP ne retrouvait pas davantage de différence ce qui invalide le cortisol basal comme biomarqueur de la progression de la maladie. Cette approche au sein de la cohorte ICAAR a été complétée par une méta-analyse des données déjà disponibles dans la littérature.

Les résultats sont décrits dans un article publié dans *Psychoneuroendocrinology*.



Salivary cortisol in early psychosis: New findings and meta-analysis



Boris Chaumette^{a,b,c}, Oussama Kebir^{a,c}, Célia Mam-Lam-Fook^{a,b,c}, Yannick Morvan^d, Julie Bourgin^{a,c}, Bill P. Godsil^c, Marion Plaze^{a,c}, Raphaël Gaillard^{a,b,c}, Thérèse M. Jay^{b,c}, Marie-Odile Krebs^{a,b,c,*}

^a Centre Hospitalier Sainte-Anne, Service Hospitalo-Universitaire-S14, Faculté de Médecine Paris Descartes, 75014 Paris, France

^b Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

^c INSERM UMR 894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Laboratoire de Physiopathologie des Maladies Psychiatriques, Institut de Psychiatrie-GDR 3557 de Psychiatrie, 75014 Paris, France

^d Université Paris Ouest Nanterre La Défense, EVACLIPSY-CLIPSYD EA443, 92000 Nanterre, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2015

Received in revised form 12 October 2015

Accepted 13 October 2015

Keywords:

At-risk mental state

Ultra-high risk

Schizophrenia

First-episode psychosis

Prodromal

HPA axis

ABSTRACT

Background: Schizophrenia is a multifactorial disorder and environmental risk factors for it might contribute to hypothalamo–pituitary–adrenal axis (HPA) dysregulation. While increased cortisol levels have been reported in schizophrenia, as well as in early psychosis (compared to healthy controls), a crucial unresolved issue is whether elevated cortisol levels could be related to the distress of an emerging illness, rather than being specific to psychosis. Here, we report new findings from the first French cohort of young help-seekers (ICAAR) including ultra-high risk subjects (UHR), first-episode of psychosis (FEP) and non at-risk help seekers controls (HSC), followed by a meta-analysis of all available reports on salivary basal cortisol levels in early psychosis (UHR and FEP).

Methods: In the ICAAR study, 169 individuals (15–30 years old) had their basal cortisol levels sampled and they were categorized (at baseline) as either UHR, FEP, or HSC using the criteria of the Comprehensive Assessment of At-Risk Mental States (CAARMS). The three groups were compared at baseline, and the UHR and HSC individuals were also included in a one-year longitudinal follow-up. UHRs who converted to psychosis at the follow up (UHR-P) were compared to non-converters (UHR-NP). We also performed a meta-analysis from case-control studies with basal salivary measures of cortisol, drawing from a systematic bibliographic search using the keywords ‘cortisol’, ‘glucocorticoid’, ‘HPA’ with ‘UHR’, ‘CHR’, ‘at-risk mental state’, ‘schizotypal’, ‘prodromal schizophrenia’, ‘first-episode psychosis’, ‘first episode schizophrenia’, ‘newly diagnosed schizophrenia’, ‘recent onset schizophrenia’ [in Medline, Web of Knowledge (WOS), EBSCO], followed by a systematic screening of the resulting articles.

Results: Basal cortisol levels were not significantly different between UHR, FEP, and HSC controls in the ICAAR cohort. Interestingly, initial cortisol levels were correlated with positive symptoms at the one year follow-up in the ICAAR cohort. The meta-analysis revealed a significant elevation of the salivary basal cortisol levels in UHR individuals compared to controls (8 studies—1060 individuals), but not between FEP and controls (6 studies—441 individuals). Indirect comparison of salivary basal cortisol levels between UHR and FEP did not yield significant differences. Finally, no differences were detected between the baseline cortisol of UHR-P and UHR-NP (4 studies—301 individuals).

Conclusion: The meta-analysis (including new data) indicates that basal cortisol levels were increased in UHR compared to controls, but FEP levels were not different from UHR or controls. Many confounding factors could decrease the effect size in FEP especially medication intake. Taken together with our new results (which made use of help-seeker controls, and not merely healthy controls), the findings indicate that basal cortisol levels may not be a reliable biomarker for early psychosis. Further studies are needed to clarify the precise role of the HPA axis in psychotic conversion.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia is a complex multifactorial disorder (Modinos et al., 2013). In conjunction with genetic predisposition, several environmental factors, such as childhood adversity, urbanicity,

* Corresponding author at: Service Hospitalo-Universitaire, Centre Hospitalier Sainte-Anne, 7 rue Cabanis, 75014 Paris, France. Fax: +33 1 45 65 81 60.
E-mail address: marie-odile.krebs@inserm.fr (M.-O. Krebs).

La méta-analyse et les analyses ICAAR n'ont porté que sur le taux de cortisol basal. Cependant cette mesure est relativement limitée car elle ne reflète pas les variations nycthémerales de la sécrétion de cortisol. Elle est de plus soumise à de nombreux facteurs confondants qui ne peuvent être recensés par cette approche. Nous avons donc développé une approche statistique basée sur les équations structurelles. Ce type d'analyse repose sur une approche davantage fonctionnelle et permet d'analyser le profil cortisolique sur une journée à partir de quatre temps de mesure. Il n'existait pas de différence significative de ce profil en fonction des groupes cliniques (figure 2.9).

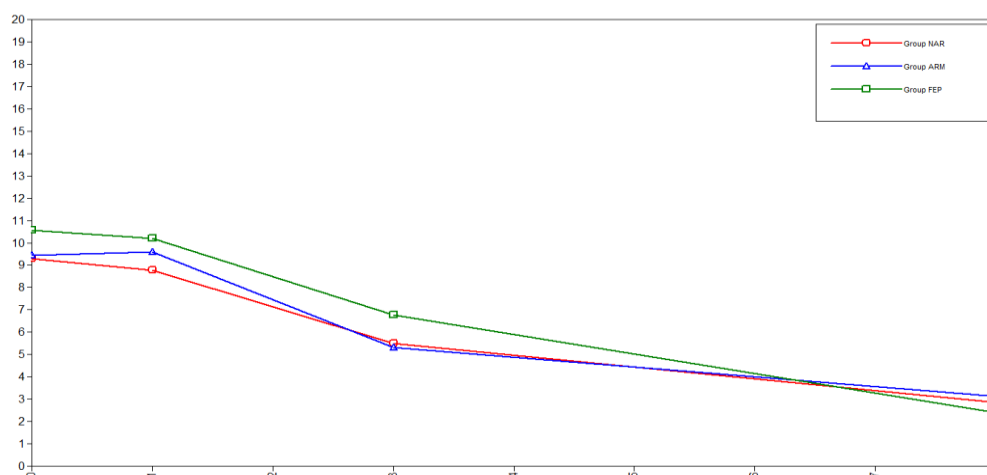


Figure 2.9 : courbes moyennes en fonction des classes diagnostiques (NAR = groupe de sujets non-à risque, ARM = groupe de sujets à risque ; FEP = groupe de sujets présentant un premier épisode psychotique)

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un Growth Mixture Modeling (GMM) pour identifier des classes latentes non précisées a priori, sans ajustement sur des facteurs confondants (en utilisant le logiciel Mplus). L'analyse des paramètres du modèle à partir de 159 profils de cortisol a permis de préciser qu'un modèle composé de 3 classes est meilleur qu'un modèle à 1 seule ou 2 classes.

Cette analyse permet donc de mettre en évidence 3 profils de cortisol au cours de la journée. Un profil retrouvé chez 89.8% des sujets (rouge) et qui correspond à un profil normal : décroissance du taux de cortisol au cours de la journée. Un profil retrouvé chez 5.8% des sujets (profil bleu) et qui se traduit par un pic de cortisol au cours de la matinée. Enfin, un 3^e profil avec 4.4% des sujets (profil vert) correspond à un pic de cortisol au cours de l'après-midi (figure 2.10).

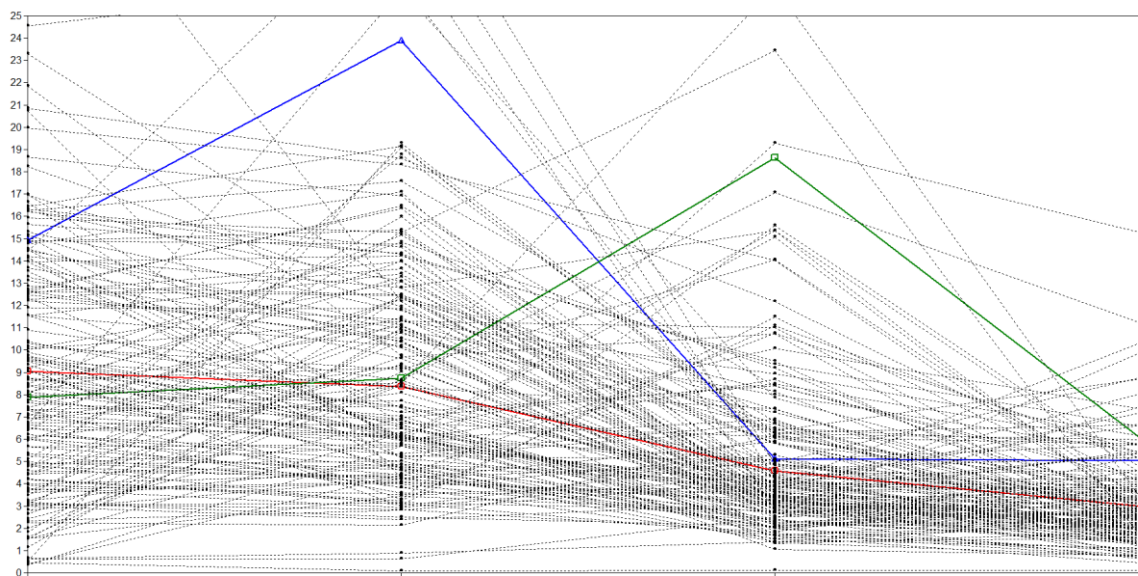


Figure 2.10 : représentation des 3 classes identifiées à partir des profils individuels

Ces deux derniers profils, minoritaires, pourraient traduire un décalage de phase car la sécrétion de cortisol est normalement maximale juste avant le lever. Ce facteur de confusion n'est pas pris en compte dans les études publiées jusqu'à présent dans notre domaine alors qu'il s'agit d'un facteur majeur de variation du taux de cortisol pris à un moment précis. De nombreux auteurs commencent même à abandonner la mesure du cortisol basal pour se tourner vers des mesures plus dynamiques ; l'utilisation d'équations structurelles pourrait permettre de préciser la dérégulation de la sécrétion de cortisol au cours de l'émergence de la psychose. Dans la cohorte ICAAR, les individus ne changeaient pas de classe au cours de la transition psychotique ce qui suggère que le profil cortisolique salivaire au cours d'une journée n'est pas lié à la physiopathologie de l'entrée dans la psychose.

Les modifications biologiques induites par le stress au cours de la transition psychotique pourraient s'exprimer autrement que par des modifications du cortisol périphérique. D'abord, le profil cérébral du cortisol n'est pas corrélé aux profils périphériques (sanguin ou salivaire). En outre, d'autres molécules pourraient intervenir. Le stress environnemental pourrait conduire à l'émergence de la psychose selon des mécanismes cellulaires ou moléculaires plus complexes notamment l'expression ou la modulation de récepteurs aux glucocorticoïdes (142). Le stress peut également induire des modifications épigénétiques. Les individus de la cohorte ICAAR ayant une analyse de leur niveau de cortisol ne se recoupent malheureusement pas avec la liste des individus présents sur la puce de méthylation. Cette analyse croisée reste à faire en complétant les analyses méthylomiques.

Discussion

En étudiant la méthylation de l'ADN qui est l'un des multiples mécanismes épigénétiques, nous avons identifié des régions du génome différentiellement méthylées chez les patients transiteurs comparativement aux patients non transiteurs. L'identification de ces modifications épigénétiques au cours de la transition psychotique représente la première étude dans ce domaine. Nous avons retenu que les modifications de la méthylation de l'ADN survenaient dans la région 1q21 et au sein de gènes appartenant à des voies biologiques connues pour intervenir dans la schizophrénie : voie des interleukines 17 et voie du guidage axonale. L'un de ces gènes, NRP1, présente également une modification de sa transcription lors de la transition. Des modifications de méthylation ont été trouvées et confirmées par une technique de pyroséquençage au niveau du promoteur du gène GSTM5 avec une hyperméthylation chez les patients transiteurs comparativement aux non-transiteurs. Ces modifications qui précèdent l'apparition de la transition psychotique laissent penser qu'une démarche prédictive est possible. Au cours de la transition, malgré le faible effectif de nos groupes, nous avons pu identifier des modifications longitudinales de méthylation au niveau de 2 gènes appartenant à la famille des GST : GSTT1 et GSTP1. Ces modifications sont inverses au niveau de ces 2 gènes : déméthylation pour GSTT1 et hyperméthylation pour GSTP1 au cours de la transition psychotique. Ces résultats suggèrent une régulation épigénétique des mécanismes impliquant le glutathion, possiblement par un mécanisme de balance entre plusieurs enzymes de la famille GST.

L'analyse transcriptomique a permis d'identifier d'autres dérégulations de l'expression des gènes. Ainsi, l'analyse par RNAseq retrouve des modifications de l'expression de gènes après la transition psychotique dont certains sont déjà dérégulés avant la transition. D'autres gènes sont spécifiquement dérégulés avant ou après la transition. Une analyse longitudinale a permis d'identifier la variation significative d'expression de l'ARN messager de HSPB7 au cours de la transition psychotique. HSPB7 code une protéine appartenant à la famille des heat-shock protéines (HSP) et plus particulièrement des petites HSP (poids moléculaire entre 20 et 30 kDa). Elles sont mises en jeu par des modifications physico-chimiques du milieu, par exemple des modifications thermiques ou des modifications redox. Malheureusement cette variation d'expression n'est pas répliquée dans l'ensemble de la cohorte ICAAR en raison de la trop faible fréquence d'expression de ce gène en périphérie. En revanche, la différence

d'expression de CPT1A au cours de la transition psychotique est répliquée. CPT1A est une enzyme permettant l'oxydation des acides gras. Ainsi, ces modifications de méthylation et d'expression convergent vers l'implication de molécules mises en jeu dans les capacités d'oxydo-réduction de l'organisme.

Ces modifications épigénétiques et transcriptomiques pourraient survenir selon 2 mécanismes. Le premier pourrait correspondre à une dérégulation globale des mécanismes contrôlant l'épigénome et la transcription, à l'instar de certaines maladies neurodéveloppementales qualifiées d'épigénopathies. Cette hypothèse semble peu probable dans la schizophrénie, qui semble davantage mettre en jeu des modifications épigénétiques ciblées que des modifications pangénomiques ou globales. En revanche, certains résultats montrent que le métabolisme du C1 qui permet la synthèse des radicaux méthyles essentiels à la méthylation de l'ADN génère des symptômes psychiatriques lorsqu'il est perturbé. Cependant ces mécanismes semblent davantage jouer comme des facteurs de risque transnosographiques voire des modulateurs que comme de réels déclencheurs de la transition psychotique. Il est probable que les modifications primaires de l'épigénétique puissent constituer des facteurs facilitant la révélation d'un terrain vulnérable en association avec d'autres facteurs.

Ces facteurs seraient volontiers environnementaux comme le suggèrent les études épidémiologiques. L'interaction gène x environnement est une hypothèse séduisante bien qu'encore trop peu explorée dans une démarche longitudinale. Cette interaction pourrait être médiée par l'épigénétique car il existe des preuves que les facteurs environnementaux peuvent venir déréguler les mécanismes épigénétiques. Certains facteurs environnementaux peuvent conduire à une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et modifier la sécrétion de cortisol. Nous avons établi que le cortisol basal salivaire était augmenté chez les individus à risque par rapport à des contrôles. Cependant, ce taux ne permet pas de prédire l'évolution de ces individus à risque et ne permet pas de conclure définitivement à l'implication du cortisol dans la physiopathologie de la transition psychotique, du fait de nombreux facteurs influençant cette mesure. Cette hypothèse reste cependant plausible et des protocoles plus élaborés comme l'étude de la réactivité au stress pourraient permettre de préciser l'effet du stress sur l'émergence de la pathologie. L'effet du stress pourrait également passer par d'autres mécanismes et en particulier le stress oxydatif.

Nos données biologiques semblent donc converger vers l'implication du stress oxydatif. Le stress oxydatif correspond aux effets de molécules produisant des radicaux libres et jouant un rôle délétère vis-à-vis des molécules et des cellules. Parmi ces molécules on trouve les

« espèces réactives de l'oxygène » (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les composés contenant le radical hydroxyle HO^\bullet ou le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Le monoxyde d'azote NO^\bullet fait partie des « espèces réactives oxygénées et azotées » (RONS) et joue également un rôle dans la neurotransmission et la neurogénèse.

A bien des égards les entités psychiatriques peuvent être considérées comme des maladies neuroprogressives (48). La schizophrénie, considérée autrefois comme une démence précoce, semble effectivement mettre en jeu des mécanismes de mort cellulaire. Le stress oxydatif peut entraîner des dommages cérébraux et notamment une mort neuronale. Son implication dans la transition psychotique pourrait rendre compte des résultats d'imagerie révélant une perte de substance lors de l'entrée dans la maladie. Les études d'imagerie ont montré une réduction du volume de plusieurs zones cérébrales et en particulier au niveau de la substance grise corticale chez les individus souffrant de symptômes psychotiques (165). Cette réduction du volume cortical semble apparaître progressivement au cours de l'évolution de la maladie (166) mais ne serait pas liée à l'instauration d'un traitement antipsychotique (165). Les patients présentent également un déclin cognitif progressif durant les premières années de la maladie (167) suggérant des mécanismes neurodégénératifs transitoires au cours de la transition psychotique.

Cette neuroprogression pourrait être liée à une mort neuronale sous l'effet de mécanismes neurotoxiques. Ces mécanismes surviendraient en cas de déséquilibre du stress oxydatif et notamment lors de l'hypersecrétion de certains neurotransmetteurs comme la dopamine et le glutamate. L'augmentation de la sécrétion dopaminergique est une source importante de stress oxydatif notamment en raison du potentiel redox de la dopamine (168). La dopamine est dégradée par la monoamine oxydase ce qui produit de l'acide dihydroxyphenylacétique et du H_2O_2 . Une autre voie de dégradation non-enzymatique revient à une hydroxylation en présence de fer ferreux et de H_2O_2 en 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (169). Ce composé 6-OHDA induit une inhibition du complexe I mitochondrial. Il est instable et se convertit en p-quinone qui active la voie apoptotique des caspase-8. L'hypersecrétion glutamatergique s'accompagne d'une excitotoxicité (170) qui conduirait à une altération de la balance redox. Ce mécanisme survient lors de la stimulation des récepteurs NMDA par le glutamate et conduit à un influx calcique à l'origine de la production de ROS. Le NO est synthétisé par la NO synthase à partir de l'arginine après activation des récepteurs NMDA. Ainsi, la production de radicaux libres survient à cause du métabolisme normal, et notamment le métabolisme des neurotransmetteurs, mais également suite à l'exposition à certains facteurs environnementaux. La figure 3.1 résume ces mécanismes conduisant à la production de ROS.

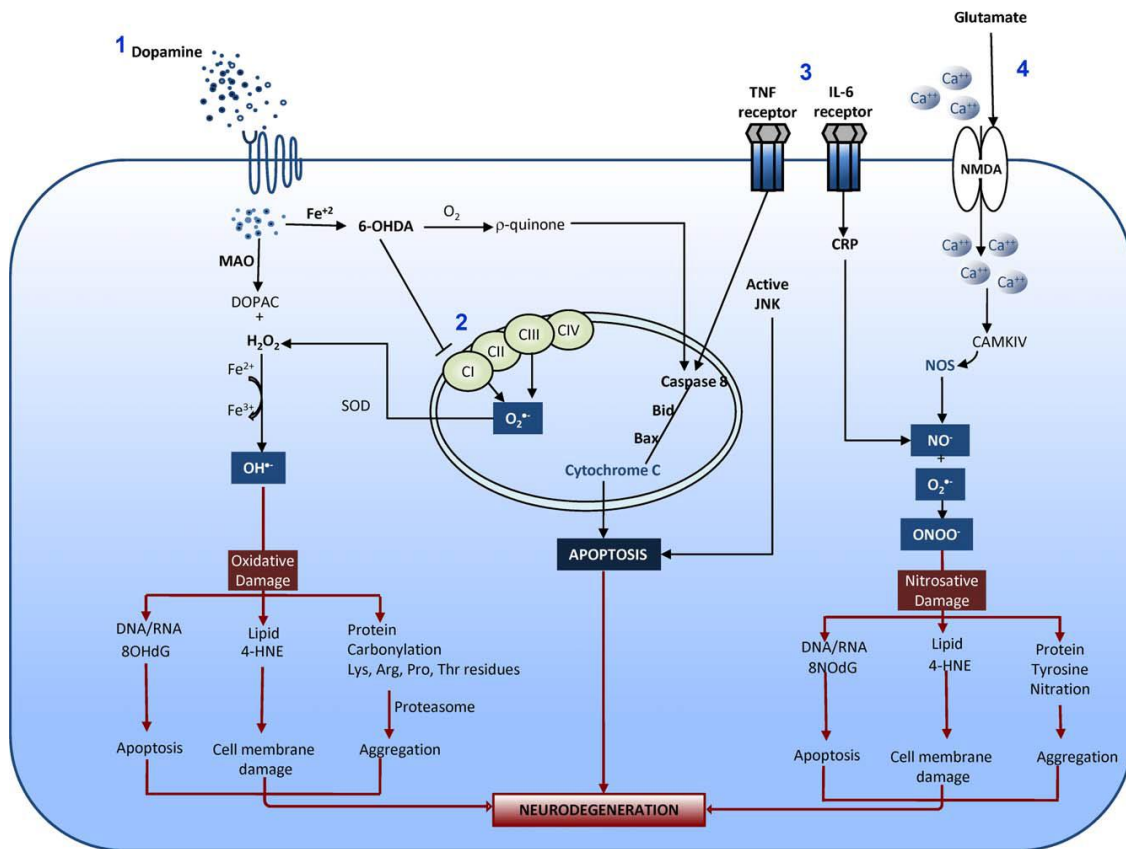


Figure 3.1 extraite de Berk et al 2011 (169) schématisant la production de ROS à partir de glutamate et de dopamine.

La présence de radicaux libres conduit à une mort cellulaire et représente donc une agression pour l'organisme, particulièrement pour le système cérébral qui se régénère très faiblement. Les défenses antioxydantes sont donc essentielles pour éviter la neurodégénérescence. Ce système antioxydant regroupe plusieurs composants dont le niveau de production est important pour l'homéostasie et la prévention des dommages moléculaires et cellulaires liés aux radicaux libres (figure 3.2).

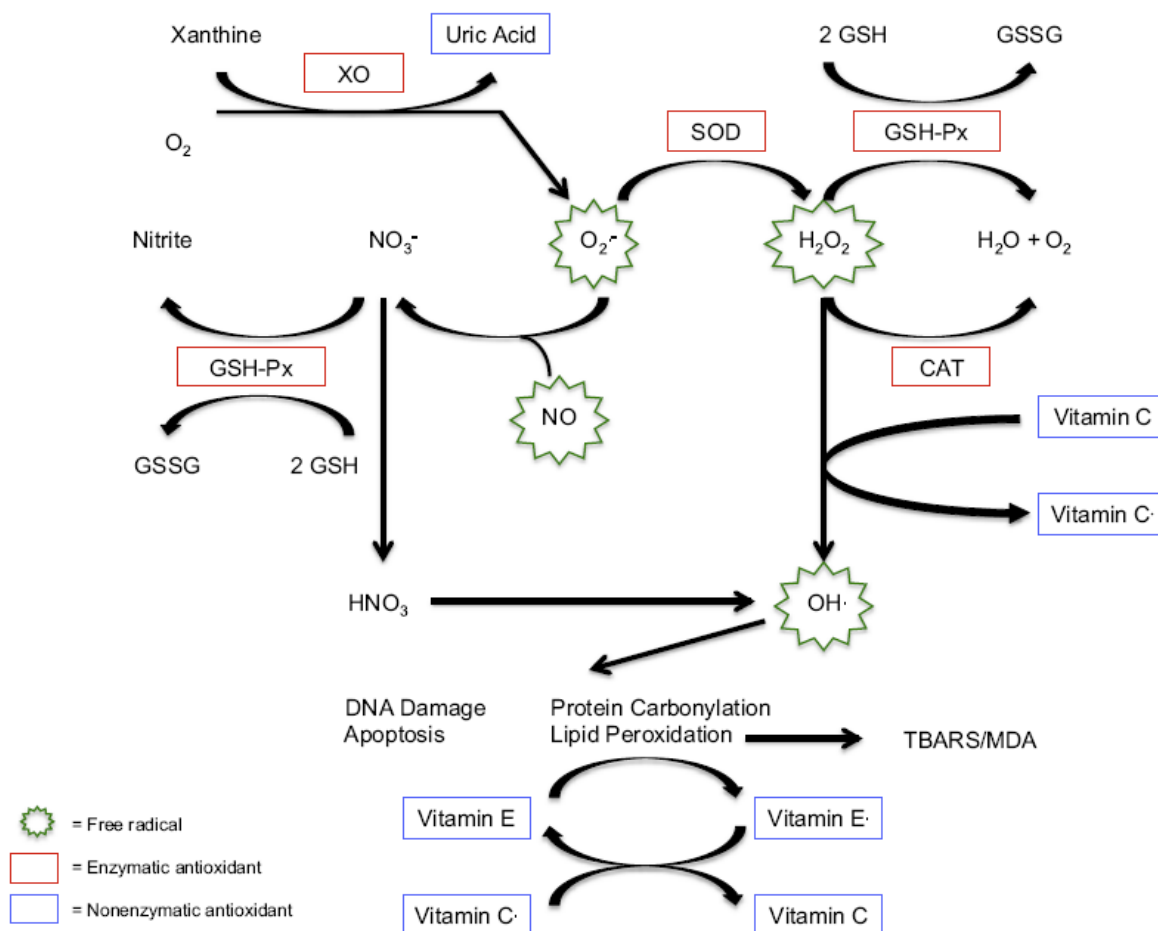


Figure 3.2 extraite de Flatow et al (171) montrant les voies biologiques impliquées dans la régulation redox. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. La catalase (CAT) permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. L'acide urique synthétisé par la xanthine oxydase (XO) correspond au produit dégradé de la xanthine et reflète donc les capacités d'oxydation des bases puriques. La xanthine oxydase permet également de convertir les nitrites en NO. La glutathion peroxydase (GSH-Px) permet de neutraliser les peroxydes organiques en transformant le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GS). Les glutathion-peroxydases permettent également de transformer H_2O_2 en H_2O tout en oxydant le glutathion.

Parmi les composants du système anti-oxydant, le glutathion est essentiel pour la protection cérébrale (172). Le glutathion est synthétisé à partir du glutamate et une anomalie dans la sécrétion/production de glutamate peut avoir un effet sur la synthèse de cet anti-oxydant. Son métabolisme repose sur le cycle gamma-glutamyl et sur le métabolisme C1 (chapitre 1 – figure 1.29). Une diminution de la synthèse du glutathion conduit à une aggravation des

dommages liés aux ROS. Plusieurs enzymes sont impliquées pour la synthèse du glutathion (figure 3.3) notamment la Glutamate-cystéine ligase (GCL) qui comporte 2 sous-unités GCLC (sous-unité catalytique) et GCLM (sous-unité modificatrice) dont des polymorphismes ont été associés à la schizophrénie. La GCL catalyse la première étape limitante de la production de glutathion. Le glutathion pourra ensuite se conjuguer avec différents composés pour former un produit stable non toxique. Les GST sont des enzymes permettent la déoxydation de différents composés moléculaires dont des xénobiotiques en utilisant le glutathion comme cofacteur. Il existe une vingtaine de membres dans cette famille ainsi que de nombreuses isoformes. Certains polymorphismes ont également été associés à la schizophrénie.

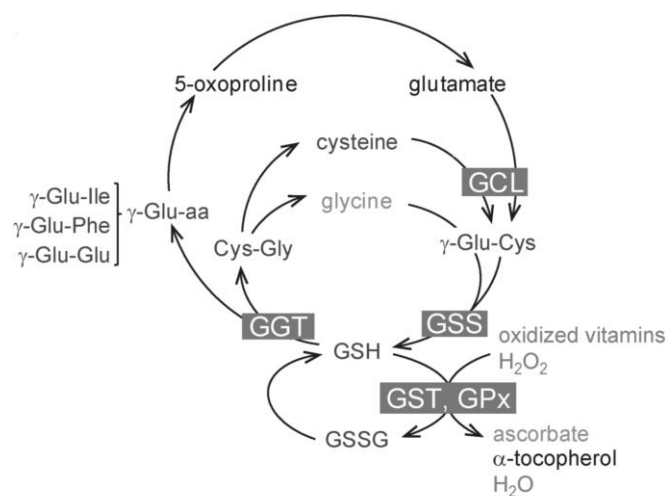


Figure 3.3 extraite de Fournier et al (173) montrant les voies biologiques et les enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion.

Le système redox est étudié dans de nombreuses pathologies humaines comme les pathologies neurodégénératives ou le vieillissement. Les données concernant le métabolisme redox dans la schizophrénie sont multiples et encore disparates (174). Dans la psychose, le stress oxydatif est augmenté avec une production accrue de radicaux hydroxyle HO• et superoxyde O₂•- qui provoquent des dommages cellulaires. Ce stress oxydatif est particulièrement accru lors de mécanismes inflammatoires et des étapes de développement cérébral. La ketamine (175) et la phencyclidine (PCP) (176) qui sont utilisés pour construire des modèles animaux de psychose augmentent les ROS de même que les facteurs environnementaux impliqués dans les maladies psychiatriques. Il existe des modèles animaux montrant que le stress psychosocial génère des ROS (177). Les traitements psychotropes et le tabagisme peuvent modifier le système redox de manière non univoque. Le stress oxydatif met

également en jeu des mécanismes inflammatoires qui sont en eux mêmes souvent décrits dans la schizophrénie. Les cytokines pro-inflammatoires et en particulier IL6 et TNF-alpha concourent également à la production de ROS. Le stress oxydatif pourrait être un « hub » central auquel aboutiraient plusieurs mécanismes pathologiques (figure 3.4).

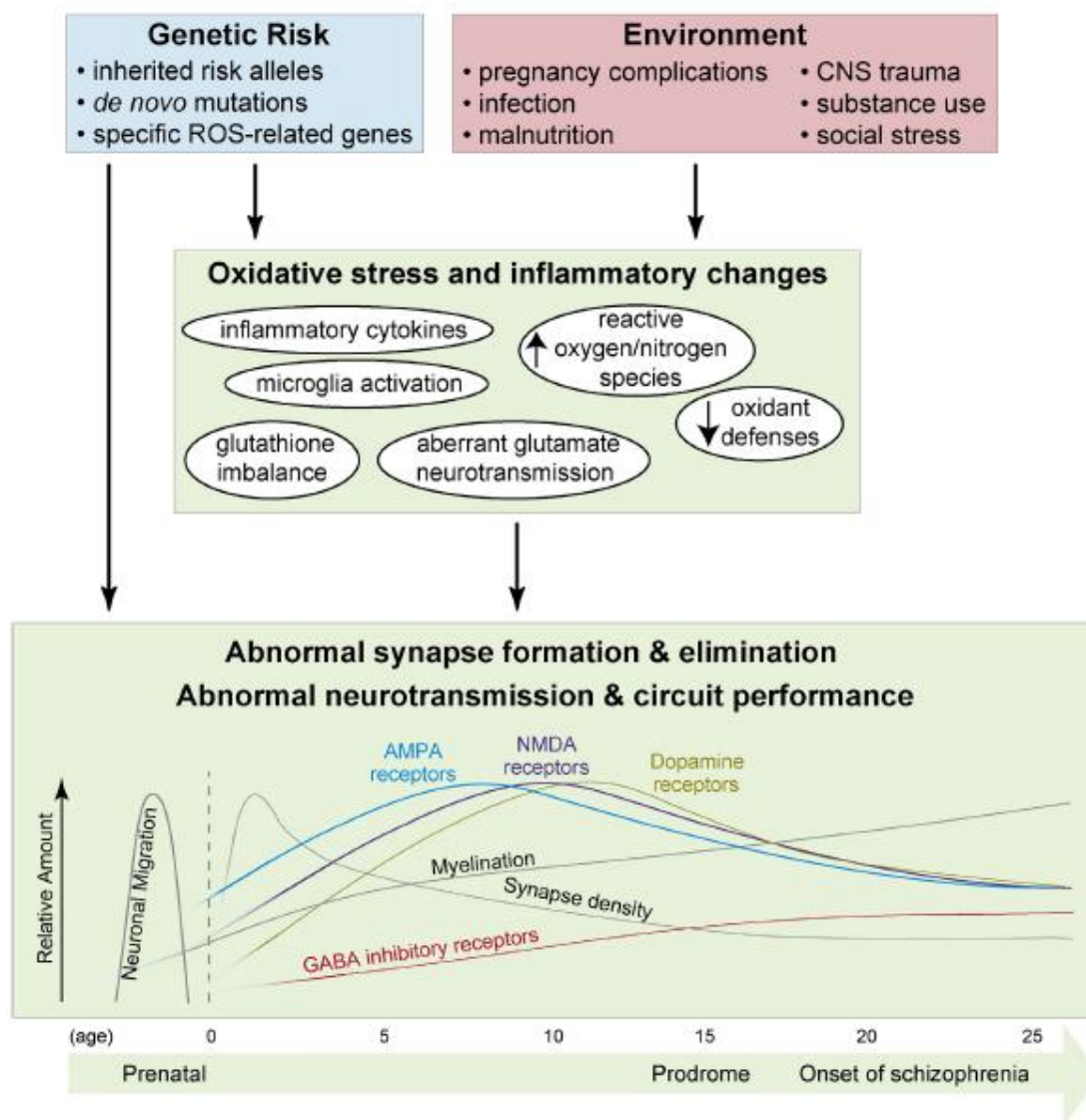


Figure 3.4 extraite de Koga et al 2015 (174) schématisant l'impact du stress oxydatif sur la maturation cérébrale à différents âges de la vie et selon l'évolution de la maladie

Le niveau de glutathion a été montré comme diminué dans la schizophrénie (178). Une méta-analyse a permis de compiler les résultats de plusieurs études à différentes étapes de la maladie. Les résultats montrent des différences entre les différents groupes de patients pris à des étapes différentes de la maladie. La diminution du taux de superoxyde dismutase pourrait

être un marqueur trait alors que la diminution du taux de glutathion peroxydase pourrait refléter l'aggravation de la maladie.

III.1 Limites méthodologiques

Les résultats obtenus dans cette thèse pourraient résulter au moins partiellement de biais, notamment des modifications thérapeutiques (introduction ou arrêt d'un traitement) ou de la consommation de toxiques (consommation ou arrêt d'une drogue) au cours de l'évolution de la maladie. Deux techniques peuvent être utilisées pour dépasser ces biais : l'ajustement et la comparaison des résultats. Les analyses ont été ajustées sur des biais connus (sexe, âge) et inconnus (par « surrogate variable analysis »). Dans le cas du méthylome, les résultats fournis par l'analyse des changements induits par le cannabis ne recoupent pas ceux obtenus après analyse de la transition. Il est donc peu probable que les résultats des modifications de méthylation au cours de la transition soient explicables par des modifications de la consommation de cannabis. Les meilleurs résultats de méthylation n'étaient pas non plus associés à l'instauration ou à l'arrêt d'un traitement. Il reste difficile de contrôler l'ensemble des biais d'autant que certains facteurs modifiant la méthylation sont probablement encore inconnus. Cependant, on peut arguer qu'il est inutile d'établir la liste complète des biais environnementaux modifiant le méthylome, à condition de se focaliser sur la signature d'un processus biologique.

L'étude par CpG isolée n'a pas permis d'obtenir de résultats significatifs après correction pour des tests multiples. Les faibles variations de méthylation au cours du temps pour chacune de ces CpG expliquent sans doute le manque de puissance. Il était difficile de calculer la puissance a priori puisqu'il s'agit d'une première étude dans le domaine. D'autres limites sont plus complexes à aborder. L'hétérogénéité de ces variations entre les sujets est une autre explication plausible. D'abord, nous n'avons pas conduit d'analyse de la méthylation de l'ADN pour chaque individu. L'hétérogénéité inter-individuelle des phénotypes cliniques et des causes génétiques est un phénomène très connu dans le champ des maladies psychiatriques, y compris en ce qui concerne les états mentaux à risque. Cette hétérogénéité phénotypique et génotypique trouve indubitablement une expression au niveau de la méthylation de l'ADN. Au cours du temps, certains transiteurs ont pour certains gènes une modification de leur méthylation qui se rapproche de celle des non-transiteurs. Ce résultat suggère que les voies

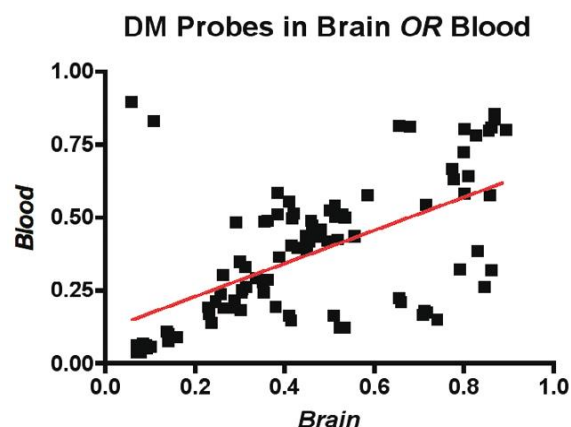
biologiques menant à la psychose pourraient être variées voire même individuelles. Nos résultats sont liés à des ressemblances au sein de groupes catégoriels distincts. Nous n'avons pas non plus conduit d'analyse dimensionnelle ni recherché de variations individuelles de type épimutations privées. De plus, les sujets étaient prélevés à des moments différents de leur trajectoire vers la psychose ce qui a pu diminuer la significativité de certains résultats.

De plus, les approches omiques présentent en elle-mêmes des risques qu'il faut connaître. Les résultats obtenus peuvent correspondre à une construction statistique en lien avec un surajustement (overfitting) comme l'indique le calcul de l'EPV (events per predictor variable) :

$$EPV = \frac{\text{nombre d'événements dans l'analyse exploratoire}}{\text{nombre de prédicteurs dans le modèle}}$$

$$\text{Soit pour une puce Meth450K et une centaine d'individus : } EPV = \frac{100}{450\,000} < 10$$

Une autre limite correspond à l'étude périphérique du méthylome et du transcriptome dans le cas de l'émergence d'une pathologie psychiatrique. La spécificité tissulaire de l'épigénétique et de l'expression des gènes est une limite évidente de cette étude. L'approche périphérique est cependant inévitable dans une étude longitudinale. De manière rassurante, une corrélation significative existe entre la méthylation de l'ADN leucocytaire et la méthylation cérébrale (figure 3.5).



Linear regression $r^2=0.3458$ $p<0.0001$
Spearman $r=0.6068$ $p<0.0001$

Figure 3.5 extraite de Masliah et al 2013 (179) montrant la corrélation significative entre méthylation dans le sang et dans le cerveau

Des auteurs ont comparé systématiquement les données dans le sang et dans le cerveau et recommandent, dans le cas d'études périphériques, de mener des études longitudinales pour effectuer des comparaisons intra-sujets qui pourraient s'avérer plus pertinentes que des comparaisons inter-sujets (180). Cette recommandation correspond à notre paradigme. Il faut noter que les différences de méthylation de l'ADN observées dans le sang pourraient être d'intensité plus faible que les différences observées dans le cerveau (181). La méthylation de l'ADN périphérique pourrait être le reflet en miroir de la méthylation cérébrale. En outre, la méthylation périphérique pourrait être un marqueur d'exposition à des facteurs environnementaux et représenter une cicatrice de changements épigénétiques. En ce sens, son exploration dans le cadre de maladies psychiatriques est pertinente. L'utilisation de biomarqueurs périphériques, proches de la physiopathologie sans être directement impliqués dans la maladie, pourrait faciliter le transfert vers la pratique médicale courante, même si cette approche ne permet pas d'explorer dans toute leur complexité les modifications régionales intracérébrales.

Nos explorations réalisées sont nécessairement limitées au regard de nos connaissances actuelles. D'autres mécanismes épigénétiques mériteraient d'être plus largement investigués notamment les miARN. Les gènes dérégulés à M0 sont « surreprésentés » parmi les cibles de MIR-489 ($p=0.004943$). Cette surreprésentation concerne 2 gènes ADAMTS5 et HUNK. Hormis ce résultat, les anomalies épigénétiques retrouvées ne semblent pas gouvernées par des miARN particuliers et il n'y a rien permettant d'affirmer que la transition psychotique serait liée à la dérégulation d'un ensemble de miARN. Cet argument indirect suggère que la transition psychotique ne serait pas directement liée à des anomalies primaires des miARN mais cette hypothèse doit être directement testée pour pouvoir conclure. A partir des données d'expression obtenues par Q-PCR dans la cohorte ICAAR, nous avons recherché des différences d'expression pour un miARN particulier : miR137. Le miR137 est un miARN intéressant car certains de ses polymorphismes ont été associés à la schizophrénie et la dérégulation de son expression dans les neurones aurait un impact fonctionnel (182). Nous n'avons pas pu démontrer de différence d'expression entre les UHR, NUHR et FEP ($p=0.54$) ni entre les UHR-P et UHR-NP ($p=0.81$). Il conviendrait de conduire une étude mesurant les variations de l'ensemble des miARN (miRnome) pour conclure définitivement.

Les mécanismes épigénétiques sont régulés par les variants génétiques. La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones ont des régulations communes (chapitre 1). Il est probable que l'accumulation de variants dans les enzymes permettant la

régulation épigénétique de l'organisme puisse moduler l'apparition de la maladie. Les analyses épistatistiques pourraient se révéler très intéressantes pour ces gènes.

L'approche RNAseq dans notre cohorte nous a permis de tester si la transition psychotique s'accompagnait d'anomalies de l'épissage. Globalement, les sujets transiteurs n'ont pas de variation dans le taux des différentes isoformes comparativement à des sujets contrôles. Le logiciel Cufflinks n'a pas permis d'identifier des différences d'expression en terme d'isoformes connues ou inconnues entre les 2 groupes ni de détecter des promoteurs alternatifs. Il pourrait s'agir d'un manque de puissance car une étude (133) a retrouvé des promoteurs alternatifs dans la schizophrénie. A ce stade, rien ne permet d'affirmer que des anomalies concernant le mécanisme d'épissage sont impliquées dans la transition psychotique. En revanche, nous avons pu détecter des transcrits de fusion inconnus chez certains patients. La réalité biologique de ces chimères et leur pathogénicité ne sont pas démontrés. Ces transcrits de fusion ne semblent pas expliqués par la présence de CNV.

III.2 Les perspectives de recherche

Les travaux présentés dans cette thèse doivent être vus comme un point de départ des explorations biologiques de la transition psychotique. Nous proposons de poursuivre les recherches selon deux axes principaux : l'étude directe du stress oxydatif au cours de ce processus et le développement de nouvelles méthodes d'analyse, davantage intégratives pour faire émerger de nouveaux résultats. En particulier, ces analyses devraient permettre d'identifier des marqueurs prédictifs de la transition psychotique.

III.2.A Exploration du stress oxydatif chez les patients à risque

Le stress oxydatif pourrait jouer un rôle important dans les premières phases de la psychose (figure 5.7). Cet effet prépondérant dans l'émergence de la maladie pourrait plausiblement s'expliquer par l'implication du système redox dans des mécanismes essentiels pour la maturation cérébrale à l'adolescence notamment l'élagage synaptique.

Il existe cependant peu de données dans la littérature concernant les anomalies redox chez les patients à risque. Une étude américaine identifie deux composants du métabolisme redox comme prédicteur de la transition psychotique : la malondialdehyde-modified low-

density lipoprotein (lipoprotéine dégradée par les radicaux libres) et l'élévation de l'apolipoprotéine D chez les transiteurs comparativement aux non-transiteurs. Une étude menée à Melbourne a identifié l'acide nervonique (acide gras oméga-9 mono insaturé) (183), le glutathion et la SOD comme de bons prédicteurs de la transition psychotique (184) lorsqu'on les associe à des données cliniques. Cette même équipe a réalisé une étude montrant que les oméga-3 sont impliqués dans la réduction du stress oxydatif chez les sujets UHR mais l'étude ne comportait pas de groupe contrôle permettant d'analyser spécifiquement leur effet (185). Les résultats sont donc encore très limités dans les stades précoces de la maladie. De plus, l'impact fonctionnel de cet excès d'oxydants est mal compris chez ces sujets UHR. Les ROS ne semblent pas affecter les acides nucléiques à ce stade (186), comme c'est pourtant généralement le cas en pathologie humaine et dans la schizophrénie en particulier (187). L'effet de ces composés toxiques pourrait être davantage lié à des mécanismes synaptiques ou à la maturation cérébrale.

Il semble qu'il existe des marqueurs constants à travers les étapes de la maladie et d'autres apparaissant de manière élective lors de certaines phases. Ce résultat suggère que l'émergence de la maladie pourrait être liée à des mécanismes apparaissant électivement lors d'un stade clinique et non à un processus s'aggravant progressivement au cours de l'évolution des états mentaux à risque. Ceci plaide pour une prise en charge spécifique du stade de la maladie par des thérapeutiques adaptées. En cas de confirmation, cette hypothèse remettrait en cause le clinical staging model qui suppose une aggravation progressive des biomarqueurs.

III.2.B Nouvelles méthodes d'analyse

Nos analyses ont porté sur l'étude de la méthylation et de la transcription à une échelle pangénomique. Les études whole-genome sont aujourd'hui de plus en plus développées. L'enjeu actuel de la recherche est d'analyser efficacement et de manière reproductible les données ainsi générées. La science est entrée dans l'ère des « big data ». Pour qualifier ces jeux extensifs de données, l'application du suffixe "omique" est couramment utilisé. Ainsi, on définit la génomique, la méthylomique, la transcriptomique, la protéomique et même la phéno-mique. Les analyses proposées dans cette thèse représentent un nouveau paradigme scientifique. Longtemps basée sur des hypothèses a priori, la biologie évolue aujourd'hui vers des analyses

sans hypothèses (non-hypothesis driven) où les résultats émergent de l'analyse de ces larges jeux de données. Ce type d'analyse est probablement pertinent pour identifier les éléments les plus saillants face à un phénomène largement incompris. Les données biologiques concernant la transition psychotique étant encore peu explorées et les mécanismes étant encore mal connus, les approches exploratoires du type « omique » ont été privilégiées dans notre approche.

Les données biologiques sont de plus en plus massives (> 600 giga-octets de données dans le cadre de notre étude RNAseq portant sur 30 échantillons) et ne peuvent pas être explorées manuellement. Cette tâche nécessite l'utilisation de l'informatique pour faire émerger des résultats à partir de ces big data. La bio-informatique des réseaux s'intéresse aux interactions entre composants moléculaires pour expliquer un système biologique : c'est le domaine d'analyse des données "omiques" à haut débit. Le champ de la bio-informatique regroupe la bio-info-analyse, parfois qualifiée de biologie in silico et faisant référence à des concepts spécifiques. Ainsi, le concept d'algorithme renvoie à une suite finie et non ambiguë d'opérations ou d'instructions permettant de résoudre un problème ou d'obtenir un résultat. Les résultats présentés dans les chapitres précédents ont été obtenus par des algorithmes le plus souvent implémentés dans des logiciels comme R ou des lignes de commande DOS ou Unix. L'implémentation correspond à la traduction de l'algorithme dans un langage de programmation dont l'écriture est appelée script. Dans certains cas (cluster de méthylation, statistiques sous SPSS), nous avons fait appel à des logiciels exécutant un ensemble d'instructions définies préalablement par le développeur pour une tâche spécifique.

Le développement de logiciels et d'algorithmes est une part importante et déterminante pour assurer l'analyse des données biologiques à haut-débit et repose sur des bio-mathématiciens et bio-informaticiens. Ce travail est spécialisé et nécessite des échanges avec les chercheurs qui analyseront les données. En effet, les programmes ne doivent pas uniquement donner des résultats valables du point de vue mathématique ou statistique mais également fournir des résultats interprétables et plausibles sur le plan biologique, ce qui nécessite souvent un ajustement empirique des paramètres. La complexité des analyses « omiques » nécessite souvent l'utilisation successive de plusieurs programmes ou algorithmes et cette succession est appelée « pipeline » ou chaîne d'analyse. Ainsi, lors de l'analyse transcriptomique, nous avons utilisé un pipeline associant Bowtie - Tophat - Cufflink - Cuffmerge - Cuffdiff à partir de notre jeu de données de RNAseq.

Les algorithmes et les programmes pour traiter ces données sont en perpétuelle évolution. Le développement de nouveaux programmes peut permettre d'identifier de manière plus fiable de vrais positifs parmi les résultats biologiques. Cependant le taux de faux positifs

reste vraisemblablement encore élevé. Pour y remédier, l'utilisation de plusieurs algorithmes bio-informatiques et le recoupement des résultats ainsi obtenus pourraient améliorer la reproductibilité des résultats. En effet, une différence d'expression génique sera certainement plus fiable si elle est détectée par plusieurs techniques utilisées en parallèle comme étudié au chapitre II.3 (Poster WCPG en **annexe**). L'évaluation de nos outils bio-informatique est nécessaire mais encore trop peu développée pour l'instant. Des articles ont permis d'évaluer les techniques de détection des différences d'expression en les comparant entre elles (188) mais les comparaisons vis-à-vis de gold standard sont souvent inexistantes. Une évaluation de ces chaînes d'analyses doit être menée par exemple pour classer les résultats selon leur fiabilité.

De plus en plus de revues demandent le partage des données ayant permis de rédiger l'article initial, en les mettant à disposition au sein d'entrepôts de données. Des plateformes permettent l'échange gratuit des données au sein de la communauté scientifique. Ce phénomène permet une multiplication des échanges collaboratifs entre chercheurs qui peuvent désormais comparer leurs résultats aux données d'autres équipes. Cependant, il n'existe pour l'instant aucun moyen de vérifier la qualité des données ainsi partagées (critères diagnostiques, qualité du prélèvement...). En outre, et pour certains champs de recherche très précis comme celui de la transition psychotique, aucun jeu de données n'est disponible à ce jour pour comparer les résultats obtenus dans nos travaux.

Une autre façon de vérifier la pertinence des résultats obtenus est de croiser les données de plusieurs modalités différentes (figure 3.6). Par exemple, les variations de méthylation de l'ADN doivent se traduire par une modification de la transcription puis par une modification du taux de la protéine correspondante. Ainsi, chez un même individu, les données de méthylomique, transcriptomique et protéomique peuvent être analysées pour vérifier si nous sommes devant des phénomènes biologiquement valides. Une augmentation de la méthylation du promoteur d'un gène se traduit habituellement par une réduction de l'expression de l'ARNm correspondant et donc du niveau de la protéine circulante. C'est ainsi que nous avons pu valider l'implication du gène NR1, retrouvé hyperméthylé dans notre analyse méthylomique et hypoexprimé dans notre analyse transcriptomique. A l'inverse, les discordances peuvent permettre d'identifier des faux résultats, à moins qu'elles ne reflètent d'autres régulations non disponibles dans le jeu de donnée.

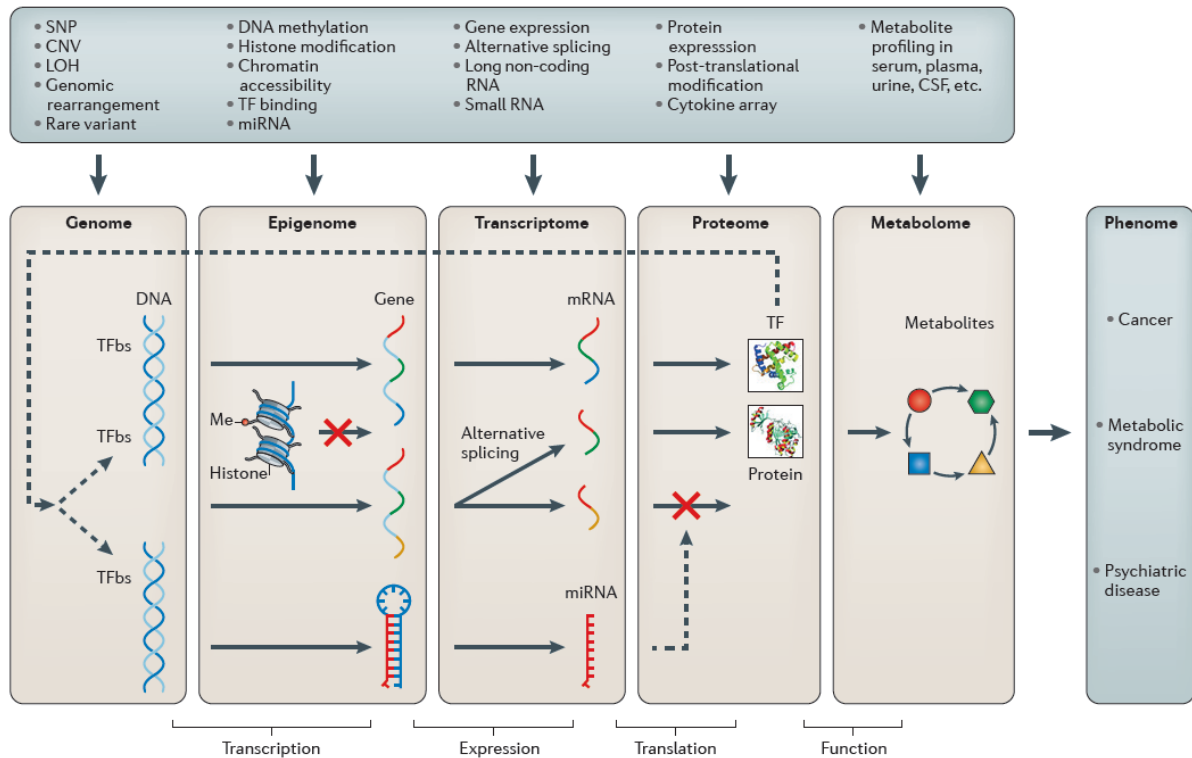


Figure 3.7 extraite de Ritchie et al (189) montrant l'enchaînement des différents niveaux moléculaires pouvant être actuellement étudiés.

Cette première approche pourrait être qualifiée d'analyse par concordance. Elle est simple à réaliser dès lors que les résultats obtenus en parallèle pour chaque jeu de données ne sont pas trop étendus. En revanche, cette approche ne permet pas de faire émerger de nouveaux résultats à partir de l'ensemble des sets de données. Pour résoudre cette question, il faut développer des analyses que l'on propose d'appeler analyses par combinaison. Ces techniques d'analyse de plusieurs sets de données sont balbutiantes. Elles sont réalisées selon des analyses basées sur des approches « pas à pas » ou hiérarchiques (analyses séquentielles) ou selon des analyses « meta-dimensionnelles » c'est-à-dire des approches intégrant différents types de données pour construire un modèle multivarié (analyses simultanées) (189).

De manière séquentielle, les résultats d'un jeu de données servent de point d'ancrage pour réaliser les analyses d'un second jeu de données et ainsi de suite, avec des boucles de rétroanalyse éventuellement. Parmi les analyses combinatoires récemment développées dans le domaine psychiatrique, les plus connues sont l'analyse d'eQTL (expression quantitative trait loci) (190). L'abondance d'un transcrite (trait quantitatif) peut être associée à un polymorphisme dans des gènes de régulation. La détermination de ces loci régulateurs peut-être identifiée par combinaison des données génomiques et transcriptomiques. De manière similaire, on identifie

des mQTL (methylation quantitative trait loci) c'est-à-dire des SNP qui détermine le niveau de méthylation d'autres régions du génome. Ainsi, les niveaux de méthylation de groupes de CpG peuvent être déterminés génétiquement et comparés aux SNP identifiés par GWAS (191,192). Des modèles plus complexes ont pu permettre d'obtenir des résultats intéressants en psychiatrie. La figure 3.8 montre un exemple où des étapes successives ont permis de réduire le nombre de gènes candidats.

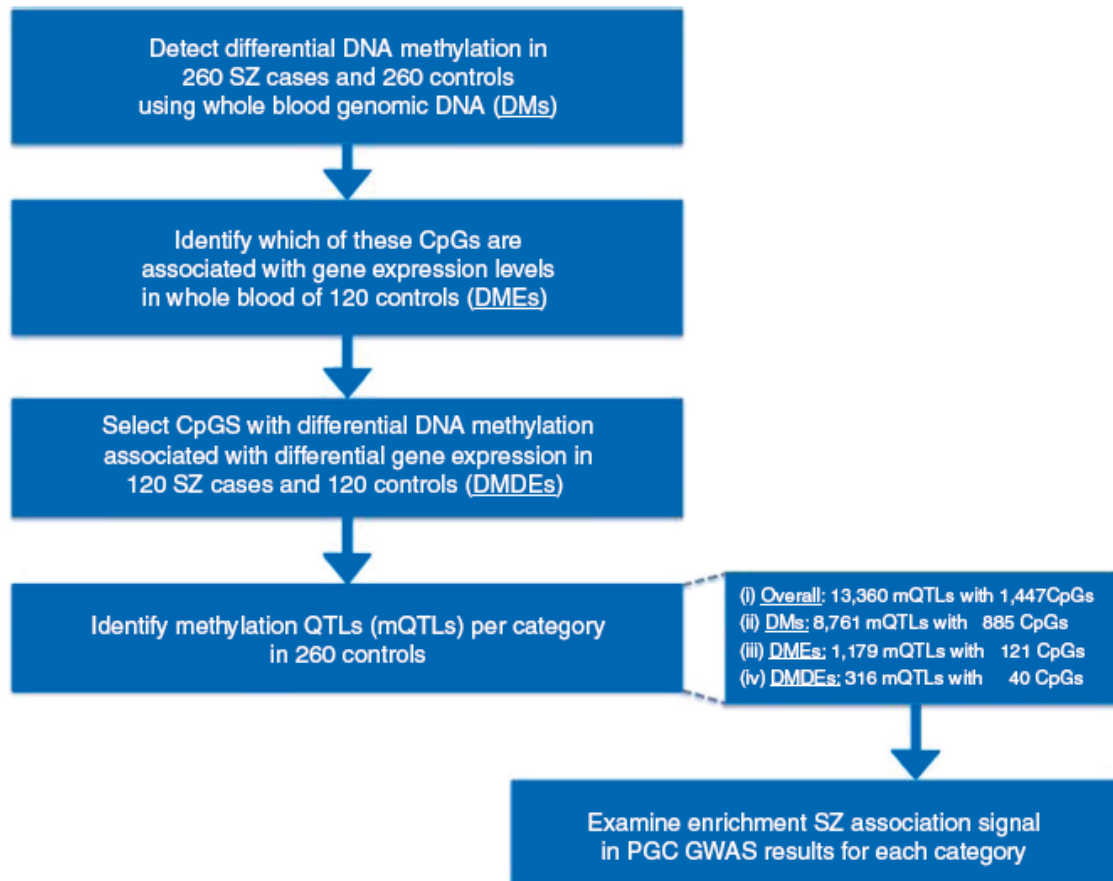


Figure 3.8 extraite de Van Eijk et al 2015 (193) montrant le déroulement d'une analyse séquentielle : les loci finalement identifiés correspondent aux loci régulant la méthylation des DMR qui conduisent à des modifications de l'expression génique.

De manière simultanée, les procédures actuelles permettent de réaliser des graphs afin de visualiser les différents jeux de données. Cette technique de représentation de données hétérogènes est très efficace pour l'aide à la génération d'hypothèses, qui pourront être ensuite spécifiquement testées par des approches plus classiques (figure 3.9).

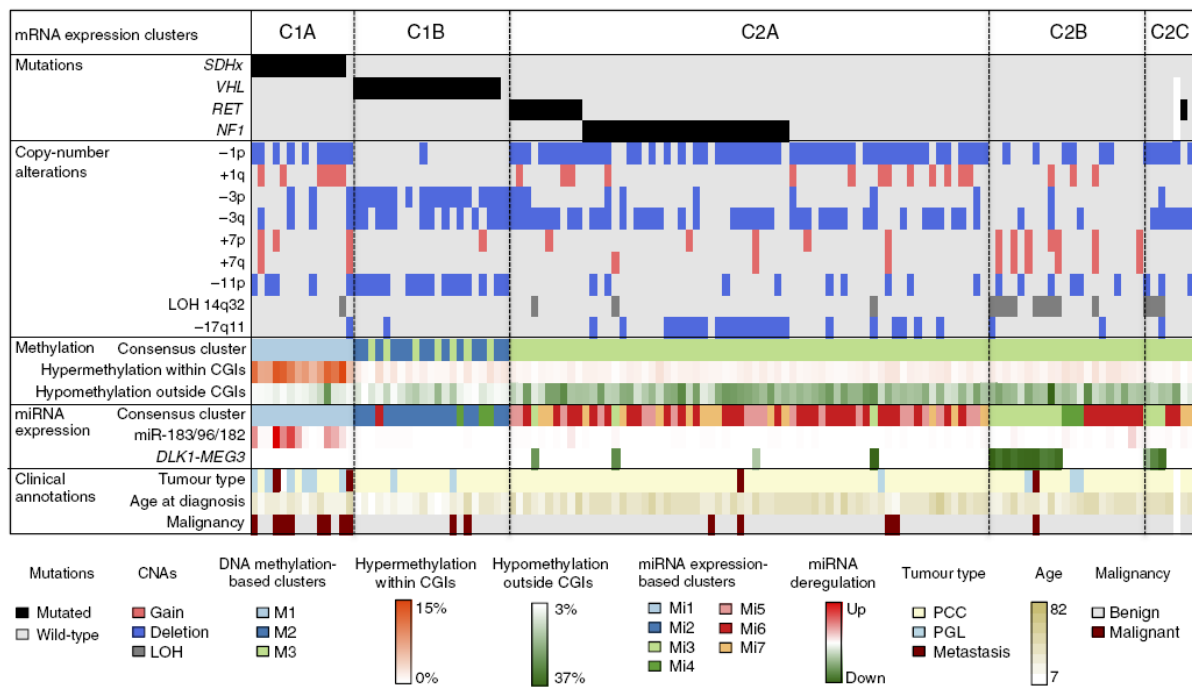


Figure 3.9 extraite de Castro-Vega LJ et al. 2015 (194) représentant graphiquement des données hétérogènes obtenues chez des patients atteints de formes génétiques de paragangliomes.

Nos analyses mériteraient d'être complétées par des analyses fonctionnelles. Nous avons pu vérifier à la fois que la méthylation de *NRP1* et que son expression était altérée au cours de la transition psychotique ce qui en fait un candidat répliqué et donc un très probable vrai positif. Ainsi, la modulation de la transcription est un premier argument démontrant que des changements de méthylation peuvent avoir un effet fonctionnel sur l'expression des gènes ; la combinaison avec des données de protéomique permettrait une double validation fonctionnelle. Bien que les analyses « omiques » (génomiques, méthylomiques, transcriptomiques et protéomiques) et des approches par concordance aient été effectuées sur la même cohorte, en revanche, aucune approche combinant ces données (approche multi-omique) n'a pour l'instant été réalisée. Les résultats préliminaires des analyses mono-modales montrent des résultats significatifs pour cette cohorte qui remplit donc les conditions statistiques de validité. L'enjeu est désormais de compléter les résultats de cette cohorte et de les faire davantage reposer sur une base fonctionnelle. Cette approche innovante permettrait de valider les résultats et d'ouvrir la porte à de nouvelles analyses intégratives.

Les modèles animaux sont souvent indispensables pour établir le lien physiopathologique entre les résultats obtenus chez l'homme et les mécanismes d'apparition de la maladie. Les modèles animaux de schizophrénie sont multiples mais reposent sur des hypothèses physiopathologiques dépendantes des données épidémiologiques, génétiques ou médicamenteuses. L'identification d'une variation épigénétique ou d'expression chez l'homme doit être poursuivie par l'étude de l'impact de cette variation sur un organisme modèle. Dans notre cas, l'exploration des mécanismes redox et des modifications épigénétiques chez des rongeurs mimant les symptômes à risque et l'entrée dans la maladie pourrait se révéler pertinente. L'avantage des modèles animaux est de pouvoir facilement accéder au tissu cérébral ce qui est un impératif pour conforter les résultats épigénétiques vus en périphérie. Les modèles animaux permettent également de tester des drogues afin de corriger les anomalies biologiques observées.

III.2.C Validation de la valeur prédictive des résultats

Actuellement peu d'études ont été réalisées pour permettre de prédire le risque de transition à l'aide de marqueurs biologiques, bien que l'intérêt de tels biomarqueurs soit reconnu du fait de la faible spécificité des critères cliniques (195). L'annonce d'une pathologie psychotique est un vrai bouleversement pour la vie d'un jeune individu et pour sa famille et il est crucial de pouvoir poser ce diagnostic de manière fiable. Parler d'état mental à risque, sans prédire l'évolution clinique, peut s'avérer stigmatisant pour le sujet et contre-productif.

Notre équipe a participé à une étude protéomique avec les données de la cohorte ICAAR (196). Cette étude a permis de montrer qu'un sous-ensemble de marqueurs biologiques facilement mesurables en routine pouvait permettre de prédire l'évolution vers la transition (figure 3.10).

Cette première étude ouvre la voie à des biomarqueurs pronostiques de la transition psychotique. Des études sur la valeur prédictive de l'épigénétique et de la transcriptomique devront être menées de la même façon et si possible en couplant plusieurs approches.

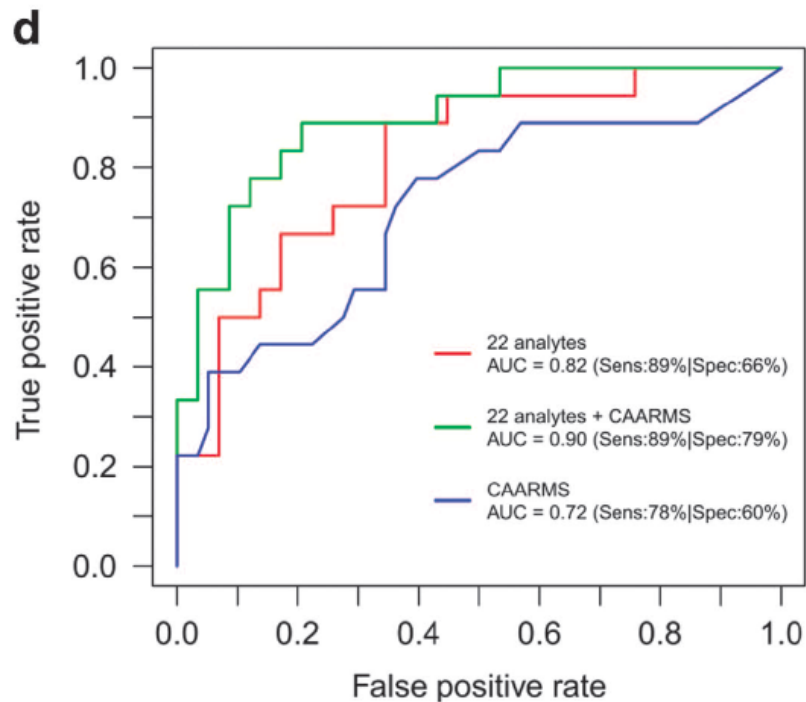


Figure 3.10 extraite de Chan et al 2015 (196) montrant la valeur prédictive du jeu de métabolites testés pour prédire la transition psychotique.

III.3 Les retombées médicales attendues

Dans la section I.1.C nous avons présenté les enjeux de recherche au cours de la transition psychotique et en particulier :

- Amélioration du dépistage des sujets à risque impliquant l'identification de marqueurs biologiques de trait et d'état et développement des critères pronostiques en s'appuyant sur des données biologiques car les données cliniques et d'imagerie sont actuellement insuffisantes pour prédire l'évolution
- Compréhension de la physiopathologie longitudinale et proposition de nouvelles cibles/pistes thérapeutiques
- Compréhension de l'hétérogénéité phénoménologique et étiologique pour tenter de démembrer la schizophrénie sur des bases biologiques

III.3.A Identification de biomarqueurs

Le développement de tests biologiques en psychiatrie, à l’instar de ce qui se développe en neurologie, serait un atout indéniable pour améliorer la stabilité des diagnostics qui bénéficieraient de validateurs externes. En effet, les diagnostics psychiatriques reposent sur des critères cliniques et malgré une standardisation par des critères internationaux, les écarts diagnostiques restent importants. Ces biomarqueurs doivent être reproductibles, fiables et acceptables pour le patient. Les marqueurs sanguins sont donc des marqueurs de choix car facilement utilisables en pratique clinique et pouvant être répétés dans le temps, là où les ponctions lombaires avec dosage des composants du LCR sont invasives et avec des possibilités de dosage moléculaires plus limitées du fait d’un nombre de cellules circulantes très faible (donc inutilisable pour l’épigénétique).

Les marqueurs périphériques identifiés doivent être répliqués. En effet, de nombreuses études identifient des anomalies biologiques mais celles-ci se révèlent secondairement inutilisables ou non fiables. Les données présentées dans cette thèse sont des données préliminaires qu’il faudra répliquer dans des cohortes plus larges, en les couplant à des données cliniques ou des données d’imagerie pour améliorer les prédictions.

III.3.B Amélioration de la prise en charge thérapeutique

Nos travaux suggèrent certaines pistes biologiques sous tendant la transition vers la psychose et ouvrent vers de nouvelles possibilités thérapeutiques. Les hypothèses concernant les variations épigénétiques et l’impact du stress oxydatif semblent être prometteuses. Il est très probable qu’il existe une multitude de chemins menant à l’apparition de la maladie ; ceux-ci correspondent à une diversité physiopathologique et expliquent la variabilité phénotypique mais il pourrait exister une équifinalité, c’est-à-dire une convergence de plusieurs facteurs étiologiques vers une voie finale commune d’expression relativement similaire qui pourrait servir de cible thérapeutique.

D’après les résultats présentés, nous pourrions développer une thérapeutique centrée sur les facteurs modifiables donc sur l’épigénome ou sur les effets de l’environnement.

Des épi-médicaments sont en cours d'évaluation (197). Il pourrait s'agir de drogues modifiant la méthylation de l'ADN ou d'inhibiteurs des HDAC. Cependant, on ne peut exclure un rôle délétère en terme de développement et de prolifération cellulaire ce qui nécessitera sans doute des investigations précises. La piste de la supplémentation vitaminique en B9 ou B12 chez des sujets à risque présentant un fonctionnement anormal du métabolisme C1 est prometteuse.

Des thérapies anti-stress ont déjà été développées. Parmi celles-ci, des techniques de Thérapies Cognitivo-Comportementales basées sur la gestion du stress sont en cours d'évaluation. Des antagonistes des glucocorticoïdes ont également été proposées comme traitement préventif de l'aggravation des troubles psychiatriques émergents. Dans la schizophrénie chronique, des molécules anti-oxydantes ont été étudiées et en particulier les vitamines C et E, la N-acétylcystéine (NAC) et les acides gras notamment les Oméga 3 (174). Seuls les Oméga 3 ont pour l'heure été testés spécifiquement dans l'indication de la prévention de la transition psychotique (198,199). Cette évaluation a porté sur un faible nombre de patients et les études de réplification sont en cours (200). Sur le plan biologique, les Oméga 3 semblent tout à fait bénéfiques pour améliorer le stress oxydatif. En outre, ces médicaments ne présentent pas d'effets secondaires notables et peuvent donc être proposés à un stade initial de la maladie. La NAC a également été proposée comme thérapie préventive de la transition psychotique mais n'a pour l'instant pas été testée (201).

III.3.C Démembrement de la schizophrénie

Il apparaît désormais évident que la schizophrénie regroupe des entités physiopathologiques différentes.

“The current construct of schizophrenia as a unitary disease is far from satisfactory, and is in need of reconceptualization.”

(extrait de Schizophrenia « Just the Facts » Keshavan et al 2011 (202)).

L'identification des facteurs biologiques et leur spécificité au sein de groupes divers pourraient permettre de démembrer la schizophrénie sur des bases biologiques. La nosologie devrait intégrer ces données biologiques et étiopathogéniques et ne plus se contenter d'une taxonomie purement descriptive. C'est désormais le cas dans plusieurs spécialités médicales où

les biomarqueurs ont abouti à de nouveaux regroupements syndromiques. Ainsi, dans le champ des pathologies neurodégénératives, l'arrivée des biomarqueurs du LCR a permis de mieux définir les démences de type Alzheimer et de préciser le degré de certitude diagnostique (203). Le développement de ce type de classification est déjà une réalité au sein des troubles du spectre autistique pour lesquels on définit actuellement des maladies distinctes telles le syndrome de X fragile, le syndrome de Williams-Beuren, le syndrome de Prader-Willi ou d'Angelman (204).

Certains groupes internationaux ont d'ores et déjà prévu d'intégrer les données biologiques dans leur future classification dimensionnelle appelée RDoC (205). Une initiative d'un groupe travaillant sur le continuum schizophrénie-bipolarité (B-SNIP pour Bipolar Schizophrenia Network on Intermediate Phenotypes) a montré que certains patients présentant des phénotypes cliniques réputés distincts pouvaient parfois présenter des similitudes biologiques (206). C'est également un constat au sein de familles qui présentent les mêmes facteurs génétiques mais des spectres phénotypiques différents. Une démarche opportune serait de rechercher la cause génétique puis d'expliquer la pénétrance variable. L'approche omique individuelle au sein de familles multiplexes phénotypées très précisément peut permettre de répondre à la question de l'hétérogénéité et de la pathogénicité tout en établissant une démarche de médecine personnalisée.

Conclusion

Nos travaux montrent l'intérêt d'étudier la dynamique des modifications biologiques durant la phase d'émergence de la psychose pour mieux comprendre les bases étiopathogéniques de la maladie et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, potentiellement préventives. Nos résultats pointent notamment certaines modifications épigénétiques et transcriptomiques qui convergent vers l'implication de la guidance axonale, du métabolisme monocarboné et du stress oxydatif. L'hypothèse actuelle repose sur l'association de plusieurs atteintes pour déclencher la maladie. Ces atteintes peuvent être génétiques (epistasie : GxG), environnementales (ExE) ou associer ces deux facteurs (GxE). Cette association peut être de double, triple, quadruple niveau... (GxGxExE par exemple). L'épigénétique servirait d'interface biologique à ces interactions. Le patrimoine génétique d'un individu, la disponibilité des cofacteurs nécessaires aux mécanismes épigénétiques pourraient déterminer la plasticité de l'épigénome de cet individu. Seule une approche holistique permet d'appréhender une telle hypothèse. L'aspect pathogène de ces variations épigénétiques n'est pour l'instant pas formellement établi mais reste plausible d'un point de vue biologique, au vu de l'état de nos connaissances actuelles dans le domaine.

Les premiers résultats présentés dans cette thèse doivent avant tout être répliqués. Cette réplication devrait idéalement intervenir dans un autre échantillon clinique indépendant, ce qui pose le problème du recrutement standardisé de patients au sein de différentes cohortes, et qui sera rendu possible uniquement par des collaborations entre équipes. Il est probable que ces collaborations nécessitent des regroupements internationaux pour augmenter la taille des effectifs. Ce tournant a déjà vu le jour avec la mise en place du consortium EU-GEI. L'établissement de telles coopérations entre laboratoires et équipes cliniques internationales doit permettre de développer la recherche biologique en psychiatrie.

L'un des enjeux de la recherche biologique sur la transition psychotique est d'identifier des biomarqueurs pronostiques qui pourraient permettre de prédire l'évolution des sujets à risque ou a minima des biomarqueurs utilisables pour suivre l'évolution des individus. L'investigation **longitudinale** de la biologie de ces individus pourrait aboutir à une révolution dans le domaine de la psychiatrie. En effet, le basculement d'un concept de maladie chronique établie à une maladie neuroprogressive aboutit à des protocoles innovants où les changements biologiques sont étudiés chez un même sujet en fonction de son évolution clinique plutôt

qu'entre des groupes catégoriels distincts. Pour la schizophrénie, l'utilisation du modèle des stades cliniques (clinical staging model) est une première étape pour tenter d'appréhender différemment la biologie complexe de cette pathologie. La physiopathologie évolue, de la compréhension des neurotransmetteurs à l'implication de cibles moléculaires plus profondes comme la régulation du stress oxydatif, l'immunité cellulaire, certaines voies de signalisation. Outre que cette meilleure appréhension de la physiopathologie permettra de développer des biomarqueurs cohérents et avec une valeur intrinsèque élevée, elle est essentielle pour proposer des thérapeutiques plus efficaces. L'efficacité partielle des traitements médicamenteux dans la psychose incite au développement d'autres types de molécules thérapeutiques, moins symptomatiques et davantage basées sur la physiopathologie. Le développement de molécules actives sur l'épigénome ou d'antagonistes des récepteurs des glucocorticoïdes est un espoir thérapeutique. Dans le cas de la prévention de la psychose, ces molécules doivent impérativement être dépourvues d'effets secondaires graves ou fréquents pour permettre leur acceptabilité à un stade où il faut traiter de nombreux sujets qui n'évolueront pas vers la psychose. Le développement de marqueurs pronostiques permettrait également de préciser la population devant bénéficier de ces thérapeutiques et de diminuer l'exposition des non-transiteurs. A ce titre, la supplémentation vitaminique en vitamine B12 et en folate est une piste très intéressante qui pourrait s'avérer bénéfique au moins chez un sous-groupe de patients.

La recherche est en train de changer de dimension avec l'arrivée des big data rendues possibles par les techniques de séquençage à haut-débit et l'utilisation des puces à ADN qui génèrent des **données omiques**. Le traitement de ces données massives est un enjeu en soi, qui bénéficie de l'apport d'autres domaines de recherche comme celui de la bio-informatique. Les techniques d'analyse continuent d'évoluer et doivent sans cesse être évaluées pour permettre l'obtention de résultats fiables. Cependant, la dimension omique de la recherche, par l'exploration croisée de l'ensemble des données complémentaires, permet d'aborder différemment l'hétérogénéité connue de longue date de la schizophrénie. La schizophrénie est un syndrome aux causes multiples et cette hétérogénéité semble si importante que les études statistiques larges ont tendance à noyer le signal. De nouvelles méthodes statistiques doivent être développées pour faire face à l'hétérogénéité. En particulier, les analyses par clusters (chapitre II.3) ou par équations structurelles (chapitre II.4) pourraient se révéler très intéressantes. Le dépassement des statistiques inférentielles classiques par des méthodes bayésiennes semble également prometteur.

Pour affronter cette hétérogénéité, il peut également être nécessaire de mieux circonscrire les recherches pour étudier des cohortes plus homogènes. En particulier, la

recherche sur des patients à risque génétique (par exemple patients porteurs de délétion 22q11) est une piste intéressante puisque ces patients qui partagent les mêmes causes pourraient avoir des chemins vers la psychose similaires. L'homogénéité pourrait passer par la définition de biotypes c'est-à-dire de catégories non plus syndromiques mais basées sur la biologie. Cette hypothèse implique que nous devrions étudier les causes biologiques dans des sous-groupes de schizophrènes. Il est peu probable que ces sous-groupes demeurent basés sur des critères cliniques car l'expérience montre que même des apparentés présentant un patrimoine génétique et un environnement partagés peuvent avoir des expressions phénotypiques différentes.

L'identification d'anomalies chez un patient est rendue aujourd'hui aisée par les techniques omiques et transforme le problème de la détection des anomalies vers la discussion de la pathogénicité des variations retrouvées chez cet individu. L'étude fonctionnelle permet de surmonter ce problème, par exemple en utilisant des modèles **translotionnels**. La caractérisation comportementale d'un animal présentant une anomalie similaire à celle d'un patient affirme le caractère causal de cette anomalie. Elle peut s'accompagner d'une exploration physiopathologique basée sur les tissus non accessibles sur des patients vivants mais accessibles chez l'animal. Une approche fonctionnelle sur des modèles cellulaires est également envisageable grâce aux nouveaux modèles de cellules transformées (207) ou sur des organoïdes (208). Une autre proposition est d'utiliser le recouvrement des données omiques d'un même individu pour déterminer la pathogénicité d'une anomalie. Une mutation ponctuelle qui se traduirait par une diminution de l'expression de l'ARNm du gène correspondant et qui modifierait la disponibilité de la protéine codée par ce gène est probablement davantage pathogène qu'une mutation sans autre variation biologique associée. L'amélioration clinique du patient couplée à la variation longitudinale de l'expression de cette protéine achèverait la démonstration.

Cette transformation de la recherche vers une individualisation de la physiopathologie doit faire évoluer notre pratique psychiatrique d'un diagnostic symptomatique vers un diagnostic étiologique. Les diagnostics ne devraient plus s'appuyer uniquement sur des regroupements syndromiques mais être basés sur les anomalies biologiques. Cette nouvelle approche diagnostique pourrait se révéler bénéfique pour développer des traitements étiologiques et donc aboutir à une médecine personnalisée fondée sur des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques mais aussi sur des biomarqueurs thérapeutiques permettant de suivre la trajectoire pathologique d'un individu et sa réponse sous traitement.

Cependant, nos connaissances actuelles sont largement limitées et nous ne disposons pas encore des outils ni des connaissances suffisantes pour franchir facilement et de manière

massive cette étape. La schizophrénie pourrait être liée à des marqueurs épigénétiques non mis en évidence par les techniques actuelles ou encore non découverts. Les explorations ne reposent que sur la partie connue de la biologie et une large majorité des mécanismes biologiques restent probablement inconnus pour l'instant : par exemple, il est désormais aisé d'étudier l'exome qui représente 1,5% de notre patrimoine génétique mais beaucoup moins l'ensemble du génome. Ce constat plaide pour le maintien d'une recherche fondamentale de haut niveau, allant de pair avec une recherche clinique de qualité.

Bibliographie

Ouvrages généraux

1. Krebs M-O. Signes précoces des schizophrénies. DUNOD; 2015. (Psychothérapies).
2. Psychosis and schizophrenia in children and young people: recognition and management Guidance and guidelines (NICE)

Références

1. Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia. *PLOS Med.* 2005 mai;2(5):e141.
2. Rice DP. The economic impact of schizophrenia. *J Clin Psychiatry.* 1999;60 Suppl 1:4–6; discussion 28–30.
3. Chong HY, Teoh SL, Wu DB-C, Kotirum S, Chiou C-F, Chaiyakunapruk N. Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016;12:357–73.
4. Robinson DG, Woerner MG, McMeniman M, Mendelowitz A, Bilder RM. Symptomatic and functional recovery from a first episode of schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry.* 2004 Mar;161(3):473–9.
5. Harrison G, Hopper K, Craig T, Laska E, Siegel C, Wanderling J, et al. Recovery from psychotic illness: a 15- and 25-year international follow-up study. *Br J Psychiatry.* 2001 Jun 1;178(6):506–17.
6. Marwaha S, Johnson S. Schizophrenia and employment - a review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2004 May;39(5):337–49.
7. Folsom DP, Hawthorne W, Lindamer L, Gilmer T, Bailey A, Golshan S, et al. Prevalence and risk factors for homelessness and utilization of mental health services among 10,340 patients with serious mental illness in a large public mental health system. *Am J Psychiatry.* 2005 Feb;162(2):370–6.
8. Tiihonen J, Lönnqvist J, Wahlbeck K, Klaukka T, Niskanen L, Tanskanen A, et al. 11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study). *Lancet Lond Engl.* 2009 Aug 22;374(9690):620–7.

9. Hor K, Taylor M. Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *J Psychopharmacol Oxf Engl*. 2010 Nov;24(4 Suppl):81–90.
10. Müller N, Dursun SM. Schizophrenia genes, epigenetics and psychoneuroimmunology therapeutics: all make sense now? *J Psychopharmacol Oxf Engl*. 2011 Jun;25(6):713–4.
11. Kahn RS, Sommer IE, Murray RM, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR, Cannon TD, et al. Schizophrenia. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 Nov 12;15067.
12. Samara MT, Dold M, Gianatsi M, Nikolakopoulou A, Helfer B, Salanti G, et al. Efficacy, Acceptability, and Tolerability of Antipsychotics in Treatment-Resistant Schizophrenia: A Network Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2016 Mar 1;73(3):199–210.
13. Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G, Cadenhead K, Dazzan P, Fusar-Poli P, et al. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Mar 4;
14. Shields J, Gottesman II. Cross-national diagnosis of schizophrenia in twins. The heritability and specificity of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1972 Dec;27(6):725–30.
15. Girard SL, Xiong L, Dion PA, Rouleau GA. Where are the missing pieces of the schizophrenia genetics puzzle? *Curr Opin Genet Dev*. 2011 Jun;21(3):310–6.
16. Girard SL, Gauthier J, Noreau A, Xiong L, Zhou S, Jouan L, et al. Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nat Genet*. 2011 Sep;43(9):860–3.
17. Van Dongen J, Boomsma DI. The evolutionary paradox and the missing heritability of schizophrenia. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2013 Mar;162B(2):122–36.
18. Waddington C. *Strategy of the Genes*. London: Allen and Unwin; 1957.
19. Landecker H, Panofsky A. From Social Structure to Gene Regulation, and Back: A Critical Introduction to Environmental Epigenetics for Sociology. *Annu Rev Sociol*. 2013;39(1):333–57.
20. Meloni M, Testa G. Scrutinizing the epigenetics revolution. *Biosocieties*. 2014 Nov;9(4):431–56.
21. Juengst ET, Fishman JR, McGowan ML, Settersten RA. Serving epigenetics before its time. *Trends Genet TIG*. 2014 Oct;30(10):427–9.
22. Petronis A. The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. *Biol Psychiatry*. 2004 May 15;55(10):965–70.
23. Kraepelin E. *Psychiatrie : ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte* [Internet]. Leipzig : Barth; 1899 [cited 2016 Mar 12]. 1004. Available from: <http://archive.org/details/psychiatrieeinle04krae>
24. Mayer-Gross W. *Die Klinik der Schizophrenie*. Berlin: Bumke O.; 1932.

25. Conrad K. Die beginnende Schizophrenie: Versuch einer Gestaltanalyse des Wahnsinns. 1st ed. Bonn: Psychiatrie Verlag; 1958.
26. Rzesnizsek L. “Early Psychosis” as a mirror of biologist controversies in post-war German, Anglo-Saxon, and Soviet Psychiatry. *Front Psychol.* 2013;4:481.
27. Sullivan HS. The onset of schizophrenia. 1927. *Am J Psychiatry.* 1994 Jun;151(6 Suppl):134–9.
28. Delille E. La réception française des travaux allemands sur les psychoses débutantes. Un exemple de circulation difficile des savoirs médicaux 1945-1989. *PSN.* 2015 Feb 27;me 13(1):51–73.
29. Huber G, Gross G. The concept of basic symptoms in schizophrenic and schizoaffective psychoses. *Recenti Prog Med.* 1989 Dec;80(12):646–52.
30. Orygen. Orygen.org [Internet]. History. 2015. Available from: <https://orygen.org.au/About/History>
31. Klosterkötter J, Ruhrmann S, Schultze-Lutter F, Salokangas RKR, Linszen D, Birchwood M, et al. The European Prediction of Psychosis Study (EPOS): integrating early recognition and intervention in Europe. *World Psychiatry Off J World Psychiatr Assoc WPA.* 2005 Oct;4(3):161–7.
32. Addington J, Cadenhead KS, Cannon TD, Cornblatt B, McGlashan TH, Perkins DO, et al. North American Prodrome Longitudinal Study: a collaborative multisite approach to prodromal schizophrenia research. *Schizophr Bull.* 2007 May;33(3):665–72.
33. Addington J, Cadenhead KS, Cornblatt BA, Mathalon DH, McGlashan TH, Perkins DO, et al. North American Prodrome Longitudinal Study (NAPLS 2): overview and recruitment. *Schizophr Res.* 2012 Dec;142(1-3):77–82.
34. Fusar-Poli P, Byrne M, Badger S, Valmaggia LR, McGuire PK. Outreach and support in South London (OASIS), 2001-2011: Ten years of early diagnosis and treatment for young individuals at high clinical risk for psychosis. *Eur Psychiatry J Assoc Eur Psychiatr.* 2012 Nov 5;
35. Gut-Fayand A. Une expérience à la française : le Centre d’Évaluation pour les jeunes adultes et les adolescents. *L’Encéphale.* 2008 Dec;34:S175–S178.
36. European Network of National Networks studying Gene-Environment Interactions in Schizophrenia (EU-GEI), van Os J, Rutten BP, Myin-Germeys I, Delespaul P, Viechtbauer W, et al. Identifying gene-environment interactions in schizophrenia: contemporary challenges for integrated, large-scale investigations. *Schizophr Bull.* 2014 Jul;40(4):729–36.
37. Tsuang MT, Van Os J, Tandon R, Barch DM, Bustillo J, Gaebel W, et al. Attenuated psychosis syndrome in DSM-5. *Schizophr Res.* 2013 Oct;150(1):31–5.
38. Cole E, Leavey G, King M, Johnson-Sabine E, Hoar A. Pathways to care for patients with a first episode of psychosis. A comparison of ethnic groups. *Br J Psychiatry J Ment Sci.* 1995 Dec;167(6):770–6.

39. Norman RM, Malla AK. Duration of untreated psychosis: a critical examination of the concept and its importance. *Psychol Med.* 2001 Apr;31(3):381–400.
40. Marshall M, Lewis S, Lockwood A, Drake R, Jones P, Croudace T. Association between duration of untreated psychosis and outcome in cohorts of first-episode patients: a systematic review. *Arch Gen Psychiatry.* 2005 Sep;62(9):975–83.
41. Penttilä M, Jääskeläinen E, Hirvonen N, Isohanni M, Miettunen J. Duration of untreated psychosis as predictor of long-term outcome in schizophrenia: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry.* 2014 Aug 1;205(2):88–94.
42. Psychosis and schizophrenia in children and young people: recognition and management | Guidance and guidelines | NICE [Internet]. [cited 2016 Mar 12]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg155>
43. Karson C, Duffy RA, Eramo A, Nylander A-G, Offord SJ. Long-term outcomes of antipsychotic treatment in patients with first-episode schizophrenia: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016;12:57–67.
44. Malla AM, Norman RM. Treating psychosis: is there more to early intervention than intervening early? *Can J Psychiatry Rev Can Psychiatr.* 2001 Sep;46(7):645–8.
45. Keshavan MS, Schooler NR. First-episode studies in schizophrenia: criteria and characterization. *Schizophr Bull.* 1992;18(3):491–513.
46. Fusar-Poli P, Yung AR, McGorry P, van Os J. Lessons learned from the psychosis high-risk state: towards a general staging model of prodromal intervention. *Psychol Med.* 2014 Jan;44(1):17–24.
47. McGorry PD, Hickie IB, Yung AR, Pantelis C, Jackson HJ. Clinical staging of psychiatric disorders: a heuristic framework for choosing earlier, safer and more effective interventions. *Aust N Z J Psychiatry.* 2006 Aug;40(8):616–22.
48. Wood SJ, Yung AR, McGorry PD, Pantelis C. Neuroimaging and Treatment Evidence for Clinical Staging in Psychotic Disorders: From the At-Risk Mental State to Chronic Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011 Oct 1;70(7):619–25.
49. Fusar-Poli P, Bonoldi I, Yung AR, Borgwardt S, Kempton MJ, Valmaggia L, et al. Predicting psychosis: meta-analysis of transition outcomes in individuals at high clinical risk. *Arch Gen Psychiatry.* 2012 Mar;69(3):220–9.
50. Rioux A. L'hypothèse de Huber et les perturbations subjectives de la schizophrénie. [Laval (Québec)]: Université Laval; 2006.
51. Haroche A. Les symptômes de base de la schizophrénie [Mini-mémoire scientifique]. [Paris]; 2015.
52. Gross G, Huber G, Klosterkötter J, Linz M. BSABS [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1987 [cited 2016 Mar 12]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-71776-5>

53. Loas G, Berner P, Rein W, Yon V, Boyer P, Lecrubier Y. [French translation of the Frankfurt Complaint Questionnaire (Frankfurter Beschwerde-Fragebogen, FBF, Süllwold, 1986)]. *Encephale*. 1997 Oct;23(5):364–74.
54. Krebs M-O, Magaud E, Willard D, Elkhazen C, Chauchot F, Gut A, et al. Assessment of mental states at risk of psychotic transition: Validation of the French version of the CAARMS. *L'Encéphale*.
55. Daneault J-G, Stip E, Refer-O-Scope Group. Genealogy of instruments for prodrome evaluation of psychosis. *Front Psychiatry*. 2013;4:25.
56. Schultze-Lutter F, Ruhrmann S, Berning J, Maier W, Klosterkötter J. Basic Symptoms and Ultrahigh Risk Criteria: Symptom Development in the Initial Prodromal State. *Schizophr Bull*. 2010 Jan;36(1):182–91.
57. Kempton MJ, Bonoldi I, Valmaggia L, McGuire P, Fusar-Poli P. Speed of psychosis progression in people at ultra-high clinical risk: A complementary meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2015 Jun 1;72(6):622–3.
58. Fusar-Poli P, Borgwardt S, Bechdolf A, Addington J, Riecher-Rössler A, Schultze-Lutter F, et al. The psychosis high-risk state: a comprehensive state-of-the-art review. *JAMA Psychiatry*. 2013 Jan;70(1):107–20.
59. Correll CU, Hauser M, Auther AM, Cornblatt BA. Research in people with psychosis risk syndrome: a review of the current evidence and future directions. *J Child Psychol Psychiatry*. 2010 Apr;51(4):390–431.
60. Fusar-Poli P, Cappucciati M, Borgwardt S, Woods SW, Addington J, Nelson B, et al. Heterogeneity of Psychosis Risk Within Individuals at Clinical High Risk: A Meta-analytical Stratification. *JAMA Psychiatry*. 2016 Feb 1;73(2):113–20.
61. McGorry P, Keshavan M, Goldstone S, Amminger P, Allott K, Berk M, et al. Biomarkers and clinical staging in psychiatry. *World Psychiatry Off J World Psychiatr Assoc WPA*. 2014 Oct;13(3):211–23.
62. Fond G, d'Albis M-A, Jamain S, Tamouza R, Arango C, Fleischhacker WW, et al. The promise of biological markers for treatment response in first-episode psychosis: a systematic review. *Schizophr Bull*. 2015 May;41(3):559–73.
63. Chaumette B. Exploration biologique des maladies neuropsychiatriques. 29^{èmes} Journées Nationales de Biologie Clinique; 2015 mai; Hammamet (Tunisie).
64. Marshall M, Rathbone J. Early intervention for psychosis. *Cochrane Database Syst Rev Online*. 2011;(6):CD004718.
65. Higgins J, Gore R, Gutkind D, Mednick SA, Parnas J, Schulsinger F, et al. Effects of child-rearing by schizophrenic mothers: a 25-year follow-up. *Acta Psychiatr Scand*. 1997 Nov;96(5):402–4.
66. Modinos G, Iyegbe C, Prata D, Rivera M, Kempton MJ, Valmaggia LR, et al. Molecular genetic gene–environment studies using candidate genes in schizophrenia: A systematic review. *Schizophr Res*. 2013 Nov;150(2–3):356–65.

67. Collip D, van Winkel R, Peerbooms O, Lataster T, Thewissen V, Lardinois M, et al. COMT Val158Met-stress interaction in psychosis: role of background psychosis risk. *CNS Neurosci Ther.* 2011 Dec;17(6):612–9.
68. Walder DJ, Trotman HD, Cubells JF, Brasfield J, Tang Y-L, Walker EF. Catechol-O-methyltransferase modulation of cortisol secretion in psychiatrically at-risk and healthy adolescents. *Psychiatr Genet.* 2010 Aug;20(4):166–70.
69. Peerbooms O, Rutten BPF, Collip D, Lardinois M, Lataster T, Thewissen V, et al. Evidence that interactive effects of COMT and MTHFR moderate psychotic response to environmental stress. *Acta Psychiatr Scand.* 2012 Mar;125(3):247–56.
70. Power RA, Verweij KJH, Zuhair M, Montgomery GW, Henders AK, Heath AC, et al. Genetic predisposition to schizophrenia associated with increased use of cannabis. *Mol Psychiatry.* 2014 Nov;19(11):1201–4.
71. Petronis A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature.* 2010 Jun 10;465(7299):721–7.
72. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999 Oct 15;286(5439):481–6.
73. Dulac C. Brain function and chromatin plasticity. *Nature.* 2010 Jun 10;465(7299):728–35.
74. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):253–62.
75. Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron.* 2008 Dec 26;60(6):961–74.
76. Roth TL, Sweatt JD. Regulation of chromatin structure in memory formation. *Curr Opin Neurobiol.* 2009 Jun;19(3):336–42.
77. Bestor TH, Edwards JR, Boulard M. Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jun 2;112(22):6796–9.
78. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun;9(6):465–76.
79. Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity.* 2010 Jul;105(1):4–13.
80. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006 Feb;31(2):89–97.
81. Nuber UA, Kriaucionis S, Roloff TC, Guy J, Selfridge J, Steinhoff C, et al. Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005 Aug 1;14(15):2247–56.
82. Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15536–41.

83. Szutorisz H, Hurd YL. Epigenetic Effects of Cannabis Exposure. *Biol Psychiatry*. 2016 Apr 1;79(7):586–94.
84. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007 May;8(5):355–67.
85. Ray-Gallet D, Gérard A, Polo S, Almouzni G. Variations sur le thème du « code histone ». *MS Médecine Sci*. 2005;21(4):384–9.
86. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41–5.
87. Merico D, Costain G, Butcher NJ, Warnica W, Ogura L, Alfred SE, et al. MicroRNA Dysregulation, Gene Networks, and Risk for Schizophrenia in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Front Neurol*. 2014;5:238.
88. Kebir O. *Épigénétique & psychose : Étude génétique des enzymes de la machinerie de régulation épigénétique* [Internet]. [Paris (France)]: Université Paris Descartes; 2011 [cited 2016 Mar 13]. Available from: <http://www.theses.fr/2011PA05T019>
89. Miozzo F, Sabéran-Djoneidi D, Mezger V. HSFs, Stress Sensors and Sculptors of Transcription Compartments and Epigenetic Landscapes. *J Mol Biol*. 2015 Dec 4;427(24):3793–816.
90. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*. 2004 Aug;7(8):847–54.
91. Provencal N, Binder EB. The neurobiological effects of stress as contributors to psychiatric disorders: focus on epigenetics. *Curr Opin Neurobiol*. 2014 Sep 11;30C:31–7.
92. Sutherland JE, Costa M. Epigenetics and the environment. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Mar;983:151–60.
93. Dolinoy DC. Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics*. 2007 Jan;8(1):5–10.
94. McGowan PO, Suderman M, Sasaki A, Huang TCT, Hallett M, Meaney MJ, et al. Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e14739.
95. Rutten BPF, Mill J. Epigenetic mediation of environmental influences in major psychotic disorders. *Schizophr Bull*. 2009 Nov;35(6):1045–56.
96. Issidorides MR, Stefanis CN, Varsou E, Katsorchis T. Altered chromatin ultrastructure in neutrophils of schizophrenics. *Nature*. 1975 Dec 18;258(5536):612–4.
97. Castellani CA, Laufer BI, Melka MG, Diehl EJ, O'Reilly RL, Singh SM. DNA methylation differences in monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia identifies psychosis related genes and networks. *BMC Med Genomics*. 2015;8:17.
98. Rivollier F, Lotersztajn L, Chaumette B, Krebs M-O, Kebir O. [Epigenetics of schizophrenia: a review]. *Encephale*. 2014 Oct;40(5):380–6.

99. Teroganova N, Girshkin L, Suter CM, Green MJ. DNA methylation in peripheral tissue of schizophrenia and bipolar disorder: a systematic review. *BMC Genet.* 2016;17(1):27.
100. Millan MJ. An epigenetic framework for neurodevelopmental disorders: from pathogenesis to potential therapy. *Neuropharmacology.* 2013 May;68:2–82.
101. Barco A. Neuroepigenetic disorders: progress, promises and challenges. *Neuropharmacology.* 2014 May;80:1–2.
102. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Sep;13(9):673–91.
103. Córdova-Palomera A, Fatjó-Vilas M, Kebir O, Gastó C, Krebs MO, Fañanás L. Polymorphic variation in the epigenetic gene DNMT3B modulates the environmental impact on cognitive ability: a twin study. *Eur Psychiatry J Assoc Eur Psychiatr.* 2015 Feb;30(2):303–8.
104. Feng J, Fan G. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2009;89:67–84.
105. Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem.* 2008 May;89(4):599–603.
106. Kleefstra T, Schenck A, Kramer JM, van Bokhoven H. The genetics of cognitive epigenetics. *Neuropharmacology.* 2014 May;80:83–94.
107. Singh T, Kurki MI, Curtis D, Purcell SM, Crooks L, McRae J, et al. Rare loss-of-function variants in SETD1A are associated with schizophrenia and developmental disorders. *Nat Neurosci.* 2016 Mar 14;
108. Chadwick BP. Epigenetics: Current Research and Emerging Trends [Internet]. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2015 [cited 2016 Mar 16]. Available from: <http://www.horizonpress.com/epigenetics2015>
109. Krebs MO, Bellon A, Mainguy G, Jay TM, Frieling H. One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *Trends Mol Med.* 2009 Dec;15(12):562–70.
110. Assies J, Mocking RJT, Lok A, Ruhé HG, Pouwer F, Schene AH. Effects of oxidative stress on fatty acid- and one-carbon-metabolism in psychiatric and cardiovascular disease comorbidity. *Acta Psychiatr Scand.* 2014 Sep;130(3):163–80.
111. Peerbooms OLJ, van Os J, Drukker M, Kenis G, Hoogveld L, MTHFR in Psychiatry Group, et al. Meta-analysis of MTHFR gene variants in schizophrenia, bipolar disorder and unipolar depressive disorder: evidence for a common genetic vulnerability? *Brain Behav Immun.* 2011 Nov;25(8):1530–43.
112. Cohen SM, Nichols A, Wyatt R, Pollin W. The administration of methionine to chronic schizophrenic patients: a review of ten studies. *Biol Psychiatry.* 1974 Apr;8(2):209–25.

113. Numata S, Kinoshita M, Tajima A, Nishi A, Imoto I, Ohmori T. Evaluation of an association between plasma total homocysteine and schizophrenia by a Mendelian randomization analysis. *BMC Med Genet*. 2015;16:54.
114. Bleich S, Frieling H, Hillemecher T. Elevated prenatal homocysteine levels and the risk of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Aug;64(8):980–1.
115. Van Os J, Kenis G, Rutten BPF. The environment and schizophrenia. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):203–12.
116. Krebs MO, Morvan Y, Jay T, Gaillard R, Kebir O. Psychotomimetic effects at initiation of cannabis use are associated with cannabinoid receptor 1 (CNR1) variants in healthy students. *Mol Psychiatry*. 2014 Apr;19(4):402–3.
117. Penn AA, Gressens P, Fleiss B, Back SA, Gallo V. Controversies in preterm brain injury. *Neurobiol Dis*. 2015 Oct 23;
118. Lester BM, Marsit CJ, Giarraputo J, Hawes K, LaGasse LL, Padbury JF. Neurobehavior related to epigenetic differences in preterm infants. *Epigenomics*. 2015 Oct;7(7):1123–36.
119. Laurens KR, Luo L, Matheson SL, Carr VJ, Raudino A, Harris F, et al. Common or distinct pathways to psychosis? A systematic review of evidence from prospective studies for developmental risk factors and antecedents of the schizophrenia spectrum disorders and affective psychoses. *BMC Psychiatry*. 2015;15:205.
120. Varese F, Smeets F, Drukker M, Lieverse R, Lataster T, Viechtbauer W, et al. Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective- and cross-sectional cohort studies. *Schizophr Bull*. 2012 Jun;38(4):661–71.
121. Pruessner M, Vracotas N, Joob R, Pruessner JC, Malla AK. Blunted cortisol awakening response in men with first episode psychosis: Relationship to parental bonding. *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Feb;38(2):229–40.
122. D'Souza DC, Perry E, MacDougall L, Ammerman Y, Cooper T, Wu Y-T, et al. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2004 Aug;29(8):1558–72.
123. Sherif M, Radhakrishnan R, D'Souza DC, Ranganathan M. Human Laboratory Studies on Cannabinoids and Psychosis. *Biol Psychiatry*. 2016 Apr 1;79(7):526–38.
124. Marconi A, Di Forti M, Lewis CM, Murray RM, Vassos E. Meta-analysis of the Association Between the Level of Cannabis Use and Risk of Psychosis. *Schizophr Bull*. 2016 Feb 15;
125. Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ*. 2002 Nov 23;325(7374):1212–3.
126. Mackie CJ, O'Leary-Barrett M, Al-Khudhairy N, Castellanos-Ryan N, Struve M, Topper L, et al. Adolescent bullying, cannabis use and emerging psychotic experiences: a longitudinal general population study. *Psychol Med*. 2013 May;43(5):1033–44.

127. Veling W. Ethnic minority position and risk for psychotic disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 2013 Mar;26(2):166–71.
128. Vassos E, Pedersen CB, Murray RM, Collier DA, Lewis CM. Meta-analysis of the association of urbanicity with schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2012 Nov;38(6):1118–23.
129. Pedersen CB, Mortensen PB. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Nov;58(11):1039–46.
130. Pedersen CB. Persons with schizophrenia migrate towards urban areas due to the development of their disorder or its prodromata. *Schizophr Res*. 2015 Oct;168(1-2):204–8.
131. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Jan;13(1):22–37.
132. Power C, Thomas C, Li L, Hertzman C. Childhood psychosocial adversity and adult cortisol patterns. *Br J Psychiatry J Ment Sci*. 2012 Sep;201(3):199–206.
133. Steinheuser V, Ackermann K, Schönfeld P, Schwabe L. Stress and the city: impact of urban upbringing on the (re)activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom Med*. 2014 Dec;76(9):678–85.
134. Lederbogen F, Kühner C, Kirschbaum C, Meisinger C, Lammich J, Holle R, et al. Salivary cortisol in a middle-aged community sample: results from 990 men and women of the KORA-F3 Augsburg study. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 2010 Sep;163(3):443–51.
135. Mizrahi R, Addington J, Rusjan PM, Suridjan I, Ng A, Boileau I, et al. Increased stress-induced dopamine release in psychosis. *Biol Psychiatry*. 2012 Mar 15;71(6):561–7.
136. Soliman A, O’Driscoll GA, Pruessner J, Jooper R, Ditto B, Streicker E, et al. Limbic response to psychosocial stress in schizotypy: a functional magnetic resonance imaging study. *Schizophr Res*. 2011 Sep;131(1-3):184–91.
137. Soliman A, O’Driscoll GA, Pruessner J, Holahan A-LV, Boileau I, Gagnon D, et al. Stress-induced dopamine release in humans at risk of psychosis: a [¹¹C]raclopride PET study. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2008 Jul;33(8):2033–41.
138. Holtzman CW, Trotman HD, Goulding SM, Ryan AT, MacDonald AN, Shapiro DI, et al. Stress and neurodevelopmental processes in the emergence of psychosis. *Neuroscience*. 2013 Sep 26;249:172–91.
139. Girshkin L, Matheson SL, Shepherd AM, Green MJ. Morning cortisol levels in schizophrenia and bipolar disorder: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Jul 21;49C:187–206.
140. Tordjman S, Anderson GM, Kermarrec S, Bonnot O, Geoffray M-M, Brailly-Tabard S, et al. Altered circadian patterns of salivary cortisol in low-functioning children and adolescents with autism. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Dec;50:227–45.

141. Ciufolini S, Dazzan P, Kempton MJ, Pariante C, Mondelli V. HPA axis response to social stress is attenuated in schizophrenia but normal in depression: Evidence from a meta-analysis of existing studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Nov;47:359–68.
142. Caudal D, Jay TM, Godsil BP. Behavioral stress induces regionally-distinct shifts of brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor levels. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:19.
143. Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, et al. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. *Science.* 2013 Jan 18;339(6117):335–9.
144. Kundakovic M. Postnatal risk environments, epigenetics, and psychosis: putting the pieces together. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2014 Oct;49(10):1535–6.
145. Jawahar MC, Murgatroyd C, Harrison EL, Baune BT. Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders. *Clin Epigenetics [Internet].* 2015 Nov 14 [cited 2016 Mar 17];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4650349/>
146. Labonté B, Suderman M, Maussion G, Navaro L, Yerko V, Mahar I, et al. Genome-wide epigenetic regulation by early-life trauma. *Arch Gen Psychiatry.* 2012 Jul;69(7):722–31.
147. Khulan B, Manning JR, Dunbar DR, Seckl JR, Raikkonen K, Eriksson JG, et al. Epigenomic profiling of men exposed to early-life stress reveals DNA methylation differences in association with current mental state. *Transl Psychiatry.* 2014 Sep;4(9):e448.
148. Bagot RC, Labonté B, Peña CJ, Nestler EJ. Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014 Sep;16(3):281–95.
149. Chauhan E, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Cross stress adaptation: Phenomenon of interactions between homotypic and heterotypic stressors. *Life Sci.* 2015 Sep 15;137:98–104.
150. Walker DL, Bhagwate AV, Baheti S, Smalley RL, Hilker CA, Sun Z, et al. DNA methylation profiling: comparison of genome-wide sequencing methods and the Infinium Human Methylation 450 Bead Chip. *Epigenomics.* 2015 Dec;7(8):1287–302.
151. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 2010 Feb 2;11(3):191–203.
152. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinforma Oxf Engl.* 2012 Mar 15;28(6):882–3.
153. Leek JT, Storey JD. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet.* 2007 Sep;3(9):1724–35.
154. Houseman EA, Kim S, Kelsey KT, Wiencke JK. DNA Methylation in Whole Blood: Uses and Challenges. *Curr Environ Heal Reports.* 2015 Jun;2(2):145–54.

155. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinforma Oxf Engl*. 2014 May 15;30(10):1363–9.
156. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47.
157. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:128.
158. Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D793–800.
159. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc*. 2007 Sep;2(9):2265–75.
160. Loe-mie Yann. Contribution bioinformatique à l'analyse du transcriptome humain [Internet]. Aix-Marseille; 2012 [cited 2016 Mar 16]. Available from: <http://www.theses.fr/2012AIXM4002>
161. Wu JQ, Wang X, Beveridge NJ, Tooney PA, Scott RJ, Carr VJ, et al. Transcriptome sequencing revealed significant alteration of cortical promoter usage and splicing in schizophrenia. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e36351.
162. Rippey C, Walsh T, Gulsuner S, Brodsky M, Nord AS, Gasperini M, et al. Formation of chimeric genes by copy-number variation as a mutational mechanism in schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2013 Oct 3;93(4):697–710.
163. O'Brien TD, Jia P, Xia J, Saxena U, Jin H, Vuong H, et al. Inconsistency and features of single nucleotide variants detected in whole exome sequencing versus transcriptome sequencing: A case study in lung cancer. *Methods San Diego Calif*. 2015 Jul 15;83:118–27.
164. Roffman JL, Brohawn DG, Nitenson AZ, Macklin EA, Smoller JW, Goff DC. Genetic variation throughout the folate metabolic pathway influences negative symptom severity in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2013 Mar;39(2):330–8.
165. Satterthwaite TD, Wolf DH, Calkins ME, Vandekar SN, Erus G, Ruparel K, et al. Structural Brain Abnormalities in Youth With Psychosis Spectrum Symptoms. *JAMA Psychiatry*. 2016 Mar 16;
166. Nakamura K, Takahashi T, Nemoto K, Furuichi A, Nishiyama S, Nakamura Y, et al. Gray matter changes in subjects at high risk for developing psychosis and first-episode schizophrenia: a voxel-based structural MRI study. *Front Psychiatry*. 2013;4:16.
167. Metzler S, Dvorsky D, Wyss C, Müller M, Gerstenberg M, Traber-Walker N, et al. Changes in neurocognitive functioning during transition to manifest disease: comparison of individuals at risk for schizophrenic and bipolar affective psychoses. *Psychol Med*. 2015 Jul;45(10):2123–34.

168. Rees JN, Florang VR, Anderson DG, Doorn JA. Lipid peroxidation products inhibit dopamine catabolism yielding aberrant levels of a reactive intermediate. *Chem Res Toxicol.* 2007 Oct;20(10):1536–42.
169. Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011 Jan;35(3):804–17.
170. Plitman E, Nakajima S, de la Fuente-Sandoval C, Gerretsen P, Chakravarty MM, Kobylanski J, et al. Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: a review. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol.* 2014 Oct;24(10):1591–605.
171. Flatow J, Buckley P, Miller BJ. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2013 Sep 15;74(6):400–9.
172. Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015 Jan;18(1):89–95.
173. Fournier M, Ferrari C, Baumann PS, Polari A, Monin A, Bellier-Teichmann T, et al. Impaired metabolic reactivity to oxidative stress in early psychosis patients. *Schizophr Bull.* 2014 Sep;40(5):973–83.
174. Koga M, Serritella AV, Sawa A, Sedlak TW. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophr Res.* 2015 Nov 14;
175. Zuo D-Y, Wu Y-L, Yao W-X, Cao Y, Wu C-F, Tanaka M. Effect of MK-801 and ketamine on hydroxyl radical generation in the posterior cingulate and retrosplenial cortex of free-moving mice, as determined by in vivo microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 Jan;86(1):1–7.
176. Stojković T, Radonjić NV, Velimirović M, Jevtić G, Popović V, Doknić M, et al. Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012 Oct 1;39(1):192–9.
177. Jiang Z, Rompala GR, Zhang S, Cowell RM, Nakazawa K. Social isolation exacerbates schizophrenia-like phenotypes via oxidative stress in cortical interneurons. *Biol Psychiatry.* 2013 May 15;73(10):1024–34.
178. Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Krüger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, et al. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci.* 2000 Oct;12(10):3721–8.
179. Masliah E, Dumaop W, Galasko D, Desplats P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc.* 2013 Oct 1;8(10):1030–8.
180. Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, et al. Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull.* 2015 Jun 8;

181. Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, et al. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 15;20(24):4786–96.
182. Han J, Sarkar A, Gage FH. MIR137: big impacts from small changes. *Nat Neurosci.* 2015 Jul;18(7):931–3.
183. Amminger GP, Schäfer MR, Klier CM, Slavik J-M, Holzer I, Holub M, et al. Decreased nervonic acid levels in erythrocyte membranes predict psychosis in help-seeking ultra-high-risk individuals. *Mol Psychiatry.* 2012 Dec;17(12):1150–2.
184. Baune B, Clark S, Schubert O, Rice S, Vijayakumar N, Schaefer M, et al. Oxidative Markers for Prediction of Transition to Psychosis From the Clinical High-risk State. *Eur Psychiatry.* 2015 Mar 28;30:916.
185. Smesny S, Milleit B, Schaefer MR, Hipler U-C, Milleit C, Wiegand C, et al. Effects of omega-3 PUFA on the vitamin E and glutathione antioxidant defense system in individuals at ultra-high risk of psychosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015 Oct;101:15–21.
186. Nordholm D, Poulsen HE, Hjorthøj C, Randers L, Nielsen MØ, Wulff S, et al. Systemic oxidative DNA and RNA damage are not increased during early phases of psychosis: A case control study. *Psychiatry Res.* 2016 Apr 30;241:201–6.
187. Jorgensen A, Broedbaek K, Fink-Jensen A, Knorr U, Greisen Soendergaard M, Henriksen T, et al. Increased systemic oxidatively generated DNA and RNA damage in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2013 Oct 30;209(3):417–23.
188. Seyednasrollah F, Laiho A, Elo LL. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Brief Bioinform.* 2015 Jan;16(1):59–70.
189. Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, Kim D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet.* 2015 Feb;16(2):85–97.
190. Kim Y, Xia K, Tao R, Giusti-Rodriguez P, Vladimirov V, van den Oord E, et al. A meta-analysis of gene expression quantitative trait loci in brain. *Transl Psychiatry.* 2014;4:e459.
191. Jaffe AE, Gao Y, Deep-Soboslay A, Tao R, Hyde TM, Weinberger DR, et al. Mapping DNA methylation across development, genotype and schizophrenia in the human frontal cortex. *Nat Neurosci.* 2016 Jan;19(1):40–7.
192. Hannon E, Spiers H, Viana J, Pidsley R, Burrage J, Murphy TM, et al. Methylation QTLs in the developing brain and their enrichment in schizophrenia risk loci. *Nat Neurosci.* 2016 Jan;19(1):48–54.
193. Van Eijk KR, de Jong S, Strengman E, Buizer-Voskamp JE, Kahn RS, Boks MP, et al. Identification of schizophrenia-associated loci by combining DNA methylation and gene expression data from whole blood. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2015 Aug;23(8):1106–10.
194. Castro-Vega LJ, Letouzé E, Burnichon N, Buffet A, Disderot P-H, Khalifa E, et al. Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nat Commun.* 2015;6:6044.

195. Fusar-Poli P, Cappucciati M, Rutigliano G, Schultze-Lutter F, Bonoldi I, Borgwardt S, et al. At risk or not at risk? A meta-analysis of the prognostic accuracy of psychometric interviews for psychosis prediction. *World Psychiatry Off J World Psychiatr Assoc WPA*. 2015 Oct;14(3):322–32.
196. Chan MK, Krebs M-O, Cox D, Guest PC, Yolken RH, Rahmoune H, et al. Development of a blood-based molecular biomarker test for identification of schizophrenia before disease onset. *Transl Psychiatry*. 2015;5:e601.
197. Szyf M. Epigenetics, a key for unlocking complex CNS disorders? Therapeutic implications. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 2015 May;25(5):682–702.
198. Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, et al. Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2010 Feb;67(2):146–54.
199. Amminger GP, Schäfer MR, Schlögelhofer M, Klier CM, McGorry PD. Longer-term outcome in the prevention of psychotic disorders by the Vienna omega-3 study. *Nat Commun*. 2015;6:7934.
200. Markulev C, McGorry PD, Nelson B, Yuen HP, Schaefer M, Yung AR, et al. NEURAPRO-E study protocol: a multicentre randomized controlled trial of omega-3 fatty acids and cognitive-behavioural case management for patients at ultra high risk of schizophrenia and other psychotic disorders. *Early Interv Psychiatry*. 2015 Aug 16;
201. Asevedo E, Cunha GR, Zugman A, Mansur RB, Brietzke E. N-acetylcysteine as a potentially useful medication to prevent conversion to schizophrenia in at-risk individuals. *revneuro*. 2012;23(4):353–62.
202. Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. Schizophrenia, “Just the Facts” 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: from the elephant to the mouse. *Schizophr Res*. 2011 Apr;127(1-3):3–13.
203. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. 2011 May;7(3):263–9.
204. Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, Kermarrec S, Cohen D, Bronsard G, et al. Gene × environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Front Psychiatry*. 2014;5:53.
205. Yee CM, Javitt DC, Miller GA. Replacing dsm categorical analyses with dimensional analyses in psychiatry research: The research domain criteria initiative. *JAMA Psychiatry*. 2015 Dec 1;72(12):1159–60.
206. Clementz BA, Sweeney JA, Hamm JP, Ivleva EI, Ethridge LE, Pearlson GD, et al. Identification of Distinct Psychosis Biotypes Using Brain-Based Biomarkers. *Am J Psychiatry*. 2015 Dec 7;appiajp201514091200.

207. Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, et al. Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature*. 2014 Nov 20;515(7527):414–8.
208. Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, et al. FOXP1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell*. 2015 Jul 16;162(2):375–90.
209. Tollefsbol T. *Handbook of Epigenetics* [Internet]. 1st ed. London (San Diego): Academic Press; 2010 [cited 2016 Mar 16]. 640. Available from: <http://store.elsevier.com/Handbook-of-Epigenetics/isbn-9780123757104/>
210. Morgan M, Anders S, Lawrence M, Aboyoun P, Pagès H, Gentleman R. ShortRead: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009 Oct 1;25(19):2607–8.
211. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013;14:R36.
212. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*. 2012 Mar;7(3):562–78.
213. Anders S, McCarthy DJ, Chen Y, Okoniewski M, Smyth GK, Huber W, et al. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc*. 2013 Sep;8(9):1765–86.
214. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2015 Jan 15;31(2):166–9.
215. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010 Jan 1;26(1):139–40.
216. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11(10):R106.

Annexes

Liste des items de la CAARMS

INDEX

	page
1. SYMPTÔMES POSITIFS	1
1.1 TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE	1
1.2 IDÉES NON-BIZARRES	3
1.3 ANOMALIES DE LA PERCEPTION	5
1.4 DISCOURS DÉSORGANISÉ	7
2. CHANGEMENT COGNITIF : ATTENTION / CONCENTRATION	9
2.1 CHANGEMENTS COGNITIFS SUBJECTIFS	9
2.2 CHANGEMENTS COGNITIFS OBJECTIFS	11
3. PERTURBATION ÉMOTIONNELLE	12
3.1 PERTURBATION ÉMOTIONNELLE SUBJECTIVE	12
3.2 ÉMOUSSEMENT DE L'AFFECT OBSERVÉ	14
3.3 AFFECT INAPPROPRIÉ OBSERVÉ	15
4. SYMPTÔMES NÉGATIFS	16
4.1 ALOGIE	16
4.2 AVOLITION / APATHIE	17
4.3 ANHÉDONIE	18
5. MODIFICATION DU COMPORTEMENT	19
5.1 ISOLEMENT SOCIAL	19
5.2 ALTÉRATION DU COMPORTEMENT	20
5.3 COMPORTEMENTS DÉSORGANISÉS, BIZARRES, STIGMATISANT	21
5.4 COMPORTEMENT AGRESSIF / DANGEREUX	22
6. CHANGEMENTS PHYSIQUES / MOTEURS	23
6.1 PLAINTES SUBJECTIVES D'ALTÉRATION DU FONCTIONNEMENT MOTEUR	23
6.2 CHANGEMENTS DANS LE FONCTIONNEMENT MOTEUR OBSERVÉ	24
6.3 PLAINTES SUBJECTIVES D'ALTÉRATION DES SENSATIONS CORPORELLES	25
6.4 PLAINTES SUBJECTIVES D'ALTÉRATION DES FONCTIONS VÉGÉTATIVES	26
7. PSYCHOPATHOLOGIE GÉNÉRALE	27
7.1 MANIE	27
7.2 DÉPRESSION	29
7.3 INTENTION SUICIDAIRE ET AUTOMUTILATION	31
7.4 LABILITÉ DE L'HUMEUR	32
7.5 ANXIÉTÉ	33
7.6 TROUBLES OBSESSIONNELS ET COMPULSIFS (TOC)	34
7.7 SYMPTÔMES DISSOCIATIFS	35
7.8 DIMINUTION DE LA TOLÉRANCE AU STRESS HABITUEL	36
8. CRITERES D'INCLUSION	37
9. SEUIL DE PSYCHOSE	38
10. EXCLUSION DE L'ETUDE	38

Critères diagnostiques à la CAARMS

8 : CRITÈRES D'INCLUSION**CHECKLIST DES CRITÈRES D'INCLUSION****GROUPE 1 : GROUPE DE VULNÉRABILITÉ**

Ce critère identifie des jeunes sujets à risque de psychose à cause de l'association d'un facteur de risque "trait" et d'une détérioration significative de l'état mental ou du fonctionnement.

	OUI	NON
<ul style="list-style-type: none"> Histoire familiale de psychose chez des parents du premier degré OU Personnalité Schizotypique du sujet 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
<ul style="list-style-type: none"> Chute de plus de 30 % du score de la SOFAS par rapport au niveau prémorbide, avérée pendant un mois qui s'est produite durant les 12 derniers mois OU un score de la SOFAS inférieur ou égal à 50 pendant au moins les 12 derniers mois 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CRITÈRE POUR LE GROUPE 1 - Groupe de Vulnérabilité	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

GROUPE 2 : GROUPE PSYCHOSE ATTÉNUÉE

Ce critère identifie des jeunes sujets à risque de psychose à cause d'un syndrome psychotique infraliminaire. C'est à dire qu'ils présentent des symptômes qui n'atteignent pas le seuil fixé pour la psychose à cause d'une intensité inférieure au seuil (les symptômes ne sont pas assez sévères) ou ils présentent des symptômes psychotiques mais avec une fréquence inférieure au seuil (les symptômes ne se manifestent pas assez souvent).

	OUI	NON
2a) Intensité infraliminaire		
<ul style="list-style-type: none"> Score de la sévérité de 3-5 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, 3-5 pour les IDÉES NON-BIZARRES, 3-4 pour les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou 4-5 pour le DISCOURS DÉSORGANISÉ 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
<ul style="list-style-type: none"> Score de la fréquence de 3-6 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, les IDÉES NON-BIZARRES, les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou le DISCOURS DÉSORGANISÉ pendant au moins 1 semaine OU Score de la fréquence de 2 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, les IDÉES NON-BIZARRES, les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou le DISCOURS DÉSORGANISÉ pendant plus de 2 occasions (éprouvées au moins 4 fois en tout). 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2b) Fréquence infraliminaire		
<ul style="list-style-type: none"> Score de la sévérité de 6 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, 6 pour les IDÉES NON-BIZARRES, 5-6 pour les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou 6 pour le DISCOURS DÉSORGANISÉ 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
<ul style="list-style-type: none"> Score de la fréquence de 3 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, les IDÉES NON-BIZARRES, les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou le DISCOURS DÉSORGANISÉ 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS (pour les 2 catégories)		
<ul style="list-style-type: none"> Symptômes présents pendant l'année précédente 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS (pour les 2 catégories)		
<ul style="list-style-type: none"> Chute de plus de 30 % du score de la SOFAS par rapport au niveau prémorbide, avérée pendant un mois qui s'est produite durant les 12 derniers mois OU un score de la SOFAS inférieur ou égal à 50 pendant au moins les 12 derniers mois 	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CRITÈRE POUR LE GROUPE 2 - Groupe de Psychose Atténuée	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

GROUPE 3 : GROUPE BLIPS

(Brief, Limited or Intermittent Psychotic Symptoms / Symptômes Psychotiques Brefs, Limités ou Intermittents)

Ce critère identifie des jeunes sujets à risque de psychose à cause d'une histoire récente de symptômes psychotiques francs qui ont disparu spontanément (sans médicaments antipsychotiques) en moins d'une semaine.

	OUI	NON
• Score de la sévérité de 6 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, 6 pour les IDÉES NON-BIZARRES, 5-6 pour les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou 6 pour le DISCOURS DÉSORGANISÉ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
• Score de la fréquence de 4-6 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, les IDÉES NON-BIZARRES, les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou le DISCOURS DÉSORGANISÉ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
• Chaque épisode symptomatique est présent pendant moins d'une semaine et les symptômes disparaissent spontanément à chaque fois	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
• Symptômes présents pendant l'année précédente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
• Chute de plus de 30 % du score de la SOFAS par rapport au niveau prémorbide, avérée pendant un mois qui s'est produite durant les 12 derniers mois OU un score de la SOFAS inférieur ou égal à 50 pendant au moins les 12 derniers mois	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CRITÈRE POUR LE GROUPE 3 - Groupe BLIPS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

9 : SEUIL DE PSYCHOSE / SEUIL DE TRAITEMENT ANTIPSYCHOTIQUE

	OUI	NON
• Score de la sévérité de 6 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, 6 pour les IDÉES NON-BIZARRES, 5-6 pour les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou 6 pour le DISCOURS DÉSORGANISÉ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
• Score de la fréquence de 4-6 pour les TROUBLES DU CONTENU DE LA PENSÉE, les IDÉES NON-BIZARRES, les ANOMALIES DE LA PERCEPTION ou le DISCOURS DÉSORGANISÉ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLUS		
• Les symptômes sont présents pendant plus d'une semaine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CRITÈRE POUR LE SEUIL DE PSYCHOSE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

10 : SEUIL DE RETRAIT DE L'ÉTUDE (LEVÉE DE L'AVEUGLE)

	OUI	NON
• Score de la sévérité de 5 ou plus pour les COMPORTEMENT AGRESSIF / DANGEREUX ou INTENTION SUICIDAIRE ET AUTOMUTILATION	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• NOTE : Ceci doit être considéré indépendamment du degré de psychose		
CRITÈRE DE RETRAIT DE L'ÉTUDE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Protocole d'extraction d'ADN

Inspiré de Wizzard[®] génomic DNA purification kit - Protocole B : Isolating genomic DNA from whole blood (10 mL sample) et adapté pour des échantillons de 3 mL

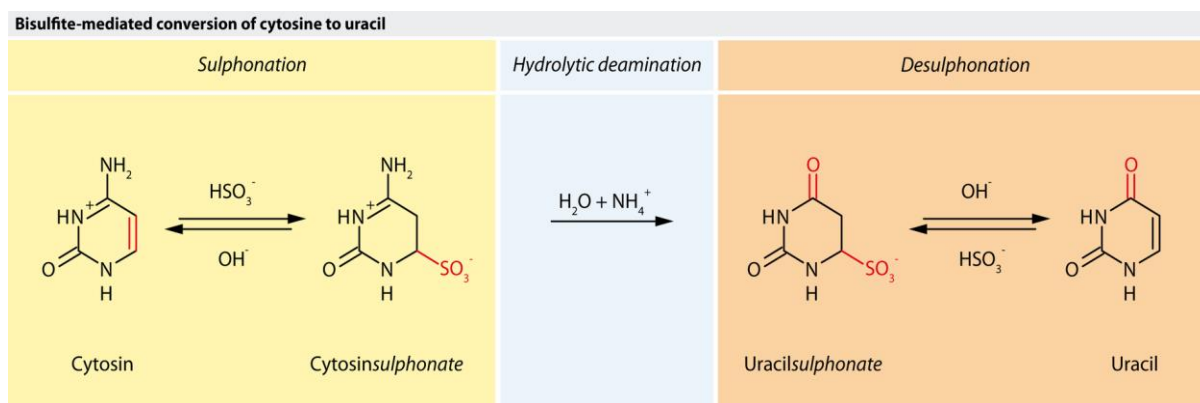
1. Homogénéiser doucement l'échantillon de sang total par retournements.
2. Dans un tube de 15 mL, mélanger la totalité de l'échantillon et 9 mL de Cell Lysis Solution.
3. Agiter doucement par retournements (5-6 fois)
4. Incuber 10 min à température ambiante. Retourner 2-3 fois le tube pendant l'incubation.
5. Centrifuger 10 min à 2000G, à température ambiante.
6. Retirer le surnageant avec précaution, et sans aspirer le culot blanc. (Reste ~50-100 µL)
 - a. Si le sang a été congelé, répéter les points 2 à 6.
 - b. Quelques cellules ou débris cellulaires peuvent rester pris dans le culot de globules blancs. Dans ce cas, répéter les points 2 à 6.
7. Agiter vigoureusement (vortex), jusqu'à resuspension complète des globules blancs (environ 10-15 secondes).
8. Ajouter 3 mL de Nuclei Lysis Solution et homogénéiser par des allers-retours de pipette (5-6 fois).
 - a. Si des caillots restent présents, incuber 1h00 à 37°C.
 - b. Si des caillots sont toujours présents, après incubation de 1h00 à 37°C, ajouter 1 mL de Nuclei Lysis Solution et incuber de nouveau 1h00 à 37°C.
9. Ajouter 1 mL (ou 1.3 mL, si il y a eu ajout de Nuclei Lysis Solution au point 8.b) de Protein Precipitation Solution et vortexer pendant 10-20 secondes.
10. Centrifuger 10 minutes à 2000G, à température ambiante.
11. Récupérer le surnageant, et le transférer dans un nouveau tube de 15 mL. Ajouter 3 mL d'isopropanol (température ambiante)
12. Agiter doucement, par retournements, jusqu'à la formation d'un précipité blanc
13. Centrifuger 1 minute à 2000 G, à température ambiante. L'ADN sera dans le culot.
14. Retirer le surnageant, avec précaution, par retournement
15. Ajouter 10 mL d'éthanol à 70 % à température ambiante, et agiter doucement par retournements, et centrifuger 1' à 2000 G, à température ambiante. L'ADN sera dans le culot.
16. Aspirer, avec précaution, l'éthanol. A ce moment, le culot est très lâche, et le pipetage doit être le plus précautionneux pour éviter d'aspirer le culot.
17. Laisser le culot sécher à l'air libre pendant 10-15 mn.
18. Ajouter 250 µL de DNA Rehydratation Solution.
19. Laisser resuspendre une nuit à 4°C.

Protocole de pyroséquençage

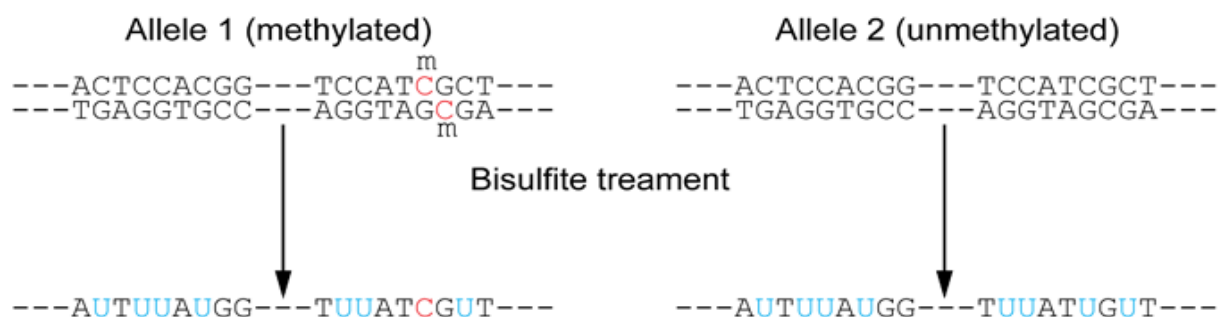
Les mêmes échantillons que ceux utilisés dans la puce de méthylation ont été sélectionnés avec un contrôle qualité par spectrophotométrie UV (Nanodrop SD-1000). Le rapport d'absorbance A260/A280 détermine la pureté de notre extraction car il rapporte la concentration détectée à 260 nm (zone d'absorbance des acides nucléiques) à la concentration détectée à 280 nm (zone d'absorbance des protéines). Le rapport doit être compris entre 1,8 et

2 dans le cas d'une solution d'ADN purifiée. Si celui-ci est inférieur à 1,8, l'échantillon est probablement contaminé par des protéines. Si celui-ci est supérieur à 2, il est probablement contaminé par des ARN. Dans notre cas, la totalité de nos échantillons avaient un rapport satisfaisant : $(\frac{DO_{260}}{DO_{280}} = 1.85 \pm 0.03)$.

Le bisulfite est un produit chimique contenant l'anion bisulfite (HSO_3^- ou hydrogénosulfite). Ce composé est utilisé pour transformer les cytosines non méthylées en uracile au niveau de l'ADN (figure extraite de Tollefsbol T. 2011(209)).



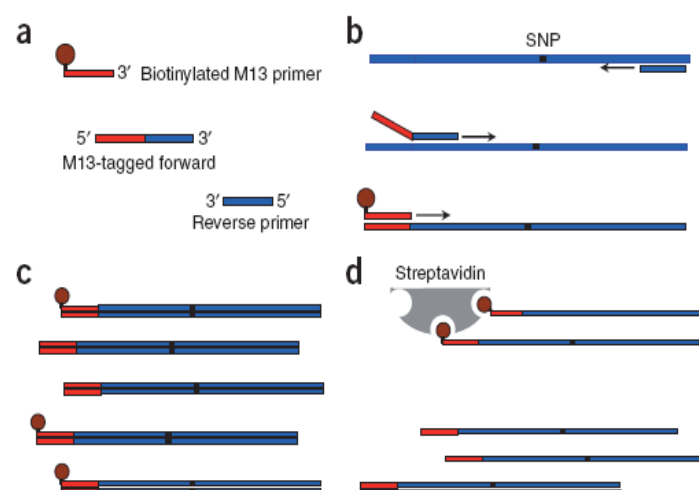
Les cytosines méthylées ne sont pas converties en uracile et restent des cytosines après traitement au bisulfite. Ainsi, le traitement au bisulfite va permettre d'étudier la méthylation de l'ADN par séquençage : si le résultat du séquençage est une cytosine, alors la cytosine initiale était méthylée ; en revanche, si la cytosine initiale était non méthylée, le résultat du séquençage sera une thymine (car les uraciles seront transformés en thymine lors d'une PCR intermédiaire).



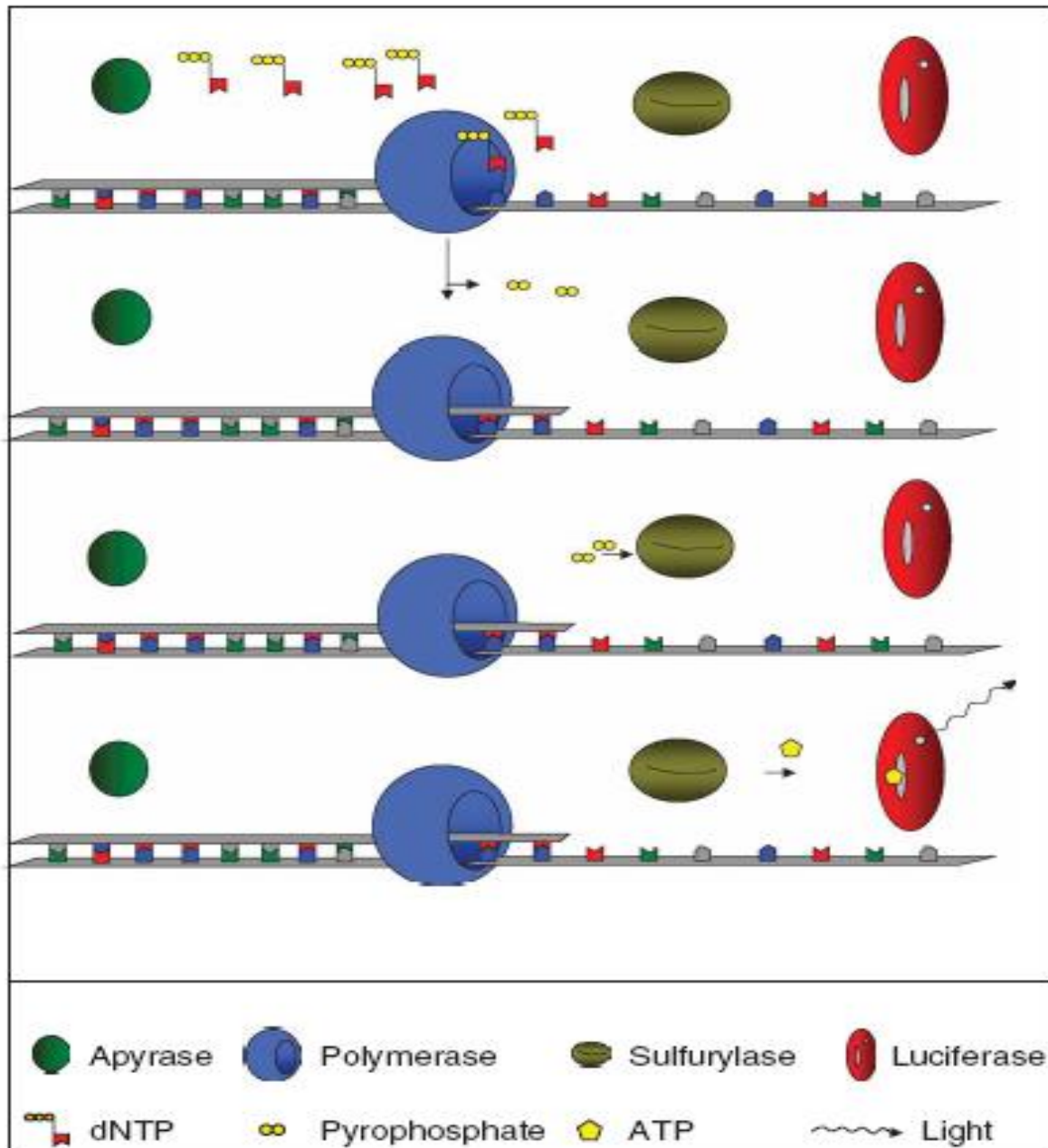
Le traitement au bisulfite des ADN dure environ 6 heures avec une succession de phases de dénaturation permettent de séparer et de bisulfiter les deux brins d'ADN. La qualité du traitement par bisulfite est contrôlée par réalisation d'une Polymérase Chain Reaction (PCR)

en utilisant un gène témoin (MAEL) et des amorces dessinées pour amplifier uniquement la séquence de ce gène après traitement au bisulfite (amorces bisulfite-spécifiques) suivie d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Nos amorces bisulfite-spécifiques ont permis d'amplifier le gène MAEL dans les échantillons traités au bisulfite ce qui permet de s'assurer que notre traitement au bisulfite a été efficace.

Pour les études de méthylation on distingue les PCR méthylation spécifiques et les PCR non méthylation spécifiques. Dans les PCR méthylation spécifiques, les amorces sont dessinées pour permettre uniquement l'amplification des brins contenant une cytosine après traitement au bisulfite. Dans les PCR non méthylation spécifiques, les amorces ne comportent pas de nucléotides ambigus donc ne recouvrent pas les CpG dont la méthylation peut varier. Dans notre étude des PCR non méthylation spécifiques ont été réalisées pour amplifier la séquences contenant les CpG d'intérêt à confirmer. Les amorces-test (amorces sans modification terminale) ont été dessinées à l'aide du logiciel MethPrimer. Une fois les amorces et les conditions de PCR mises au point pour chaque gène, des amplifications ont été réalisées avec une amorce reverse biotinylée en 5'. L'amorce forward utilisée est restée identique aux PCR précédentes. Les PCR avec amorces biotinylées permettent l'amplification de la région d'intérêt et de synthétiser des amplicons dont un brin se termine par la biotine. Ce brin va être récupéré à l'aide de billes de streptavidine qui fixent la biotine. La biotine est une vitamine hydrosoluble qui se lie à la streptavidine (protéine bactérienne), par une liaison de haute affinité et de grande spécificité. Les produits post-PCR sont mélangés avec les billes de streptavidine et mis à agiter pendant 10 minutes à température ambiante.

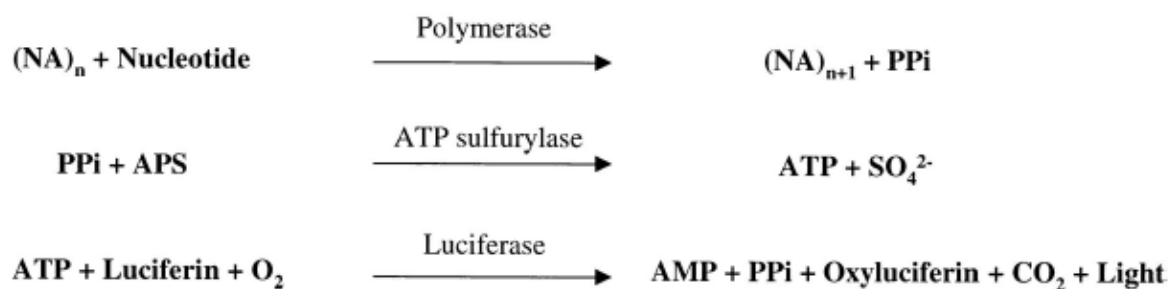


Ensuite, le brin d'ADN amplifié accroché par la biotine aux billes de streptavidine est récupéré puis déposé sur une plaque contenant une solution d'hybridation et une amorce de séquençage. La plaque est ensuite placée dans la machine de pyroséquençage (*PyroMark Q24* - Qiagen®). Cette machine comporte un capteur de lumière et un emplacement pour disposer les réactifs qui seront ajoutés séquentiellement : enzymes, substrat et chacun des dNTP.



Les désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) sont ajoutés les uns à la suite des autres selon une séquence programmable. Si le dNTP ajouté correspond au dNTP attendu, celui-ci est incorporé dans le brin en cours de synthèse et un pyrophosphate inorganique (PPi) est libéré.

Ce PPI va permettre à la sulfurylase de fabriquer de l'ATP qui sera utilisé par la luciférase pour émettre un signal lumineux proportionnel à la quantité d'ATP (voir la figure ci-dessous extraite de la thèse de Y. Loe-Mie (160)). La dégradation des nucléotides non incorporés est effectuée à chaque étape par l'apyrase.



PROTOCOLE

A) Traitement des ADN au bisulfite : (cf EpiTect Plus Bisulfite Conversion Handbook by Qiagen)

- 1) décongeler les ADN
- 2) dissoudre chaque aliquot de Bisulfite Mix dans 800µL d'eau RNase free (1 aliquot pour 8 réactions) et vortexer jusqu'à dissolution complète
- 3) préparer les réactions dans des tubes de PCR en mélangeant, dans cet ordre :

H2O	quantité pour 140 µL au total
1 µg ADN µL x []
Bisulfite Mix	85 µL
DNA protect buffer	35µL

4) vortexer les produits (changement de couleur vert -> bleu)

5) placer les tubes dans le thermocycleur

Dénaturation	5 min	95°C
Incubation	25 min	60°C
Dénaturation	5 min	95°C
Incubation	85 min	60°C
Dénaturation	5 min	95°C
Incubation	175 min	60°C
Maintien		20°C

6) Centrifuger les tubes puis transférer l'ensemble du contenu dans un tube de 1.5 mL

7) Ajouter 310 µL de Buffer BL (ajouter du Carrier RNA si quantité d'ADN < 100ng) puis vortexer et centrifuger

8) Ajouter 250 µL d'éthanol 100% puis vortexer 15 s et centrifuger

9) Transférer l'ensemble du contenu d'un tube dans 1 spin colonne

10) Centrifuger la spin colonne à la vitesse maximale pendant 1 min

11) Eliminer le filtrat

12) Ajouter 500 µL de Buffer BW

13) Centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min

14) Eliminer le filtrat

15) Ajouter 500 µL de Buffer BD (ne pas transférer de précipité et fermer immédiatement la bouteille)

- 16) Incuber 15 min à température ambiante
- 17) Centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min
- 18) Eliminer le filtrat
- 19) Ajouter 500 µL de Buffer BW, centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min et éliminer le filtrat
- 20) Répéter l'étape 19
- 21) Ajouter 250 µL d'éthanol, centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min et éliminer le filtrat
- 22) Placer la colonne dans un tube de 2 mL et centrifuger à la vitesse maximale pendant 1 min
- 23) Placer la colonne dans un tube de 1.5 mL et ajouter le Buffer EB (15 µL à adapter selon la concentration finale voulue, en restant >10 µL)
- 24) Incuber la colonne 1 min à température ambiante
- 25) Centrifuger 1 min à 15 000 g (12 000 rpm) et récupérer l'ADN dans le nouveau tube.
- 26) Doser l'ADN au spectrophotomètre

B) PCR contrôle : (cf Platinum Taq DNA Polymerase)

- 27) Préparer les réactifs pour les PCR contrôles

PCR Buffer (sans Mg) 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 50 mM	0.75 µL
dNTP mix 10 mM	0.5 µL
(chaque dNTP doit avoir une concentration finale de 0.2mM)	
primer forward 10 µM	0.5 µL
primer reverse 10 µM	0.5 µL
ADN	50 ng
Taq	0.1 µL
H ₂ O	to 25 µL

Les primers du gène MAEL servent de contrôle positif pour vérifier le traitement au bisulfite. Les PCR contrôles sont réalisées sur de l'eau (témoin négatif), de l'ADN non bisulfité et le même échantillon d'ADN bisulfité

28) Cycle PCR	Dénaturation	5 min	95°C
	Dénaturation	30 sec	95°C
	Hybridation	30 sec	57°C
	(température dépendante du couple de primers)		
	Elongation	30 sec	72°C
	Fin des cycles	10 sec	72°C
	Maintien		4°C

29) Préparer un gel d'agarose 2% (4g d'agarose dans 200 mL de TBE) et ajouter 20 µL de BET
Attention le BET est un composé hautement cancérigène : à manipuler avec précaution et des gants, jeter les objets contaminés dans la poubelle dédiée.

- 30) Charger 5 µL du produit PCR et 3 µL de bleu de méthylène dans les puits du gel
- 31) Faire migrer 30 min à 100 V dans une cuve d'électrophorèse remplie de TBE
- 32) Sortir le gel de la cuve et le déposer sur la plaque du Chemidoc
- 33) Allumer la lumière de la caméra, régler le curseur sur « UV/White »
- 34) Ouvrir le logiciel Quanti
- 34) Prendre une image du gel en mode EpiWhite pour vérifier son positionnement et régler le focus
- 35) Prendre une image du gel en mode TransUV pour faire apparaître l'ADN marqué par le BET
Une seule bande doit apparaître, correspondant à la séquence d'ADN amplifiée, uniquement pour les échantillons bisulfités

C) PCR pour le test des amorces :

Des PCR dans les mêmes conditions qu'à l'étape 27 et 28 sont réalisées avec des primers correspondant au gène d'intérêt. La température d'hybridation est à ajuster en fonction du couple de primer choisi.

Pour les amorces de CHL1 : température d'hybridation optimale = 55°C

L'efficacité de la PCR est vérifiée par électrophorèse sur gel en suivant les étapes 29 à 35.

D) PCR avec amorces biotinylées :

L'amorce reverse doit être biotinylée à l'extrémité 5'. Les PCR sont réalisées selon le même protocole et dans les mêmes conditions que pour le test des amorces.

E) Récupération du brin biotinylé par les billes de streptavidine:

36) Mélanger la solution contenant les billes de streptavidine par retournement (éviter toute sédimentation).

37) Dans chaque tube contenant les produits post-PCR biotinylés, rajouter xxx de buffer xxx et xxx de la solution contenant les billes de streptavidine.

38) Mettre les tubes à agiter à température ambiante pendant 10 min à 1 400 rpm

39) Préparer les différents bains dans les bacs du xxx

40) Brancher l'aspiration et mettre l'appareil manuel sur On

41) Aspirer le contenu de l'ensemble du tube post PCR avec l'appareil manuel

42) Placer l'appareil manuel dans le 1er bain contenant l'éthanol 70% pendant 30s

43) Placer l'appareil manuel dans le 2e bain contenant le Denaturation Buffer pendant 30s

44) Placer l'appareil manuel dans le 3e bain contenant le Wash Buffer pendant 30s

45) Laisser sécher l'appareil manuel à la verticale pendant quelques secondes

46) placer l'appareil manuel au dessus des puits d'une nouvelle plaque transparente contenant 25 μ L d'Annealing Buffer et le primer de séquençage (à une concentration 0,3 μ M)

47) Appuyer sur Off et secouer légèrement l'appareil manuel dans la solution pour faire tomber les brins d'ADN contenant la biotine

48) Rincer l'appareil manuel dans 2 bains contenant de l'eau

49) Placer la plaque transparente dans un bain à sec à 80°C pendant 2 min puis laisser refroidir pendant 5 min minimum

F) Pyroséquençage avec le PyroMark Q24 :

50) créer le programme de pyroséquençage à partir du logiciel en entrant la séquence à étudier, la CpG d'intérêt et la séquence du primer de séquençage

Tools > new Assay > entrer la séquence à étudier et la CpG d'intérêt > Save As « X »

Tools > new Run > Glisser « X » sur chaque position du run > sélectionner méthode 0012 > Save As

51) récupérer le programme créé sur clef USB

52) préparer la cartouche contenant les enzymes, le substrat et les dNTP selon les instructions du programme et l'introduire dans le PyroMark

53) introduire la plaque transparente dans le PyroMark

54) fermer le PyroMark et introduire la clef dans le port USB

55) sélectionner Run puis le programme désiré

56) le séquençage démarre et dure environ 1h

57) récupérer les données sur la clef USB et les transférer dans le logiciel ; cliquer sur Full Report et récupérer le rapport pdf

Protocole de séquençage ARN

Les individus ont été sélectionnés sur la base des critères cliniques. Les dossiers ICAAR ont été systématiquement investigués et les diagnostics ont fait l'objet d'une validation consensuelle. Les contrôles ont été sélectionnés à partir des sujets masculins déjà présents sur la puce de méthylation. Les critères cliniques retenus ont été les suivants : sujet NUHR restant NUHR à la fin du suivi ; cette sélection a fourni 6 sujets. Les cas correspondaient à des sujets UHR identifiés comme transiteurs à la fin du suivi, ayant eu un retest clinique et biologique et dont la transition psychotique a été effectuée au cours du suivi avec des prélèvements (PAX gene) encadrant la transition. Douze sujets (11 masculins et 1 féminin) ont été retenus, indifférentiellement d'une évolution vers la schizophrénie ou vers une manie délirante. Une analyse des facteurs de confusion a été réalisée au moment de la sélection des individus. Les analyses n'ont révélé aucune différence significative sur l'âge des individus ($p=0,11$), la durée de suivi ($p=0,89$), la consommation de cannabis initiale ($p=0,62$) et finale ($p=0,80$), la consommation de tabac initiale ($p=0,91$) et finale ($p=0,40$) ou la modification des traitements au cours du suivi ($p=0,08$) ; en revanche il existait une différence significative sur les scores cliniques à MF (PANSS finale : $p=0,010$; BPRS finale : $p=0,011$, CGI finale : $p=0,006$) traduisant comme attendu la présence de symptômes psychotiques chez les patients ayant transité et leur absence chez les NUHR.

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à partir de tubes PAXgene de sang total selon une technique automatisée de type QIAcube de QIAGEN avec le kit PAXgene Blood RNA. Le contrôle qualité a été réalisé par Bioanalyzer. Seuls les ARN présentant un RIN > 7 (RNA Integrity Number) et une concentration d'au moins 30 ng/ μ l ont été retenus pour la suite du protocole. Au final, trente échantillons (15 à M0 – 15 à MF) ont été utilisés pour l'analyse RNAseq (RIN moyen = $8,36 \pm 0,44$; concentration moyenne = $61,6 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 21,8$).

D'abord, des bibliothèques sont constituées selon le protocole TruSeq Stranded mRNA kit (Illumina). Les échantillons d'ARN (5 μ g) sont déplétés en ARN ribosomaux et seuls les ARN polyA sont conservés par mélange avec des billes magnétiques poly-T (purification des ARNm). Ceci permet d'enrichir l'échantillon en ARN messagers qui sont largement majoritaires parmi les ARN polyA : la fraction d'ARN ribosomaux passe de 98% pour un échantillon non traité à 5% après purification tandis que la proportion des autres ARN passe de 2% à 95%. Ces ARN polyA purifiés sont ensuite fragmentés en brins d'environ 400 pb. A l'étape suivante, les ARN sont transformés en ADN complémentaire double brin par rétrotranscription. Les étapes suivantes comprennent une réparation des extrémités des ADNc,

une phosphorylation de ces extrémités et une adénylation en 3'. Cette préparation des extrémités permet la ligation des adaptateurs. Les adaptateurs permettront à l'ADN complémentaire de se fixer sur la flowcell où aura lieu la pré-amplification puis le séquençage. Le séquençage est effectué directement au niveau de la flowcell par ajout de random primers et incorporation des 4 nucléotides différents présentant chacun une fluorescence différente. Ce séquençage par synthèse permet d'établir la séquence au niveau de chaque ADNc par lecture de la fluorescence émise. Dans notre étude le séquençage était paired-end ce qui permet de séquencer les 2 extrémités d'un acide nucléique, par opposition à single-end dont l'alignement serait moins fiable (figure fournie par le fournisseur Illumina).



Les données de fluorescence sont démultiplexées et transformées en fichiers fastq qui contiennent l'ensemble des séquences lues par le séquenceur Illumina HiSEQ 2000. Le logiciel d'analyse d'image et de Basecall est RTA1.12.4.2/HCS1.4.8

Nous avons réalisés deux types de contrôle qualité à partir des fichiers fastq. Le format texte fastq est issu du format fasta et contient donc des séquences biologiques associées à des scores de qualité de séquençage pour chaque position nucléotidique. Un contrôle qualité individuel sur chaque fichier (2 fichiers par échantillon) a été effectué à l'aide du logiciel FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Un contrôle qualité global a été réalisé avec le package R ShortRead (210).

La qualité était satisfaisante ; le score Phred était de 40 en moyenne, sans contamination par des séquences récurrentes, avec une distribution en GC correspondant à la distribution attendue. Trois échantillons ont été reséquencés car ils ne satisfaisaient pas aux critères de qualité fixés (< 80 millions de read). Dans la suite des analyses, ce sont les résultats de ce

deuxième séquençage qui ont été utilisées pour les échantillons concernés. Les deux groupes d'individus ne différaient pas sur la qualité du séquençage.

Les séquences des fichiers fastq ont été alignées sur le génome de référence (hg19) à l'aide du logiciel TopHat2 (211). Les fichiers output sont des fichiers BAM : les fichiers [Sample]_accepted_hits.bam sont des fichiers d'alignement standard et les fichiers [Sample]_unmapped.bam regroupent les séquences n'ayant pas pu être alignées. Le logiciel SAMtools permet d'ouvrir et de manipuler ces fichiers BAM. Il a été utilisé pour convertir ces fichiers BAM en fichiers SAM. Les deux groupes ne différaient pas sur le nombre de reads non alignés.

Les pipelines d'analyse de RNAseq reposent essentiellement sur deux approches. L'approche de normalisation par FPKM et l'approche par reads count. Ces deux approches semblent complémentaires sans argument pour une supériorité d'une d'entre elles (188). Nous avons donc décidé de réaliser les deux types d'analyses et de comparer les résultats.

L'analyse par FPKM a été menée à l'aide de la suite de logiciel Cufflinks (212). Cufflinks permet la détection, l'assemblage et le calcul du niveau d'expression des gènes et transcrits par échantillon. Le niveau d'expression doit être corrigé par la longueur d'un gène puisque plus un gène comporte de nucléotides plus la probabilité que son ARNm soit séquencé au cours du RNAseq est élevée. La normalisation par la longueur du gène permet d'établir l'expression en FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments) ; cette unité de mesure de l'abondance d'un transcrit est estimée par le nombre de fragments (read1 + read2 dans le cas du séquençage paired-end) assigné à un transcrit, divisée par la taille du transcrit et normalisée par le nombre total de reads alignés totaux. L'output de Cufflinks comporte les fichiers suivants : genes.fpkm_tracking (niveau d'expression estimé pour chaque gène en FPKM), isoforms.fpkm_tracking (niveau d'expression estimé pour chaque transcrit en FPKM) et transcripts.gtf (fichier d'annotation des transcrits assemblés). Le logiciel Cuffcompare permet l'annotation des transcrits, par comparaison à l'annotation de RefSeq. L'annotation se fait par l'intermédiaire d'un "class code".

Cuffmerge a été utilisé à partir de la plateforme Gene Pattern (www.genepattern.org/) pour établir une méta-table d'expression commune à l'ensemble des échantillons à partir du fichier de référence Homo_sapiens_hg19_UCSC.fa (obtenu sur le site UCSC) et des fichiers transcripts.gtf de chaque échantillon. Enfin, le logiciel Cuffdiff permet de rechercher des différences entre 2 groupes à partir des fichiers BAM, du génome de référence et de la méta-table. Le package R CummeRbund permet d'afficher graphiquement les résultats obtenus par Cuffdiff.

Class code

Priority	Code	Description
1	=	Complete match of intron chain
2	c	Contained
3	j	Potentially novel isoform (fragment): at least one splice junction is shared with reference transcript
4	e	Single exon transfrag overlapping a reference exon and at least 10 bp of a reference intron, indicating a possible pre-mRNA fragment.
5	i	A transfrag falling entirely within a reference intron
6	o	Generic exonic overlap with a reference transcript
7	p	Possible polymerase run-on fragment (within 2Kbases of a reference transcript)
8	r	Repeat. Currently determined by looking at the soft-masked reference sequence and applied to transcripts where at least 50% of the bases are lower case
9	u	Unknown, intergenic transcript
10	x	Exonic overlap with reference on the opposite strand
11	s	An intron of the transfrag overlaps a reference intron on the opposite strand (likely due to read mapping errors)
12	.	(.tracking file only, indicates multiple classifications)

La deuxième approche a été menée par read counts (213). Après conversion des fichiers BAM en SAM (annexe 2.20), une méta-table est créée à l'aide du logiciel HTSeq (annexe 2.21) (214). Cette méta-table permet de comparer le niveau d'expression entre les 2 groupes (UHR-P et NUHR) à M0 à l'aide de packages R. Le premier package utilisé a été edgeR (215). Le deuxième package a été DESeq (216).

Protocole des Q-PCR multiplex

Extraction des ARN et fabrication des ADN complémentaires

L'ensemble des ARN de la cohorte ICAAR ont été extraits selon la même technique que décrite au chapitre II.3.a. Les étapes suivantes ont été réalisées en partenariat avec la Plateforme Génomique / qPCR-HD de l'institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS - Paris)

Les ADNc ont été synthétisés avec des amers aléatoires et le Reverse Transcription Master Mix (Fluidigm) en utilisant un thermocycleur Nexus (Eppendorf). La concentration restait constante pour chaque échantillon : 100ng d'ARN total dans 25 µL de Tris-EDTA.

Réalisation des Q-PCR multiplex

1.25 µL de chaque échantillon a été pré-amplifié par 12 cycles de PCR avec la solution Fluidigm® PreAmp Master Mix. Après une nouvelle dilution, les PCR quantitatives ont été lancées en parallèle sur une puce Fluidigm (96 échantillons x 96 gènes) sur la plateforme BioMark™ HD System. Les sondes ont été dessinées selon la technologie TaqMan pour chaque gène d'intérêt. Les données ont été récupérées de manière automatique par le logiciel BioMark Real-Time PCR Analysis Software 4.0.1 (Fluidigm). Les données ont été normalisées à partir du niveau d'expression de la GAPDH et selon la méthode Livak. La méthode Livak est également appelée "Delta Delta CT" ($\Delta\Delta CT$) et repose sur le principe qu'un cycle de PCR double la quantité de matériel amplifié (efficacité de 100% de l'amplification), qu'il s'agisse d'un gène de référence ou d'un gène d'intérêt.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{échantillon contrôle}) - \Delta CT(\text{échantillon cas})$$

$$\text{avec } \Delta CT(\text{échantillon}) = CT(\text{gène étudié}) - CT(\text{gène de référence})$$

d'où

$$\Delta\Delta CT = (CT(\text{gène étudié chez les contrôles})$$

$$- CT(\text{gène de référence chez les contrôles}))$$

$$- (CT(\text{gène étudié chez les cas}) - CT(\text{gène de référence chez les cas}))$$

Le ratio d'expression du gène étudié dans l'échantillon des cas par rapport à l'échantillon des contrôles est donné par $2^{\Delta\Delta CT}$.

L'ENCÉPHALE

Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.em-consulte.com/produit/ENCEP

PSYCHIATRIE BIOLOGIQUE

Hypothèse épigénétique de la schizophrénie : revue de la littérature

Epigenetics of schizophrenia: A review

F. Rivollier^{a,b}, L. Lotersztajn^{a,b}, B. Chaumette^{a,b},
M.-O. Krebs^{a,b}, O. Kebir^{a,b,*}

^a Service hospitalo-universitaire, centre hospitalier Sainte-Anne, 1, rue Cabanis, 75014 Paris, France

^b Inserm U894, laboratoire « physiopathologie des maladies psychiatriques », université Paris Descartes, 2ter, rue d'Alésia, 75014 Paris, France

Reçu le 16 septembre 2013 ; accepté le 30 janvier 2014

MOTS CLÉS

Épigénétique ;
Schizophrénie ;
Facteurs de risque ;
Gène x
environnement ;
Méthylation ADN

KEYWORDS

Epigenetics;
Schizophrenia;
Risk-factors;

Résumé La schizophrénie est une maladie complexe qui semblerait résulter d'interactions entre gène et environnement. Cet article présente l'état des connaissances actuelles sur le rôle des mécanismes épigénétiques dans la schizophrénie. L'épigénétique est l'étude des changements de l'expression génique, secondaires à des mécanismes transmis par la mitose, mais réversibles, sans qu'il n'y ait de modification de la séquence d'ADN génomique sous-jacente. Ces changements pourraient être secondaires à un facteur environnemental. Ils sont le résultat notamment de la méthylation de l'ADN (au niveau de gènes impliqués dans le neurodéveloppement ou dans les voies de neurotransmission glutamatergique et GABAergique) ou de la modification des histones (au niveau de la signalisation GABAergique). Se pose cependant le problème de biais de réalisation des études et d'une absence de généralisation des résultats, les processus sous-tendant cette interaction restant mal connus. Ces facteurs de régulation épigénétique peuvent eux-mêmes être le siège d'une vulnérabilité génétique fragilisant la régulation épigénétique, en interaction ou non avec des facteurs d'environnement à risque.

© L'Encéphale, Paris, 2014.

Summary

Background. – Schizophrenia is a frequent and disabling disease associated with heterogeneous psychiatric phenotypes. It emerges during childhood, adolescence or young adulthood and has dramatic consequences for the affected individuals, causing considerable familial and social burden, as well as increasing health expenses. Although some progress has been made in the

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : oussama.kebir@inserm.fr (O. Kebir).

Gene x environment;
DNA methylation

understanding of their physiopathology, many questions remain unsolved, and the disease is still poorly understood. The prevailing hypothesis regarding psychotic disorders proposes that a combination of genetic and/or environmental factors, during critical periods of brain development increases the risk for these illnesses. Epigenetic regulations, such as DNA methylation, can mediate gene x environment interactions at the level of the genome and may provide a potential substrate to explain the variability in symptom severity and family heritability. Initially, epigenetics was used to design mitotic and meiotic changes in gene transcription that could not be attributed to genetic mutations. It referred later to changes in the epigenome not transmitted through the germline. Thus, epigenetics refers to a wide range of molecular mechanisms including DNA methylation of cytosine residues in CpG dinucleotides and post-translational histone modifications. These mechanisms alter the way the transcriptional factors bind the DNA, modulating its expression. Prenatal and postnatal environmental factors may affect these epigenetics factors, having responsibility in long-term DNA transcription, and influencing the development of psychiatric disorders.

Object. – The object of this review is to present the state of knowledge in epigenetics of schizophrenia, outlining the most recent findings in the matter.

Methods. – We did so using Pubmed, researching words such as ‘epigenetics’, ‘epigenetic’, ‘schizophrenia’, ‘psychosis’, ‘psychiatric’. This review summarizes evidences mostly for two epigenetic mechanisms: DNA methylation and post-translational histone modifications.

Results. – First, in terms of epidemiology and transmission, the theoretical model of epigenetics applies to schizophrenia. Then, most environmental factors that have proved a link with this disease, may generate epigenetic mechanisms. Next, mutations have been found in regions implied in epigenetic mechanism among populations with schizophrenia. Some epigenetic alterations in DNA regions have been previously linked with neurodevelopmental abnormalities. In psychosis, some authors have found methylation differences in COMT gene, in reelin gene and in some genes implicated in dopaminergic, serotonergic, GABAergic and glutamatergic pathways. Histone modifications have been described, in particular the H3L4 histone methylation. Finally, we tried to underline the difficulties in epigenetic research, notably in psychiatry, and the limits in this matter.

Conclusion. – The epigenetic field may explain a lot of questions around the physiopathology of the complex psychiatric disease that is schizophrenia. It may be a substratum to the prevailing hypothesis of gene x environment interaction. The research in the matter is definitely expanding. It justifies easily the need to improve the effort in the domain to overpass some limits inherent to the matter.

© L’Encéphale, Paris, 2014.

Introduction

La schizophrénie est une maladie complexe dont la compréhension physiopathologique reste très incomplète. Si son épidémiologie suggère la participation indéniable de facteurs génétiques, ceux-ci n’ont pu être précisément identifiés en dépit d’un effort de recherche important. En parallèle, des facteurs environnementaux paraissent également avoir un rôle dans l’apparition de la maladie. Un modèle actuel largement reconnu est celui d’une interaction gène x environnement, où une vulnérabilité génétique précipitée par un facteur environnemental révèle la maladie. Encore une fois, les processus sous-tendant cette interaction restent mal connus. La théorie épigénétique a été étudiée comme substratum moléculaire de ce mécanisme d’interaction gène x environnement notamment dans les pathologies psychiatriques [1]. Dans cette revue, nous présenterons un état synthétique des connaissances actuelles sur la théorie épigénétique de la schizophrénie.

Interactions gènes x environnement dans la schizophrénie

La participation de facteurs génétiques dans l’apparition des troubles schizophréniques paraît aujourd’hui reconnue. Les études d’adoption montrent que le risque de troubles schizophréniques est le même chez des enfants nés de mères atteintes qu’ils soient élevés par leurs mères biologiques ou adoptives [2]. Ces données confirment que le risque de schizophrénie est transmis biologiquement plutôt que par le contexte familial d’adoption. Les recherches se sont alors orientées vers la détermination des bases génétiques de cette transmission.

Les études de liaison cherchent à identifier des régions polymorphiques du génome se transmettant avec la maladie dans les familles dont un membre au moins est atteint. Elles permettent ainsi de localiser un gène responsable sur un locus spécifique. Elles sont particulièrement puissantes pour les maladies monogéniques. Une vingtaine d’études dites



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Revue de littérature

Stress et transition psychotique : revue de la littérature

Stress and psychotic transition: A literature review

B. Chaumette^{a,*,b,c}, O. Kebir^{a,b,c}, C. Mam Lam Fook^{a,b,c}, J. Bourgin^{a,b,c}, B.P. Godsil^{a,c},
R. Gaillard^{a,b,c}, T.M. Jay^{a,c}, M.-O. Krebs^{a,b,c}

^a Laboratoire « physiopathologie des maladies psychiatriques », centre de psychiatrie et neurosciences, université Paris Descartes, Inserm U894, 75014 Paris, France

^b Service hospitalo-universitaire-S14, faculté de médecine Paris Descartes, Sorbonne Paris cité, centre hospitalier Sainte-Anne, 75014 Paris, France

^c Institut de psychiatrie (GDR 3557), 75014 Paris France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 16 juillet 2015

Accepté le 26 octobre 2015

Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :

Schizophrénie

État mental à risque

Axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien

Cortisol

Ultra-high risk

Keywords:

Schizophrenia

Ultra-high risk subjects (UHR)

Hypothalamic-pituitary-adrenal axis

Cortisol

Psychotic transition

RÉSUMÉ

Le stress psychologique induit une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HHS) qui entraîne une perturbation de la physiologie cérébrale. Ces éléments biologiques ont conduit à promouvoir l'hypothèse selon laquelle le stress pourrait influencer l'émergence de pathologies psychiatriques et en particulier l'émergence de la schizophrénie (transition psychotique). Cette revue de la littérature vise à réaliser un état des lieux de la question du stress dans la psychose et des méthodes d'investigation notamment le dosage du cortisol. Le rôle de la dérégulation de l'axe HHS dans le déclenchement de la schizophrénie est discuté. Cette dérégulation pourrait être une cause spécifique de l'entrée dans la maladie ou refléter uniquement la détresse psychologique liée à l'émergence des symptômes. La revue s'est attachée à mettre en relief les études sur l'implication du stress à différentes phases de la maladie psychotique. La littérature met en évidence une dérégulation de l'axe HHS dans la schizophrénie suivant le modèle vulnérabilité-stress. Cette dérégulation, présente dès la phase prodromique (sujets à ultra-haut risque) et dès le premier épisode psychotique, pourrait favoriser le déclenchement de la pathologie. En effet, la dérégulation de l'axe HHS et donc de la réponse au stress semble associée à l'émergence de symptômes psychotiques. Toutefois, les mécanismes précis de l'implication du stress dans le déclenchement de la maladie sont encore mal connus et nécessitent de plus amples investigations, d'autant que de nombreux facteurs confondants modulent le taux de cortisol et la réponse au stress, y compris la consommation de cannabis ou la prise de traitements. En outre, la réactivité au stress semble être modulée par des facteurs génétiques. La découverte de facteurs biologiques associés à la transition psychotique pourrait apporter une aide diagnostique et pronostique ainsi que des cibles thérapeutiques.

© L'Encéphale, Paris, 2016.

ABSTRACT

Background. – Psychiatric disorders are consistent with the gene x environment model, and non-specific environmental factors such as childhood trauma, urbanity, and migration have been implicated. All of these factors have in common to dysregulate the biological pathways involved in response to stress. Stress is a well-known precipitating factor implicated in psychiatric disorders such as depression, bipolar disorder, anxiety, and possibly schizophrenia. More precisely, psychosocial stress induces dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and could modify neurotransmission, which raises the question of the involvement of stress-related biological changes in psychotic disorders. Indeed, the literature reveals dysregulation of the HPA axis in schizophrenia. This dysregulation seems to be present in the prodromal phases (UHR subjects for ultra-high risk) and early schizophrenia (FEP for first episode psychosis). Thus, and following the stress-vulnerability model, stress could act directly on psychotic onset and precipitate the transition of vulnerable subjects to a full-blown psychosis.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : boris.chaumette@inserm.fr (B. Chaumette).

Objective. – The present paper reviews the literature on stress and onset of schizophrenia, with consideration for the causal role vs. associated role of HPA axis dysregulation in schizophrenia and the factors that influence it, in particular during prodromal and earlier phases. We also discuss different methods developed to measure stress in humans.

Methodology. – We performed a bibliographic search using the keywords ‘cortisol’, ‘glucocorticoid’, ‘HPA’ with ‘UHR’, ‘CHR’, ‘at-risk mental state’, ‘first episode psychosis’, ‘schizotypal’, ‘prodromal schizophrenia’ in Medline, Web of Knowledge (WOS), and EBSCO completed by a screening of the references of the selected articles.

Results. – Stress has been studied for many years in schizophrenia, either by subjective methods (questionnaires), or objective methods (standardized experimental protocols) with biological sampling and/or brain imaging methods. These methods have suggested a link between dysregulation of the HPA axis and psychotic symptoms both through abnormal basal levels of cortisol and flattened reactivity to social stress. Imaging results suggest indirect modifications, including abnormal pituitary or hippocampal volume. Several factors dysregulating the HPA axis have also been highlighted, such as consumption of drugs (i.e. cannabis), childhood trauma or genetic factors (such as *COMT*, or *MTHFR* variants). Psychological stress induces subcortical dopaminergic activation attributable to hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysregulation. This dysregulation is present in the prodromal phase (UHR) in patients who have experienced a first psychotic episode (FEP) and in siblings of schizophrenic patients. Stress dysregulation is a plausible hypothesis to understand the psychosis onset.

Discussion. – The effect of stress on brain pathways could participate to the mechanisms underlying the onset of psychotic symptoms, both as a precipitating factor and as a marker of a predisposing vulnerability. This dysregulation fits into the gene x environment model: in subjects with genetic predispositions, stressful environmental factors can modify biological pathways implicated in psychiatric disorders, promoting the emergence of symptoms. However, many confounding factors obscure the literature, and further studies are needed in schizophrenic patients, UHR and FEP patients to clarify the precise role of stress in psychotic transition. Identification of stress biomarkers could help diagnosis and prognosis, and pave the way for specific care strategies based on stress-targeted therapies.

© L'Encéphale, Paris, 2016.

Introduction

Les hypothèses actuelles concernant la genèse des pathologies psychiatriques font appel au modèle « vulnérabilité-stress » [1]. Un individu, porteur d'une vulnérabilité, développe des symptômes ou reste indemne de toute pathologie en fonction des facteurs environnementaux auxquels il est exposé. Dans l'exemple de la schizophrénie, en dehors de quelques formes rares liées à des mutations, les études génétiques proposent de nombreux facteurs génétiques de vulnérabilité, qui pourraient interagir avec l'environnement. L'étude des facteurs environnementaux a révélé certains facteurs favorisant comme le cannabis mais également l'urbanité, l'isolement social et les abus sexuels dans l'enfance [2]. Tous ces éléments peuvent être considérés comme des facteurs de stress psychosocial. Enfin, des études suggèrent que le stress pourrait être à l'origine de l'apparition ou de l'exacerbation des symptômes de la schizophrénie [3].

Après un rappel sur le stress, sur le plan psychopathologique et neurobiologique et sur la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien, nous présenterons les résultats des marqueurs de stress au cours de la schizophrénie. Nous nous focaliserons sur les études réalisées chez les sujets présentant « des états mentaux à risque » (ou à ultra-haut risque de psychose ; UHR) ou un premier épisode psychotique (PEP). Enfin, nous discuterons le possible rôle de ces anomalies biologiques dans le déclenchement de la schizophrénie chez ces sujets « à risque » et les facteurs pouvant influencer ces anomalies.

Cortisol et régulation du stress : implications pour les pathologies psychiatriques

Nous nous restreindrons dans cette revue au stress psychosocial. Les événements de vie stressants regroupent les traumatismes dans l'enfance et des événements de vie ayant une valence positive (mariage...), négative (deuil...) ou variable (déménagement...).

Ils sont différents des événements liés à la pathologie. On distingue également le stress de la vie quotidienne (« tracas » correspondant à des « stresseurs » mineurs). Il est admis que ces éléments impliquent la participation du système nerveux autonome et de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HHS) (Fig. 1).

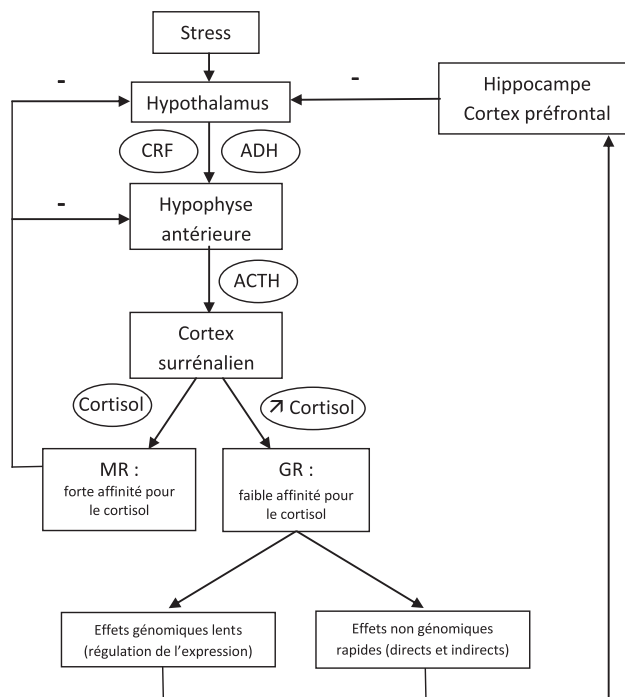


Fig. 1. Axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien. ACTH : hormone corticotrope ; ADH : hormone antidiurétique ; CRF : corticotropin-releasing hormone ; GR : récepteurs aux glucocorticoïdes ; MR : récepteurs aux minéralocorticoïdes ; - : rétrocontrôle négatif.



Family-based association study of common variants, rare mutation study and epistatic interaction detection in *HDAC* genes in schizophrenia



Oussama Kebir^{a,b,c}, Boris Chaumette^{a,b,c}, Mar Fatjó-Vilas^{d,e}, Amirthagowri Ambalavanan^f, Nicolas Ramoz^g, Lan Xiong^f, Fayçal Mouaffak^{b,c,h}, Bruno Millet^{b,c,i}, Nematollah Jaafari^{c,j,k,l}, Lynn E. DeLisi^m, Douglas Levinson^{c,n}, Ridha Joobor^o, Lourdes Fañanás^{d,e}, Guy Rouleau^{f,p}, Caroline Dubertret^{g,q}, Marie-Odile Krebs^{a,b,c,*}

^a Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine Paris Descartes, Service Hospitalo-Universitaire, Centre Hospitalier Sainte-Anne, Paris, France

^b INSERM, U894, Laboratory "Pathophysiology of Psychiatric Disorders", Centre of Psychiatry and Neurosciences, Paris, France

^c Institut de Psychiatrie-GDR 3557 de Psychiatrie, France

^d Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Centre for Biomedical Research Network on Mental Health (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^f Centre of Excellence in Neuromics of Université de Montréal, CHUM Research Center, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada

^g INSERM, U894, Team "Vulnerability of Psychiatric and Addictive Disorders", Centre of Psychiatry and Neurosciences, Paris, France

^h Service de Psychiatrie, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

ⁱ Pôle Hospitalo-Universitaire de Psychiatrie Adulte, CH Guillaume Rognier, Rennes, France

^j Unité de recherche clinique intersectorielle en psychiatrie du Centre Hospitalier Henri Laborit, Poitiers, France

^k INSERM CIC-P 1402, CHU de Poitiers, France

^l INSERM U 1084 Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Université de Poitiers, France

^m VA Boston Healthcare System, Harvard Medical School, Brockton, MA, USA

ⁿ Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

^o Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, Canada

^p Montreal Neurological Institute and Hospital, Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Canada

^q Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Louis Mourier, Psychiatry Department, Colombes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2014

Received in revised form 18 September 2014

Accepted 21 September 2014

Available online 18 October 2014

Keywords:

Epigenetics

Epistasis

Histone acetylation

Pedigree-based generalized multifactor dimensionality

Psychosis

Tag-SNP

ABSTRACT

Background: Histone deacetylases (HDACs) are key enzymes of histone acetylation, and abnormalities in histone modifications and in the level of HDAC proteins have been reported in schizophrenia. The objective of the present study was to systematically test the *HDAC* genes for its association with schizophrenia.

Methods: A family-based genetic association study (951 Caucasian subjects in 313 nuclear families) using 601 tag-single nucleotide polymorphisms in *HDAC* genes was conducted followed by a replication study of top-ranked markers in a sample of 1427 Caucasian subjects from 241 multiplex families and 176 trios. Epistasis interaction was tested by using the pedigree-based generalized multifactor dimensionality reduction (GMDR). Furthermore, we analyzed exome sequencing data of 1134 subjects for detection of rare mutations in *HDAC* genomic regions.

Results: In the exploratory study, ten markers were in significant association with schizophrenia ($P < 0.01$). One marker rs14251 (*HDAC3*) was replicated ($P = 0.04$) and remained significant in the whole sample ($P = 0.004$). GMDR identified that a significant three-locus interaction model was detected involving rs17265596 (*HDAC9*), rs7290710 (*HDAC10*) and rs7634112 (*HDAC11*) with a good testing accuracy (0.58). No rare mutations were found associated with schizophrenia.

Conclusion: This first exploratory systematic study of the *HDAC* genes provides consistent support for the involvement of the *HDAC3* gene in the etiology of schizophrenia. A statistical epistatic interaction between *HDAC9*, *HDAC10*, and *HDAC11* was detected and seems biologically plausible.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: INSERM, U894, Laboratory "Pathophysiology of Psychiatric Disorders", Centre of Psychiatry and Neurosciences, 2 ter rue d'Alésia, 75014 Paris, France. Tel.: +33 1 45658646; fax: +33 1 45658160.

E-mail address: marie-odile.krebs@inserm.fr (M.-O. Krebs).

1. Introduction

Schizophrenia is a complex neurodevelopmental disorder, influenced by both genetic and environmental factors. The characterization of these genetic predisposing factors has proven challenging (Gejman et al., 2010; Keshavan et al., 2008) partly because environmental factors modulate the penetrance of gene variants. Epidemiological, clinical, and

Résumé :

La psychose est un syndrome apparaissant progressivement à l'adolescence chez des individus à risque selon un processus dynamique appelé transition psychotique. Ces individus à risque sont repérables cliniquement mais les données biologiques actuelles sont insuffisantes pour expliquer l'apparition de la psychose. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à identifier les facteurs biologiques responsables de ce processus.

Les hypothèses permettant d'expliquer la transition psychotique privilégient l'interaction gène x environnement, sous-tendue par des mécanismes épigénétiques. Nous avons mené une étude des modifications de la méthylation de l'ADN et de la transcription à l'aide de techniques de biologie moléculaire et de bio-informatique à l'échelle pan-génomique. La transition psychotique semble être liée à des modifications de méthylation et de transcription de gènes impliqués dans des mécanismes comme le guidage axonal ou la régulation du stress oxydatif.

Ces modifications longitudinales pourraient refléter l'influence de l'environnement. Les facteurs environnementaux pourraient déréguler l'axe biologique du stress dès les phases précoces de la maladie, comme le suggère l'augmentation de la sécrétion de cortisol basal que nous avons montré chez les individus à risque.

En outre, il est probable que des spécificités au niveau des gènes et des processus régulant l'épigénome soient également impliquées dans cette réponse individuelle à l'environnement. Nous avons montré l'importance du métabolisme mono-carboné au moins dans un sous-groupe spécifique de patients.

Ces résultats doivent être répliqués et étendus dans d'autres paradigmes pour valider l'implication de ces processus dans la transition psychotique. En cas de confirmation, ces voies biologiques pourraient s'avérer être des pistes intéressantes pour développer des thérapies ciblées et relever le défi de la prévention de la psychose chez des individus à risque.

Mots clés : transition psychotique – émergence – schizophrénie – psychose – premier épisode psychotique – prodrome – état mental à risque