Etude de l'effet de mutations du gène SHANK3 dans les TSA à partir de neurones corticaux humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites

Laura Gouder

▶ **To cite this version:**

Laura Gouder. Etude de l'effet de mutations du gène SHANK3 dans les TSA à partir de neurones corticaux humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. Neurobiologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB089 . tel-02180584

HAL Id: tel-02180584

https://theses.hal.science/tel-02180584

Submitted on 11 Jul 2019

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.

Thèse pour l'obtention du grade de Docteur

De l'Université Paris Descartes
Ecole doctorale BioSPC

Laura Gouder

Etude de l'effet de mutations du gène *SHANK3* dans les TSA à partir de neurones corticaux humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites

Soutenue publiquement le 18 novembre 2016

Composition du Jury

Professeur Alain Trembleau	Président
Professeur Afsaneh Gaillard	Rapporteur
Professeur Jean-Louis Bessereau	Rapporteur
Docteur Caroline Nava	Examinateur
Docteur Isabelle Cloëz-Tayarani	Directrice de thèse
Professeur Thomas Bourgeron	Directeur de laboratoire

A ma mère,

« -Tu sais il se peut que l'on ne trouve jamais rien ?
-Soulever des pierres et ne rien trouver en dessous, c'est progresser.»

« Moi ce que je préfère de cette vie de rat de laboratoire, c'est que parfois, en de très rares occasions, on découvre réellement quelque chose. Quand on se couche le soir après avoir fait une découverte, on est la seule personne au monde à connaître cette vérité. »

I Origins

« Il ne faut pas croire que les autistes ont des stéréotypies et que les non-autistes n'en ont pas. Les stéréotypies des personnes non autistes passent simplement pour naturelles, sont mieux acceptées socialement. »

« Je me méfie des théories qui voudraient réduire l'être humain à un mécanisme d'horlogerie. Je crois que l'être humain est beaucoup plus composite, en mouvement. Ne l'enfermons pas, ne nous enfermons pas dans une case. Il nous en manquerait une. »

« Nous nous acheminons peu à peu vers la question qui hante la scolarité : si vous ne savez ni jouer au cerceau, ni nouer vos lacets, mais que vous vous passionnez pour le calcul différentiel, avez-vous les compétences pour passer en année supérieure de maternelle ? »

« L'observation m'en a été faite par plusieurs personnes : de toutes les sociétés, l'une des plus excluantes pour les jeunes autistes ayant des déficiences pourrait bien être la nôtre, l'occidentale. »

Je suis à l'est ! Josef Schovanec

« La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité. »

Louis Pasteur

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier les professeurs Afsaneh Gaillard et Jean-Louis Bessereau d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et d'avoir consacré de leur temps à cette lecture. Je remercie aussi le professeur Alain Trembleau d'avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse et le docteur Caroline Nava d'être examinateur. Je vous remercie de me faire l'honneur de votre présence.

Je remercie Thomas Bourgeron de m'avoir permis d'effectuer ma thèse sur un sujet et une méthode qui m'intéressaient réellement, ainsi que de m'avoir fait rencontrer une équipe composée de personnes « super » et qui m'ont aidé sur de nombreux aspects. Tu m'as ainsi permis de grandir scientifiquement et humainement.

Merci Isabelle pour ton aide au cours de cette thèse, sur la mise en place de nos axes de recherche, sur l'obtention du financement de quatrième année qui m'a donné la possibilité de mener à bien ce travail, sur les multiples relectures de cette longue thèse et pour m'avoir permis de me rendre à la SFN à Washington, ce qui fut un très bon souvenir et une belle découverte. Merci aussi de m'avoir soutenue et comprise sur des éléments difficiles de ce projet.

Hany, merci pour toute ton aide précieuse au cours de cette thèse, en particulier pour la culture cellulaire et les réflexions sur les Western-Blot. Merci aussi de m'avoir aidée dans l'encadrement des stagiaires que nous avons eu. Et merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton soutien dans les moments de doute. Je suis très heureuse d'avoir eu l'honneur de travailler avec toi. Cette thèse est aussi à toi.

Je remercie aussi tous particulièrement mes précieux collaborateurs Anne Danckaert et Jean-Yves Tinevez de la plateforme d'imagerie pour leur aide et le travail qu'ils ont réalisé au cours de ce projet. Merci pour votre contribution et de m'avoir formée à ces technologies. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Merci à Alexandra Benchoua et à Aurélie Poulet de m'avoir formée quelques semaines au sein de l'Institut I-Stem et de m'avoir fourni les lignées de NSC sans lesquelles ce projet n'aurait pu avoir lieu.

Francisco, thanks for your help for the elecrophysiology, for your patience, your explaination about something I didnt' know at all. Thanks for your kindness, I hope all the best for you.

David et Gabriel, merci pour vos contributions à mon projet de thèse, à la fois de façon matérielle mais aussi intellectuelle.

Thanks to Tobias Boeckers et Michael Schmeisser for your advice, your help, the very interesting meetings and particularly for the precious SHANK3 antibody !

Merci à Stéphanie pour les conversations furtives dans les couloirs et au coin café, et merci pour ton aide pour les lenti, qui comme tu peux le voir a permis une grande partie de ma thèse. Martine je te remercie aussi pour ta contribution à ce niveau.

Aline V. merci pour ton aide dans l'étude des épines et dans la relève des cultures cellulaires, et de m'avoir permis de m'assurer que ce n'était pas contre moi qu'elles en avaient mais que ce sont juste globalement des enquiquineuses. Bon courage pour la suite, si tu as besoin d'aide, de renseignements et de conseils tout au long de ta thèse, n'hésite pas.

Eka, j'ai beaucoup apprécié t'avoir en stage avec nous et de t'avoir côtoyée chaque jour. Merci pour ton aide pour les Western-Blot qui a été précieuse ! Bonne continuation pour la suite, et n'hésite pas à faire appel à moi si besoin.

Helena, tu as été une stagiaire parfaite ! J'ai vraiment apprécié ta présence et le travail que tu as effectué, ainsi que tous ces repas avec Nath à parler de tout et de rien ! Nos conversations scientifiques furent très intéressantes, mais j'ai aussi apprécié nos échanges d'idées sur la vie, et ces moments de rigolade qu'on a eu (avouons le souvent causé par Nath et Jean). Je sais que tu vas très bien t'en sortir très bien, tu as un esprit scientifique aiguisé, je n'ai aucun doute sur ton avenir !

Amandine, tu as été la première stagiaire que j'ai eu au cours de ce projet. Ton aide a été précieuse dans ces premières avancées et j'espère qu'on a pu t'apporter autant que ce que tu nous as apporté.

Nath, ralala, j'aurais pu écrire une thèse sur toi ! Mais je vais essayer de me limiter ! Tu as été là pour les moments difficiles au cours de cette thèse, les coups de mou, les agacements, les envies d'abandon, mais aussi hors labo ; mais surtout je me rappellerai de tous ces débats, recherches d'information, échanges littéraires, désaccord sur l'intérêt des poissons des abysses, interrogations grammaticales, discussions sur les rapports humains et ces nombreux fous rires partagés pendant ces 4 ans et quelques ! Je te souhaite de ne pas trop déprimer de mon départ ;-)

Alex, merci pour ton écoute et ton soutien au cours de cette thèse, tu as été d'une aide précieuse ! Et n'oublie pas, je t'ai à l'œil !!

Marion, commençons par l'aspect professionnel, merci pour ton aide sur les RNA, et aussi pour ton soutien tout au cours de la thèse et des difficultés qui l'ont parfois accompagnée. Et plus personnellement, merci pour tes qualités d'écoute et de présence, tu sais avoir les bons mots pour rassurer et encourager, tu m'as beaucoup aidée pendant la thèse ! Et puis je garde en mémoire nos souvenirs de colocataires à la retraite départementale et à Bordeaux qui sont assez mémorables ;-) Bon courage à toi pour la fin de thèse jumelle de labo !

Co, on peut dire que la science permet au moins à des gens qui ne se seraient probablement pas rencontré d'avoir la chance de le faire, quoique maintenant on pourrait se croiser au Bon Marché. Merci pour ton soutien durant la thèse et bon courage à toi pour la suite de la tienne, sans moi mais je ne suis pas loin.

Ophélie, déjà je te souhaite une belle fin de thèse. Et puis merci aussi pour ta présence et ton soutien au cours de cette thèse. Merci aussi pour ces quelques conversations au coin café ou à la cafet un peu délurées, promis je ne te parlerai plus de poisson et de permis de conduire ;-) Plein de courage à toi pour la suite.

Thibeault, mon cher collègue Shank3, en toute honnêteté je pense que c'est toi qui va me remercier car dans mon intro il y a une bonne base pour faire le tienne ! Je suis ravie d'avoir partagé ton bureau quelques mois (semaines ? je ne sais plus l ;-)). Merci aussi pour ton soutien mental durant ces dernières années, et aussi pour tous ces carrés de chocolat qui m'a valu une addiction au Lindt fleur de sel. Bon courage pour la suite, mais je ne m'en fais pas.

Aline, je te remercie pour ton soutien, ton écoute et ta compréhension. Merci aussi pour les livraisons de thèse et ton aide d'après thèse ☺

Richard, merci d'avoir beaucoup contribué à la possibilité de mon projet et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Nous n'avons pas forcément énormément travaillé ensemble mais les quelques interactions que nous avons eues étaient très constructives. Merci pour ton professionnalisme, ta sympathie et ton humour. Le jour où tu te mettras comme ton frère et moi à faire de la course à pied, n'hésite pas à me demander des conseils pour ton premier marathon ;-)

Fred, on ne se croisait que le mercredi, mais j'ai beaucoup ri avec toi, et au cours d'une thèse le rire c'est important. Merci pour ton énergie, ta joie de vivre et ta sympathie.

Jean-Pierre, je me rappelle très bien de la première fois que l'on s'est parlé, pour discuter synapses, ce fut le début d'un certain nombre de conversations très intéressantes. Tu es un passionné comme on en voit peu et c'est très inspirant. Ta passion scientifique n'empiète pas sur ton humanisme, tu as su m'encourager tout au cours de ma thèse, et ces petits mots et conversations de soutien ont contribué à ce que je garde le cap. Je te remercie sincèrement pour cela, et pour les succulentes cerises que tu m'avais offertes !

Anne-Marie, je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite, et merci pour ton écoute et ton soutien qui m'ont fortement aidée.

Merci aussi à Elodie, Guillaume D, Thomas R, Roberto, Minh, Thomas K, Anita, Anna pour votre sympathie, les conversations divertissantes au cours des repas. Je vous souhaite un bel avenir scientifique et personnel.

Corinne, merci pour tout ce que tu fais pour le laboratoire, merci de nous faciliter la tâche sur un grand nombre d'aspects et d'être réceptive à nos demandes.

Guillaume H, tu as été une très belle rencontre de ce laboratoire. Merci pour ton aide sur les aspects génétiques ! J'ai beaucoup de bons souvenirs, San Sebastian, les conversations insensées aux repas et même le reste de la journée, les délires comme notre série. Je te souhaite de réussir d'être heureux sur tous les points, pour le moment ça semble être le cas ;-)

Julien B, tu as malheureusement pour nous quitté le laboratoire, mais quand tu étais là tu nous as beaucoup apporté. Merci pour ton écoute, ton soutien, et d'avoir rendu populaires, avec Alex, certains de mes tics d'expression ;-) J'espère que la suite pour toi sera remplie de belles choses mais je n'en doute pas.

Sophie, tu n'es pas restée très longtemps parmi nous mais tu m'as été d'une grande aide à un moment pas simple dans cette thèse. Merci pour tes conseils et tes aides (même si le choix de la baby-sitter tatouée crée le doute sur la qualité de tes avis haha).

Jean, hahah, je ne peux que commencer en riant ! Nous n'avons pas travaillé directement ensemble, mais on s'est croisé à la paillasse. Continue bien dans tes études de médecine, et je n'ai pas le moindre doute que tu seras un très bon médecin.

Aux autres qui sont partis, Audrey, Alban, Julien V, Oriane, merci pour vos conseils scientifiques, pour votre écoute, pour les conversations scientifiques ou non qui ont animé mes journées. Je vous souhaite tout le meilleur.

Colette, merci pour tout ton travail en amont qui m'a permis d'effectuer mes manips. Merci aussi pour ta gentillesse et les conversations qu'on a partagées. Prends soin de toi.

Merci aussi à Corine et Chantale pour leur travail qui permet à nos laboratoires de pouvoir fonctionner et avancer.

Stéphane, tu n'es pas de notre labo, mais pour moi c'est tout comme. Merci pour toutes ces conversations très intéressantes sur le plan scientifique mais aussi personnel. Merci pour les fous rires qu'on a eu. Merci pour ta gentillesse, ta sympathie, ton humour.

Kamel et Amandine, vous n'êtes plus à Pasteur mais dans mes premiers temps de thèse vous m'avez beaucoup aidée en conseils de manip, en échange scientifique et en soutien grâce à nos conversations animées au cours de nos longues, très longues journées en pièce de culture.

Merci à mon tuteur le Professeur Tajbakhsh qui a toujours été disponible et qui a su me poser des questions que je ne m'étais pas posées et qui a su me conseiller.

Cette thèse est forcément mon bébé intellectuel, mais sans vous tous je n'aurais pas pu y parvenir, elle contient un peu de chacun d'entre vous.

Hors du laboratoire beaucoup de personnes m'ont aussi soutenue.

Tout d'abord merci à ma Maman. Cette thèse elle est pour toi, de la première à la dernière ligne. Si j'en suis arrivée là c'est clairement grâce à toi, sans le moindre doute. Tu as fait tant de sacrifices pour que je puisse aller loin, que j'ai accès à tout. Ce diplôme, le plus élevé qui existe, je l'ai eu pour toi, pour que tu sois fière et que tu saches que tout ce que tu as mis de côté dans ta vie, ce n'était pas vain. Je te remercie pour toute ton écoute au cours de cette thèse, de ta présence, de tes attentions, cela m'a beaucoup aidé.

Merci à mon père déjà de m'avoir donné la base essentielle : la base génétique de l'intérêt pour la science. Comme on le sait, les gènes ça joue beaucoup. Merci pour tes conseils sur ce monde de la recherche. Merci aussi pour ton soutien au cours de ces années de thèse parfois difficiles. Je te laisse la lire, tu me diras ce que tu en penses.

Jordane, tu as eu la chance de ne traverser que les derniers mois de cette thèse, mais ce ne fut pas toujours les plus simples. Merci d'avoir été là et de m'avoir soutenue pendant cette période de rédaction sans interruption, où je n'étais plus vraiment un être humain. Merci de m'avoir aimé malgré tout, malgré mes journées pyjama les yeux rivés sur mon écran à étaler des articles scientifiques partout dans l'appartement, malgré mon asociabilité, mes nuits tourmentées. Ta présence et ton soutien m'ont beaucoup aidée. Grâce à toi cette année 2016 qui s'annonçait plutôt moche, est finalement devenue une magnifique année. Tu m'as accompagnée et soutenue dans mes deux plus grands projets, les deux plus grandes choses que j'ai réalisées dans ma vie : le marathon et cette thèse. Hâte d'accomplir d'autres projets avec toi à mes côtés. Merci d'exister et d'être là !

Merci à Ali et Pauline que je connais depuis plus de 20 ans ; Ali, ma chère coloc, après avoir appris à lire ensemble il y a 22 ans, voilà que maintenant tu es là pour assister à ma thèse ; Pauline, toi que je connais depuis que ma mémoire fonctionne, cette thèse je n'ai pas de doute, tu es bien contente que je l'ai enfin terminée. Merci de ne pas m'avoir lâchée au cours de cette thèse et de m'avoir aidée à ne pas baisser les bras.

Louise et Ed, merci pour votre soutien et écoute ces dernières années, de m'avoir permis de décompresser hors du laboratoire.

Audrey et Zoé, vous m'avez beaucoup aidé mentalement, votre soutien sans limite, la façon que de croire en moi et en mes capacités m'ont permis de finir cette thèse.

Merci à la clique sainte Ge : Laura pour nos soutiens respectifs sur tous les plans, et aussi les garçons Zizou, Bapt, Clem, Hugo, mes grands frères.

Merci aussi à tous mes autres amis pour votre présence et de m'avoir aidé de différentes façon à tenir : Hélène, Sissou, Jérôme, Anto, Sergei.

Emi, merci pour nos souvenirs mémorables, ces fous rires, ces folies, ces vacances et soirées qui m'ont permis de souffler durant la thèse, merci aussi d'avoir été là. Cela n'a pas toujours été facile, mais ça y est la thèse est finie, on va pouvoir se retrouver !

Je remercie mes copains de Master qui sont un peu mes compagnons de route: Adel bravo pour ta thèse, you rock ; Jerem tu vas t'en sortir comme un chef, je ne m'en fais pas pour toi sur aucun aspect ; Blaise hâte que tu reviennes et bon courage pour la fin de ta thèse mais je ne m'en fais pas ; Max malgré les quelques km qui nous séparent je te soutiens pour la « fin » de ta thèse.

Merci à Prisc, Marine et Roxy pour leur écoute, présence et soutien sans limite, vous m'avez beaucoup aidé. Merci à Kris aussi pour son poulet mariné imbattable, au cours d'une thèse les bonheurs gustatifs c'est une question de survie !

Merci à mes anciens colocs, Man, Gogo et Plad qui ont assisté à une partie de mes années de thèse. Ce fut une coloc superbe, ma fin de thèse nous a un peu éloigné, mais ce n'est que partie remise ;-)

Merci aussi à mes autres amis qui ont souvent eu un petit mot et des pensées pour moi Guillaume, Karim, Xav, Tiff ,et Seb the queen love you ☺

RESUME

Les Troubles du Spectre Autistique (TSA) affectent un individu sur 100 en France et sont caractérisés par des déficits de la communication et des interactions sociales ainsi que par la présence d'intérêts restreints et de comportements répétitifs. Le laboratoire a démontré l'implication de protéines synaptiques dans le développement des TSA et en particulier celle des protéines SHANK. Ces protéines sont des protéines d'échafaudage présentes au niveau de la densité post-synaptique (PSD) des neurones glutamatergiques et interagissant avec différents partenaires.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la protéine SHANK3. Des mutations au sein du gène *SHANK3* ont été détectées chez environ 1 à 2% des patients, selon le degré de sévérité du retard mental. Un déficit de SHANK3 altère le fonctionnement synaptique. En effet, des analyses sur modèles de souris invalidées pour le gène *SHANK3* ont montré une diminution de la densité des épines dendritiques, de la taille de la densité post-synaptique et de l'expression des partenaires protéiques de SHANK3.

Mon modèle principal d'analyse a consisté en la reprogrammation de fibroblastes en cellules pluripotentes induites (iPSC « induced pluripotent stem cells »). Les iPSCs ont ensuite été sélectivement dérivées en neurones corticaux. Nos études se sont focalisées sur l'analyse des conséquences fonctionnelles de mutations *de novo* du gène *SHANK3* retrouvées chez 4 patients à l'état hétérozygote et présentes au sein de l'exon 21. Ces mutations conduisent à un codon stop prématuré. En parallèle, nous avons obtenu des cellules de 4 individus témoins ne présentant aucun trouble psychiatrique identifié.

L'analyse a porté d'une part sur des aspects morphologiques et d'autre part sur des aspects fonctionnels. Nous avons étudié l'effet des mutations sur la maturation et les caractéristiques morphologiques des épines dendritiques. Nous avons établi un protocole permettant une analyse détaillée de la morphologie en 3D des épines dendritiques et suivi leur maturation. Un résultat majeur est l'observation d'une diminution de la densité des épines sur les dendrites des neurones pyramidaux issus des patients par rapport aux témoins. Comme attendu, la maturation des épines n'est pas complètement achevée mais varie peu dans son évolution d'un individu à l'autre (témoins *vs.* patients). Nous avons poursuivi ces études par deux approches fonctionnelles : l'imagerie calcique et des études d'électrophysiologie. Les données électrophysiologiques sont en cours d'analyse.

En conclusion, nous avons pu obtenir des cultures de neurones corticaux glutamatergiques et les maintenir en culture durant 40 jours pour effectuer différentes analyses à un stade de maturation suffisant pour la mise en évidence de phénotypes morphologiques et fonctionnels. Nous avons principalement observé une diminution de des densités synaptiques et de maturation des épines dendritiques au sein des neurones issus de patients liée à des altérations d'oscillations calciques spontanées.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **17**

I/ Troubles du spectre autistique (TSA) **18**
1/ Historique **18**
2/Evaluation clinique **20**
2-1/ DSM-IV (1994) 20
2-2/ DSM-V (2013) 21
3/Diagnostic **22**
4/Comorbidités **23**
5/Diverses voies de traitement des TSA **26**
5-1/Traitements Pharmacologiques : 26
5-2/Méthodes Comportementales : 27
6/Epidémiologie **28**
6-1/Prévalence 28
6-2/« Sex-Ratio » 29
7/Causes **30**
7-1/Génétiques 30
7-1-1/Etude de jumeaux 31
7-1-2/Récurrence 31
7-1-3/Détection de facteurs génétiques 32
a/Remaniements chromosomiques 33
b/CNVs (« Copy Number Variation ») 33
c/« Single Nucleotide Variants » et indel par études de gènes candidats et analyses de séquençage d'exome ou de génome entier (whole exome/genome sequencing : WES/WGS) 35
d/Mutations héritées 37
e/Variants communs 37
f/Modèles génétiques proposés 38
7-1-4/Gènes et réseaux fonctionnels 41
a/Voie synaptique : Gènes identifiés 43
b/Traduction protéique 47
7-1-5/Autisme syndromique 48
a/Syndrome de Rett 49
b/Syndrome de l'X-Fragile (FXS) 50
c/Syndrome de Timothy 50
d/Syndrome de Phelan-McDermid (PMS) 50
e/Sclérose Tubéreuse 51
f/Syndromes de Prader-Willi et d'Angelman 51
7-2/Immunité 52
7-3/Autres 53
7-3-1/Environnement 53
7-3-2/Epigénétique 55
8/ Expression génique différentielle **57**
9/Défauts du développement du cerveau de patients TSA **58**

II/Synapses **60**
1/Développement dendritique **61**
1-1/ Rôle des protéines d'échafaudage 62
1-2/ Rôles des Contactines 63
1-3/ Rôles de molécules régulatrices 64
2/Caractérisation des synapses **65**
2-1/Densité Post-Synaptique 66
2-1-1/Récepteurs glutamatergiques 67
2-1-2/Protéines d'échafaudage de la PSD 69
2-2/Formation des épines 71

2-2-1/Filopodes 71
2-2-2/Epines dendritiques 72
2-2-3/Formation et maturation des synapses 73
2-3/Synaptogénèse 74
2-4/Plasticité synaptique 76
3/Calcium 78
4/Astrocytes 81
5/Troubles neurodéveloppementaux 83
5-1/Autisme non syndromique 84
5-2/Autisme syndromique 86
5-3/Dérégulation de la balance excitation/inhibition (E/I) et connectivité neuronale : 88
III/SHANK 89
1/ Structure protéique 90
1-1/Ankyrine 91
1-2/SH3 : 91
1-3/PDZ 92
1-4/Région riche en proline 93
1-5/Domaine SAM 95
2/Caractéristiques de SHANK3 96
2-1/Génétique 96
2-2/Implication du gène *SHANK3* dans le développement d'autres troubles 97
2-2-1/Schizophrénie 97
2-2-2/Bipolarité 97
2-3/Expression 98
2-3-1/Expression tissulaire 98
2-3-2/Cinétique d'expression 99
2-3-3/Epissage alternatif et isoformes 101
2-4/Rôles cellulaires de SHANK3 104
2-4-1/Etudes in vitro (surexpression et invalidation du gène = « knockdown ») 105
2-4-2/Modèles murins 108
3/Autres membres de la famille SHANK 114
IV/ Modèle d'étude de cellules souches pluripotentes induites 118
1/Avancées antérieures 119
1-1/« Somatic Cell Nuclear Transfer » (SCNT) 119
1-2/Fusion cellulaire 119
1-3/Clonage 120
1-4/Facteurs de conversion 120
2/ « induced Pluripotent Stem Cells » (iPSCs) 122
2-1/Obtention d'iPSCs 122
2-2/Limitations 124
2-2-1/ES vs iPSCs 124
2-2-2/Risque tumoral 124
2-2-3/Risques de modifications génétiques et épigénétiques 125
2-2-4/Faible taux d'efficacité et durée importante 125
2-3/Processus de reprogrammation 125
2-4/Facteurs et voies 128
2-4-1/Modification d'histones 128
2-4-2/ Méthylation de l'ADN 129
2-5/Facteurs augmentant l'efficacité de reprogrammation 129
2-6/Evolution technique 130
2-6-1/Vecteurs 130
2-6-2/Cellules somatiques reprogrammées 131
2-6-3/Cellules somatiques induites 131
2-6-4/Reprogrammation directe 131
2-7/Différenciation en cellules neuronales 131

2-7-1/ « Embryoid Bodies » 132
2-7-2/Conversion directe 132
2-8/Applications 133
2-8-1/Modélisation de maladies (maladies psychiatriques) 133
2-8-2/ Etudes de maladies neuropsychiatriques effectuées à partir d'iPSCs 135
2-8-3/Tests de molécules/médicaments 143
2-8-4/Médecine régénérative 144
OBJECTIFS DE LA THESE 146
Article 1 : 151
Article 2 (en préparation, soumission prévue en 2016) : 161
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 200
REFERENCES 225
ANNEXES 285

Liste des abréviations

ABA	Applied Behavioral Analysis
Abi-1	Abelson tyrosine kinase interacting protein
Abp1	Actin binding protein 1
ADI-R	Autism Diagnostic Interview Revised
ADOS	Autism Diagnostic Observation Schedule
AMD	Age-related Macular Degeneration
AMPA	α- amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole proprionic acid
AMPAR	AMPA Receptor
AQ	Autism Quotient
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
β-PIX	PAX Interacting Exchange Factor
CAM	Cell Adhesion Molecule
CamKII	Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II
CARS	Childhood Autism Rating Scale
CCC	Children Communication Checklist
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CHD8	Chromodomain Helicase DNA binding protein 8
CNTN	Contactine
CNV	Copy Number Variant
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CTNND2	Delta 2 Catenin
DISCO	Diagnostic Interview for Social and Communication
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EBs	Embryoid Bodies
EEG	Electroencéphalogramme
EGF	Epidermal growth factor
E/I	Excitation/Inhibition
EQ	Empathic Quotient
ESC	Embryonic Stem Cell
FGF2	Fibroblast Growth Factor

FMR1	Fragile Mental Retardation 1
FXS	Fragile X-Syndrome
GABA	γ-aminobutryic acid
GKAP	Guanylate Kinase-Associated Protein
GRIP	Glutamate Receptor-Interacting Protein
GWAS	Genome Wide Association Studies
HCN	Hyperpolarization-activated cycloc nucleotide-gated channel
HEK	Human Embryonic Kidney
hESC	human Embryonic Stem Cell
HLA	Human Leucocyte Antigens
HTS	High-Throughput Sequencing
ICM	Inner Cell Mass
IGF1	Insulin-like Growth Factor-1
iGluRs	Récepteurs glutamatergiques ionotropiques
IP3	Inositol trisphosphate
IP3R	IP3 Receptor
iPSCs	induced Pluripotent Stem Cells
IRM	Imagerie de Résonnance Magnétique
KLF4	Krüppel-loke factor 4
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
MECP2	Methyl CpG binding Protein-2
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
mEPSC	miniature Excitatory Postsynaptic Current
mESC	mouse Embryonic Stem Cell
mGluR	metabotropic Glutamate Receptor
mIPSC	Miniature Inhibitory Postsynaptic Current
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
MYOD	Myoblast Determination Protein
NGS	Next-Generation Sequencing
NLGN	Neuroligine
NMDA	N-méthyl-D-Aspartate

NPCs	Neuronal Progenitor Cells
NRXN	Neurexine
NSCs	Neuronal Stem Cells
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
OSKM	Facteurs Oct/Sox/Klf/Myc
PMS	Phelan McDermid Syndrome
PRT	Pivotal Response Treatment
PSD	Post-Synaptic Density
PSD95	Post-Synaptic Density-95
PDZ	PSD-95/discs large/zone occludens-1
PI3K	Kinase phosphoinositide-3
Pten	Phosphatase and tensin homolog
RBS	Repetitive Behavior Scale
RE	Réticulum endoplasmique
Rheb	Ras Homolog Enriched in Brain
RRR	Risque Relatif de Récurrence
S-SCAM	Synaptic Scaffolding Molecule
SAM	Sterile Alpha Motif
SA	Syndrome d'Angelman
SAPAP	SAP90/PSD-95-Associated Proteins
SCNT	Somatic Cell Nuclear Transfer
SFARI	Simons Foundation Autism Research Initiative
SH3	Src homology 3
SHANK	SH3 and multiple ankyrin repeat domains
SNV	Single Nucleotide Variants
SOX2	SRY-box2
SPW	Syndrome de Prader-Willi
SRS	Social Responsiveness Scale
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TDAH	Troubles du Déficit de l'Attention avec Hyperactivité
TED	Troubles Envahissants du Développement
TGI	Troubles Gastro-Intestinaux
TOCs	Troubles Obsessionnels Compulsifs

TRPC6	Transient Receptor Potential Canonical 6
TSA	Troubles du Spectre Autistique
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing

INTRODUCTION

I/ Troubles du spectre autistique (TSA)

1/ Historique

En 1943, le Docteur Léo Kanner, un pédopsychiatre américain s'est intéressé aux enfants atteints d'autisme précoce et a décrit pour la première fois des patients atteints de ces troubles (Kanner 1943). Son étude a porté sur 11 enfants âgés de 2 à 11 ans (8 garçons et 3 filles) présentant des « troubles autistiques du contact affectif », correspondant à des perturbations comportementales et neurologiques. Plus précisément, ces enfants faisaient preuve d'une extrême solitude, évitant les regards, ignorant les interactions, présentant des troubles du langage ainsi qu'un comportement dicté par une obsession de la similitude, évitant tout changement. Léo Kanner a donc établi trois caractéristiques comportementales : une incapacité de mettre en place des relations avec autrui, des troubles du développement du langage et des comportements obsessionnels à travers le déroulement de rituels.

De façon indépendante, peu avant la seconde guerre mondiale, le psychiatre autrichien Hans Asperger publia en 1943 la description de patients (4 garçons) présentant certaines similitudes avec ceux de Kanner mais se distinguant par leur capacité intellectuelle et leur absence de troubles du langage. Il a donné son nom au Syndrome d'Asperger. Cependant, ces travaux ne furent diffusés au niveau international qu'au cours des années 1980, par la psychiatre anglaise Lorna Wing. Cette psychiatre publia en 1981 un compte-rendu clinique du syndrome d'Asperger. Ce syndrome d'Asperger fut originellement nommé psychopathie autistique de l'enfance. Hans Asperger considérait ces troubles comme un spectre incluant des individus avec des retards intellectuels

sévères et des troubles du comportement, ainsi que des enfants démontrant de grandes capacités intellectuelles (Goldson 2016). Contrairement à Kanner qui décrivait des troubles aux caractéristiques bien discernables, Asperger avait la vision d'un *continuum* autistique. Il ne considérait pas les individus comme des patients mais comme des personnes avec des capacités intellectuelles et des potentiels particuliers. Il développait l'idée qu'il ne fallait pas forcément corriger les différences, mais aider les individus à développer leurs potentiels. Pour cela il a contribué à la mise en place d'un programme permettant à ces individus d'évoluer dans un environnement adapté.

De façon préliminaire, Kanner soupçonnait une forte cause neurologique. Asperger quant à lui considérait qu'il y avait une forte composante génétique (Goldson 2016).

Il est à noter que les troubles autistiques ne datent pas seulement de cette première partie du XXème siècle. En effet de précédents écrits ont reporté l'existence d'enfants présentant des symptômes proches de ceux décrits par Asperger et Kanner mais qui à des périodes antérieures n'étaient pas diagnostiqués et probablement assimilés à des individus déments (Goldson 2016).

Durant une trentaine d'années, l'autisme fut considéré comme une forme infantile de la schizophrénie (Eisenberg et Kanner 1956). Ce trouble fut enfin reconnu en tant que syndrome distinct dans les années 1980 et caractérisé par un trouble de la communication, un manque d'interaction sociale avec autrui et des comportements atypiques (DSMIII) (American Psychiatric Association 1980).

Le syndrome d'Asperger quant à lui est caractérisé par des troubles des interactions sociales, des intérêts restreints, des comportements répétitifs mais avec absence de retard mental (Goldson 2016).

2/Evaluation clinique

L'autisme est apparu en tant que catégorie de diagnostic lors de la troisième édition du DSM (« Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ») en 1980 (American Psychiatric Association 1980). Depuis, plusieurs remaniements de classification ont entrainé la publication de nouvelles versions de ce manuel.

2-1/ DSM-IV (1994)

Le DSM-IV (American Psychiatric Association 1994) présentait la catégorie de troubles envahissants du développement comportant cinq sous-types de l'autisme: les troubles autistiques, le syndrome d'Asperger, le trouble désintégratif de l'enfance, les troubles envahissants du développement non spécifiés (TED non spécifiés) ainsi que le syndrome de Rett. Trois symptômes y définissaient l'autisme, appelés « triade autistique » :

- Troubles des interactions sociales
- Troubles de la communication
- Comportements restreints et répétitifs

2-2/ DSM-V (2013)

Dans cette dernière version du manuel (American Psychiatric Association 2013), les troubles autistiques, le syndrome d'Asperger, le trouble désintégratif de l'enfance et les TED non spécifiés sont regroupés dans une même catégorie nommée : Troubles du Spectre Autistique (TSA). Le syndrome de Rett ne fait désormais plus partie de cette catégorie.

Les symptômes associés sont actuellement :

- Troubles de la communication et de l'interaction sociales (les problèmes sociaux et de communication sont combinés, mais le retard de langage n'en fait plus partie)
    - Déficits dans la réciprocité socio-émotionnelle
    - Déficits dans les comportements de communication non-verbale
    - Déficits dans le développement et la maintenance de relations
- Comportements et intérêts restreints et répétitifs (avec l'apparition de la sensibilité inhabituelle aux stimuli sensoriels)
    - Mouvements moteurs stéréotypés ou répétitifs
    - Obstination de similitude, adhésion à des routines ou à des comportements verbaux ou non verbaux ritualisés
    - Intérêts fortement restreints, de façon anormale dans leur intensité
    - Hyper- ou hypo-sensibilité à des données sensorielles

De plus une notion de degré de sévérité est précisée avec trois niveaux différents, prenant ainsi en compte le concept de spectre. En effet, les TSA incluent des patients étant affectés à différentes intensités, allant d'individus plus légèrement atteints avec des capacités intellectuelles considérées « normales » à des patients plus sévèrement

affectés intellectuellement.

Ces symptômes doivent s'observer dès la petite enfance et influencer en permanence la vie quotidienne du patient. Lors du diagnostic, il doit être spécifié si l'individu présente aussi un déficit intellectuel, des troubles du langage, une catatonie et si une condition génétique ou environnementale est à associer au phénotype.

3/Diagnostic

Différents outils ont été établis afin de permettre la mise en place d'un diagnostic. Les deux évaluations les plus utilisées sont l'ADI-R et l'ADOS. D'autres méthodes peuvent aussi être utilisées tels que le CARS ou le SRS.

- ADI-R (« Autism Diagnostic Interview Revised ») : consiste en un entretien semi-structuré avec les parents de l'enfant à l'aide d'un questionnaire.
- ADOS (« Autism Diagnostic Observation Schedule ») : en complémentarité de l'ADI-R, consiste en une évaluation mettant l'individu en situation d'interaction sociale, de communication à travers des jeux ou une conversation (en fonction du niveau de langage).
- CARS (« Childhood Autism Rating Scale ») : entrevue traitant de 15 domaines différents couvrant entre autres les relations sociales, les réponses émotionnelles, l'adaptation aux changements, les réponses visuelles et auditives, la peur et l'anxiété, la communication verbale et non verbale et le niveau intellectuel, permettant ainsi de prendre en compte des symptômes plus larges.

- SRS (« Social Responsiveness Scale ») : questionnaire rempli par les parents ou professeurs, dans le but d'identifier des troubles sociaux associés aux TSA et de mesurer leur sévérité.

D'autres évaluations peuvent être effectuées par des cliniciens tels que le DISCO (« Diagnostic Interview for Social and Communication »), le RBS (« Repetitive Behavior Scale ») et la CCC (« Children Communication Checklist »).

En plus de ces évaluations cliniques, d'autres tests peuvent être utilisés permettant à la population générale de mesurer leur quotient autistique (AQ : Autism Quotient, (Baron-Cohen et al. 2001)) et leur quotient empathique (EQ : Empathic Quotient, (Baron-Cohen et Wheelwright 2004)). Ces tests sont accessibles en ligne (https://psychology-tools.com/autism-spectrum-quotient/ et https://psychology-tools.com/empathy-quotient/)

4/Comorbidités

Plus de 70% des patients atteints de TSA présentent des comorbidités (Lai et al. 2014) (Tableau 1). Les patients atteints de TSA présentent un taux plus élevé de :

- troubles mentaux : dépression, anxiété (Strang et al. 2012), troubles bipolaires, Troubles Obsessionnels Compulsifs (TOCs), psychose et automutilation (Singh et al. 2006)
- troubles moteurs : problèmes moteurs tels que hypotonie ou retard moteur
- autres désordres physiopathologiques : troubles du sommeil (Schreck 2004), immunitaires, de l'alimentation et gastro-intestinaux (Martins et al. 2008),

obésité, hypertension, convulsions (Volkmar et Nelson 1990), épilepsie, accidents cérébro-vasculaires et maladie de Parkinson (Croen et al. 2015).

De plus, 32% de ces individus avec TSA subissent une régression (c'est à dire une perte ou retour en arrière des acquis obtenus) (Barger et al. 2013). Ces individus avec TSA présentent aussi une hyper ou hypo-sensibilité aux stimuli sensoriels.

La liste des comorbidités est exposée dans le Tableau 1. Certaines comorbidités sont détaillées ci-dessous.

Comorbidité	Pourcentage de patients TSA
Troubles du langage	Variable
Retard mental	45%
TDAH	28-44%
TIC	14-38%
Troubles moteurs	≤79%
Epilepsie	8-30%
Troubles GI	9-70%
Troubles immunitaires	≤38%
Troubles du sommeil	50-80%
Anxiété	42-56%
Dépression	12-70%
TOCs	7-24%
Troubles psychotiques	12-17%
Troubles de l'alimentation	4-5%
Troubles de la personnalité	0 à 32% en fonction du trouble
Comportements agressifs	68%
Auto-mutilations	50%
Pensées ou tentative de suicide	11-14%

Tableau 1 : Comorbidités associées aux TSA. Valeurs issues de Lai et al. 2014.

Troubles mentaux

Les individus atteints de TSA présentent un taux plus élevé de troubles de l'humeur, d'anxiété (Murphy et al. 2011; Hofvander et al. 2009; Lugnegård et al. 2011), de TOCs (Russell 2005), de troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH) (Johnston et al. 2013) et de troubles psychotiques. Une étude a montré que 70% des patients de cette étude (atteints du syndrome d'Asperger) avaient présenté au moins un épisode de dépression majeure, 50% avaient des périodes récurrentes de dépression et 50% des troubles de l'anxiété (Lugnegård et al. 2011). Une revue regroupant plusieurs études a démontré que 58% de patients TSA présentaient en parallèle un autre trouble psychiatrique tels que anxiété, TOCs, dépression, et TDAH (Russell et al. 2016).

Epilepsie

La fréquence est encore plus élevée chez des individus TSA avec retard mental ou atteints d'autisme syndromique (Lai et al. 2014). En effet, plusieurs études montrent une augmentation allant de 2 à 46% des risques d'épilepsie chez les individus atteints de TSA (El Achkar et Spence 2015) (cette forte variabilité est probablement due à des évaluations de diagnostic variables). Aucun type de crise épileptique n'est particulièrement associé aux TSA.

Sommeil

Les individus adultes atteints de TSA présentent des difficultés d'endormissement, de réglage du sommeil, des éveils nocturnes et des insomnies. Les enfants avec TSA présentent en plus des difficultés de mise en place des cycles du sommeil (Cohen et al. 2014; Richdale et Schreck 2009; Baker et Richdale 2015; Tani et al. 2004; Limoges

2005). Il a été suggéré que des dérégulations dans la production de la mélatonine et dans le cycle circadien pouvaient contribuer à ces troubles. Cependant, les troubles du sommeil peuvent aussi être induits par d'autres comorbidités, telles que l'anxiété ou la dépression (Tani et al. 2004).

Troubles gastro-intestinaux (TGI)

Les enfants atteints de TSA présentent 2 à 3 fois plus de risque de développer ce type de comorbidités (McElhanon et al. 2014). Parmi les troubles gastro-intestinaux, on retrouve des douleurs abdominales, des reflux gastro-oesophagiens, des constipations ou diarrhées chroniques (Lai et al. 2014). Des troubles de l'alimentation surviennent 5 fois plus chez des enfants atteints de TSA par rapport aux enfants non atteints (Sharp et al. 2013).

Espérance de vie

Une méta-analyse a démontré que les patients TSA ont un risque de mortalité 2,8 plus élevé que des individus non atteints du même âge et du même sexe. Ceci est probablement causé par les différentes comorbidités associées aux TSA (Woolfenden et al. 2012).

5/Diverses voies de traitement des TSA

5-1/Traitements Pharmacologiques :

Ces traitements ne traitent pas les TSA dans leur globalité mais soulagent certains symptômes (McPheeters et al. 2011) :

- Les antipsychotiques ont un effet sur la réduction des comportements répétitifs chez les enfants atteints de TSA (Lai et al. 2014), mais des effets secondaires sont à déplorer. Ainsi, la rispéridone est prescrite pour les comportements agressifs et répétitifs, l'aripiprazole (commercialisé « Abilify ») pour réduire l'irritabilité.
- Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (anti-dépresseurs : fluvoxamine, fluoxétine (prozac), citaloprame) peuvent être prescrits pour réduire l'anxiété de ces patients et les comportements répétitifs.
- Les antidépresseurs tricycliques (clomipramine) sont administrés pour réduire les dépressions, stéréotypies et angoisses.
- Les stimulants sont utilisés pour traiter l'hyperactivité et les TDAH.

Cependant certains traitements présentent une faible efficacité ainsi que des effets secondaires (Lai et al. 2014; McPheeters et al. 2011).

La mélatonine peut être utilisée pour contrôler les troubles du sommeil. Des traitements à la mélatonine sont souvent utilisés par tenter de traiter les insomnies. En cumulant les résultats de plusieurs études, il a été montré que la mélatonine avait un effet positif sur les troubles du sommeil chez des patients avec des troubles neurodéveloppementaux, dont les TSA, principalement en favorisant l'initiation du sommeil (Hollway et Aman 2011).

5-2/Méthodes Comportementales :

Différentes méthodes alternatives ont été développées dans le but de soulager les troubles du comportement mais celles-ci sont sujettes à controverses. Parmi ces méthodes nous pouvons citer les programmes ABA (« Applied Behavioral Analysis »),

PRT (« Pivotal Response Treatment ») qui sont des méthodes comportementales, et le programme de Denver (jeux, relations entre individus) qui correspond à une méthode développementale.

6/Epidémiologie

6-1/Prévalence

La prévalence (nombre d'individus atteints par rapport au nombre d'individus dans la population générale) estimée des TSA a fortement augmenté au cours des 50 dernières années. Ces troubles furent tout d'abord considérés comme une maladie rare, avec une prévalence de 4/10000 (Murphy et al. 2016). De nos jours celle-ci est estimée entre 1/68 et 1/100 (Baird et al. 2006; Brugha et al. 2011; American Psychiatric Association 2013; Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2014). Certaines estimations plus récentes indiquent une prévalence encore plus importante, jusqu'à environ 1/50 (Center for Disease Control and Prevention 2015). La figure 1 illustre une représentation de cette évolution. Cette évolution au cours du siècle est probablement due à une augmentation de la prise de conscience de ces troubles, à un diagnostic plus fréquent et plus précoce, à une amélioration des critères de diagnostic et pas nécessairement à l'augmentation de l'incidence (Fombonne 2009; Hansen et al. 2015; Lundstrom et al. 2015). Cependant une augmentation sur une période plus récente (2012-2014) pourrait potentiellement être causée par certains facteurs environnementaux actuels (Center for Disease Control and Prevention 2015).

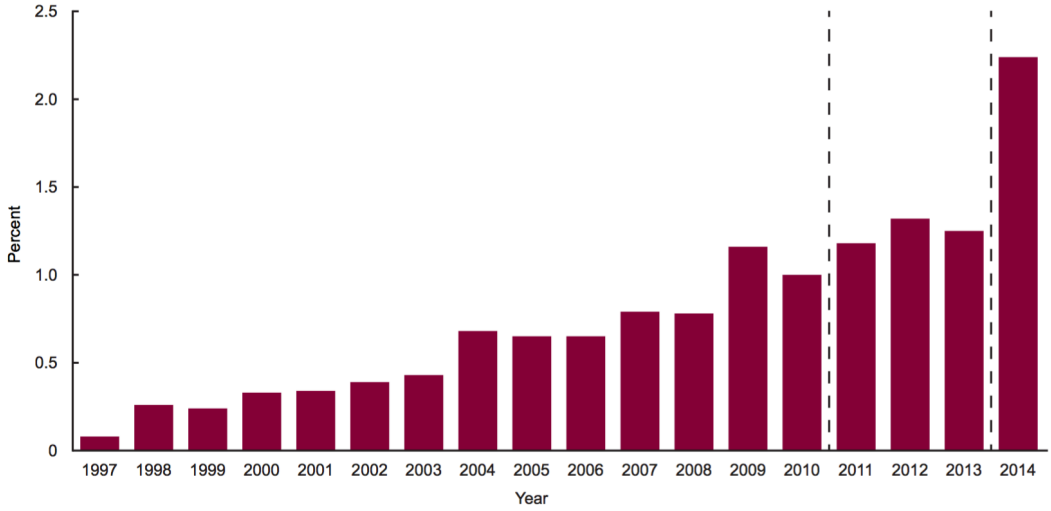


Figure 1 : Prévalence des TSA au cours des deux dernières décennies. Une augmentation de la prévalence est observée au cours des 20 dernières années avec une accélération récente. Figure issue de Center for Disease Control and Prevention 2015).

6-2/« Sex-Ratio »

Les TSA sont 4 fois plus présents chez les hommes que chez les femmes (Fombonne 2009; Center for Disease Control and Prevention 2012). Cependant, ce « sex-ratio » global se modifie en fonction de certaines caractéristiques tel qu'un retard d'apprentissage, un retard mental et/ou des dysmorphies (Bourgeron 2016). En effet, il est de 2 :1 chez les individus avec un retard d'apprentissage contre 6-8 :1 chez ceux n'en présentant pas (Murphy et al. 2016).

Certaines études ont montré des différences de structure du cerveau chez les femmes atteintes de TSA et qui seraient spécifiques au sexe (Lai et al. 2013; Schaer et al. 2015). D'autre part, certaines régions chromosomiques présentent des risques d'altérations génétiques différents entre les hommes et les femmes, pouvant expliquer les différences observées entre les deux sexes dans le développement des TSA (Werling et al. 2014; Tropeano et al. 2016).

A noter que les filles sont moins fréquemment atteintes, mais celles qui le sont semblent présenter un niveau de gravité de troubles plus élevé. Une étude a montré que des formes d'autisme sévère chez des filles pouvaient être associées à des mutations affectant le gène CTNND2 (« delta 2 catenin gene »), gène qui code pour une protéine jouant un rôle important dans le développement neuronal. Cette observation pourrait ainsi expliquer cette tendance à un phénotype plus sévère chez les femmes atteintes (Turner et al. 2015).

D'autres hypothèses ont été posées telles que la présence de facteurs de protection chez les femmes, un rôle du chromosome X ou des hormones ainsi qu'une exposition des hommes à des facteurs de risque plus élevés. Cependant, actuellement, aucune donnée n'explique de façon claire la différence d'atteinte entre les deux sexes.

7/Causes

7-1/Génétiques

Certains psychanalystes ont longtemps suggéré que ces troubles présentaient une cause psychologique due à une relation parentale peu développée et à une absence de relation sociale. Cette hypothèse accusait particulièrement la mère, usant même du terme « mère frigidaire » (Murphy et al. 2016).

Mais ces hypothèses (peu solides) ont été contrées par de nombreuses études démontrant une cause génétique dans le développement de ces troubles. Cette cause génétique a été révélée par des études de jumeaux et de fratries (Folstein et Rutter 1977). Depuis les années 1980, les recherches sur les causes génétiques ont fortement augmenté.

7-1-1/Etude de jumeaux

Les premières études de jumeaux ont montré un taux de concordance de 90% chez les jumeaux monozygotes et de 10% chez les jumeaux dizygotes (Ziats et Rennert 2016). L'absence de concordance totale entre les jumeaux monozygotes montre l'existence d'un rôle potentiel de facteurs épigénétiques et/ou environnementaux. Des études plus récentes (Hallmayer 2011; Bourgeron 2016) ont estimé ce taux de récurrence à environ 20-30% chez les dizygotes. Selon une étude (Hallmayer 2011), les facteurs génétiques seraient responsables de 35 à 40% du développement des TSA, et les causes prénatales, périnatales et environnementales de 60-65%. Il faut cependant noter que les valeurs du pourcentage d'implication de chaque cause varient entre les diverses études, et qu'à ce jour nous ne pouvons les définir précisément. Lorsque l'on prend en compte toutes les études réalisées à partir de jumeaux, le taux de concordance est de 45% pour les jumeaux monozygotes et de 16% pour les jumeaux dizygotes (Bourgeron 2016).

7-1-2/Récurrence

Le risque qu'un enfant développe des TSA est augmenté de 2 à 8% lorsqu'un autre enfant de la fratrie est lui-même atteint de TSA idiopathiques (c'est à dire sans cause connue) (Murphy et al. 2016). Ce risque est de 50% lorsque la fratrie comprend un enfant présentant une mutation dominante héritée et de 25% lorsque la mutation est récessive (Freitag et al. 2010). Une étude plus récente a démontré que le risque global de récurrence était de 20% (Ozonoff et al. 2011). Le risque relatif de récurrence (RRR) aux TSA a été mesuré (RRR= risque relatif qu'un individu soit atteint de TSA lorsqu'un

autre membre de la famille est atteint, par rapport au risque qu'un individu soit atteint lorsqu'aucun membre de la famille ne l'est) : 153 chez les jumeaux monozygotes, 8,2 chez les jumeaux dizygotes, 10,3 pour les frères et sœurs non jumeaux, entre 2,9 et 3,3 pour les demi-frères et sœurs et 2 pour les cousins (Sandin et al. 2014). Dans cette dernière étude l'héritabilité est estimée à 50% et l'environnement non partagé contribuerait à 50%. Selon les études, l'héritabilité peut cependant varier. Elle serait comprise entre 37% et 95% (Hallmayer 2011; Gaugler et al. 2014; Colvert et al. 2015; Bailey et al. 1995; Folstein et Rutter 1977).

Un point intéressant est l'observation d'un taux de récurrence légèrement plus élevé chez les garçons au sein de familles multiplexes (familles dont plus de deux membres sont atteints). En effet, ce taux est de 47,5% chez les garçons et 44,3 % chez les filles (Werling et Geschwind 2015).

7-1-3/Détection de facteurs génétiques

Différentes méthodes ont permis de détecter diverses mutations chez les patients atteints de TSA : des études cytogénétiques, des études de liaison, d'association ainsi que plusieurs méthodes de séquençage.

Actuellement, 700 loci ont été démontrés comme impliqués dans les TSA (Ziats et Rennert 2016) et 826 gènes selon la SFARI (« Simons Foundation Autism Research Initiative »). Un modèle statistique permet de prédire l'implication de 1000 à 1500 gènes dans ces troubles (Ziats et Rennert 2016) et il est globalement estimé que les variations génétiques comptent pour 50% des risques à développer des TSA (Hallmayer 2011).

Différents types de mutations sont impliqués dans le développement de TSA :

- Remaniements chromosomiques (remaniements du nombre ou de la structure des chromosomes)
- Variations du nombre de copies (CNV « Copy Number Variation ») par délétion ou duplication d'une région
- Mutations ponctuelles : Variations d'un nucléotide (SNV « Single Nucleotide Variation ») ou insertion/délétion d'un ou quelques nucléotides
- Ces mutations peuvent être :
    - Héritées (transmises par un parent)/*De novo* (non détectées chez les parents, elles sont causées par des mutations au niveau des cellules germinales des parents ou plus rarement au sein de l'œuf fécondé)
    - Rares (présentes chez moins de 1% de la population générale)/Communes (présentes chez plus de 1% de la population générale)

a/Remaniements chromosomiques

Les premières études ont consisté en des analyses de cytogénétique permettant la détection de grandes anomalies génétiques, qui sont actuellement estimées entre 2% et 5% chez les patients TSA (Shen et al. 2010; Marshall et al. 2008; Devlin et Scherer 2012; Xu et al. 2004). Ces aberrations chromosomiques se retrouvent principalement chez les patients présentant des dysmorphies.

b/CNVs (« Copy Number Variation »)

Les technologies de « microarrays » (puces à ADN) et de CGH (« Comparative Genomic Hybridization ») ont permis une analyse des CNVs à travers l'ensemble du génome chez l'homme. Les CNVs sont des variations du nombre de copies d'une taille minimale de 1

kb, par duplication ou délétion. Une des premières analyses par ces approches a montré qu'un plus grand nombre de CNVs était retrouvé chez les patients avec TSA par rapport aux individus non atteints (10 fois plus pour les formes d'autisme sporadique, c'est-à-dire qu'aucun autre membre de la famille n'est atteint) (Sebat et al. 2007). D'autres études ont suivi et ont aussi confirmé l'augmentation du nombre de CNVs chez les patients, à la fois rares et *de novo* (Pinto et al. 2014; Sanders et al. 2011; Gilman et al. 2011; Cooper et al. 2011). Selon des études récentes, il est estimé que chez 5 à 15% de patients atteints de TSA des CNVs ont été détectés. Plus précisément, des CNVs *de novo* sont présents chez 4 à 7% des patients (Pinto et al. 2014; Huguet et al. 2013) (contre 1% chez les individus non atteints) et la totalité des CNVs rares hérités et des CNVs *de novo* détectés représente environ 10% des patients (Vijayakumar et Judy 2016).

Les CNVs *de novo* semblent induire des effets délétères plus marqués (retard mental, dysmorphies). Parmi les CNVs dits pathogéniques, les CNVs *de novo* représentent une part plus importante que les CNVs hérités (Pinto et al. 2014). Les CNVs présents chez les patients TSA sont plus larges et recouvrent plus de gènes que ceux observés chez des individus contrôles (Huguet et al. 2013). De plus, il a été démontré que les larges CNVs étaient associés à une diminution des capacités cognitives (Girirajan et al. 2012). En effet, de larges CNVs (> 400kb) sont présents chez 15% des patients TSA présentant un retard mental ou du développement (Bourgeron 2016). Un plus grand nombre de CNVs est retrouvé chez les hommes (Pinto et al. 2014), mais les femmes atteintes de TSA ont tendance à être porteuses de plus larges CNVs dans leur génome que les hommes atteints (Sanders et al. 2011), ce qui corrèle aussi avec le fait que les femmes atteintes de TSA présentent des formes de gravité plus importante. A noter que ce résultat n'est pas retrouvé dans toutes les études. En effet, une étude effectuée par Pinto (Pinto et al. 2014) n'a pas détecté de différence de taille des CNVs entre les hommes et les femmes.

Cependant, cette même étude démontre que la proportion de femmes porteuses de CNVs à forte pénétrance est plus élevée que pour l'ensemble des CNVs (la pénétrance est la proportion d'individus porteurs de la mutation et présentant le phénotype de la maladie).

Enfin, la plupart des CNVs détectés chez les patients avec TSA, sont majoritairement uniques, c'est à dire qu'ils ne sont retrouvés que chez un patient (Bourgeron 2016). L'équipe de Pinto, par exemple, a identifié 102 CNVs *de novo*, détectés chez 99 patients (3 des patients sont porteurs de 2 CNVs *de novo).* Néanmoins, certains CNVs sont communs à plusieurs patients. Ceci s'observe particulièrement pour des CNVs couvrant des gènes codant pour des protéines synaptiques. Chez les patients TSA, il y a un excès de CNVs au niveau de gènes de la PSD et le risque de développer des TSA augmente avec le nombre de gènes exprimés dans le cerveau et pour lesquels des délétions ont été mises en évidence (Pinto et al. 2014).

La détection de CNVs a permis l'identification de gènes candidats tels que *SHANK3, CDH8, NRXN1, CNTNAP2*, et de différents loci à risque (Szatmari et al. 2007).

c/« Single Nucleotide Variants » et indel par études de gènes candidats et analyses de séquençage d'exome ou de génome entier (whole exome/genome sequencing : WES/WGS)

Les SNVs sont des variations d'un nucléotide, les indel sont des insertions ou délétions d'un à plusieurs nucléotides.

Une approche basée sur la sélection de gènes candidats de par leurs fonctions ou par des études génétiques a permis d'identifier des gènes associés aux TSA, dont principalement des gènes synaptiques tels que *NLGN3, NLGN4X* et *SHANK3* (Jamain et al. 2003;Durand et al. 2007).

Chez 5 à 10% des patients atteints de TSA, des gènes-candidats fortement pressentis ont été associés aux TSA (Ziats et Rennert 2016). Mais parmi ces résultats, peu ont été répliqués par d'autres études, suggérant que beaucoup de mutations causant ces troubles sont des mutations très rares voire uniques chez certains patients.

La mise en place de méthodes de NGS (« Next-Generation Sequencing », aussi connues sous le nom de « High-Throughput Sequencing » : HTS), qui sont des méthodes de séquençage rapides et moins onéreuses (par rapport à la méthode de séquençage de Sanger), a révolutionné la recherche génétique. Avec ces nouvelles méthodes, des millions de petits segments d'ADN peuvent être séquencés simultanément, puis des outils bioinformatiques permettent d'associer les fragments entre eux. Chaque base d'ADN est séquencée à plusieurs reprises, limitant ainsi les erreurs d'analyse. Il est ainsi possible d'effectuer des séquençages de l'exome entier («Whole Exome Sequencing » : WES) et du génome entier (« Whole Genome Sequencing » : WGS). Plus de 18 études ont été effectuées montrant que 3,6 à 8,8% des patients TSA sont porteurs de mutations ponctuelles causales *de novo* (Bourgeron 2016). Les mutations *de novo* délétères (non sens, site d'épissage, décalage du cadre de lecture) sont plus fréquentes chez les patients atteints de TSA (Iossifov et al. 2014; Iossifov et al. 2012). De plus, ces mutations *de novo* sont plus fréquentes chez des individus avec TSA présentant un faible QI non verbal, et affectent des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine et les gènes régulés par le complexe FMRP. Un autre point intéressant est que ces mutations *de novo* de type SNV ou indel dans la séquence codante sont en majorité d'origine paternelle et apparaissent aussi selon l'âge du père (Iossifov et al. 2012).

d/Mutations héritées

Quelques études se sont intéressées au rôle des mutations héritées et ont estimé qu'elles étaient impliquées chez 3% (CNVs) et 8% (SNVs délétères) des patients atteints de TSA (Krumm et al. 2015).

En parallèle, l'ensemble des mutations *de novo* semble être représenté chez environ 15% des patients TSA. Les mutations héritées auraient un rôle reconnu et important dans les TSA.

De façon générale, plusieurs études génétiques ont identifié plus d'une centaine de gènes portant des mutations rares, pénétrantes et délétères chez environ 10-25% des patients TSA (Huguet et al. 2013; Geschwind et State 2015).

e/Variants communs

Les variants communs sont des variations de la séquence génomique présentes chez plus de 1% des individus de la population générale (les variants rares sont quant à eux présents chez moins de 1% de la population). Ils correspondent à 95% des variants détectés chez tout individu.

Des études ont montré que ces variants communs étaient impliqués chez 40 à 60% des cas de TSA selon le nombre d'individus atteints dans la famille (famille simplex : un seul membre atteint, famille multiplexe : plusieurs membres atteints) (Geschwind et State 2015; Bourgeron 2016). De plus, il semblerait que l'héritabilité soit majoritairement due à ces variants communs, avec seulement 2,6% associée aux variants rares (Gaugler et al. 2014). L'implication des variants communs dans le développement des TSA semble donc être importante, mais cet aspect est difficile à analyser à cause de leur nombre conséquent et du fait que chacun d'entre eux soit associé à un risque faible.

Des analyses de GWAS (« Genome Wide Association Studies ») pourraient permettre, en incluant de larges cohortes, d'identifier un plus grand nombre de variants génétiques impliqués dans les TSA. Pour le moment ces GWAS n'ont pas réellement apporté la démonstration d'une association de variants communs aux TSA. Néanmoins, ces études ont permis la détection de nouveaux gènes tels que *TRIM33*, *MACROD2, CDH9, CDH10, SEMA5A* et *TAS2R1* (Goldani et al. 2014; Vijayakumar et Judy 2016), qui codent pour des protéines ayant des rôles différents : ubiquitination, guidage axonal, réparation de l'ADN ou adhésion cellulaire dépendante du calcium. Globalement ces résultats de GWAS n'ont toutefois pas été très concluants, ni facilement répliqués. Une augmentation de la taille des cohortes étudiées jusqu'alors permettrait d'obtenir une fiabilité plus grande des analyses par GWAS.

f/Modèles génétiques proposés

Une accumulation de variants communs chez un même patient pourrait augmenter sa vulnérabilité aux TSA (Klei et al. 2012). Cette hypothèse est en accord avec le modèle du « multiple hit ». Par exemple, il a été montré que 10% des individus atteints de TSA et présentant un retard mental ainsi que des anomalies congénitales sont porteurs d'un second CNV de taille importante (Girirajan et al. 2012).

Ainsi, il semblerait que le développement de troubles autistiques soit à la fois associé à la présence dans le génome de mutations rares et délétères ainsi qu'à celle de variants communs à faible pénétrance. Plus précisément, une étude a estimé que les variants communs hérités contribuent pour environ 50%, les variants rares hérités pour 3% et la totalité des variants *de novo* pour 3% (Gaugler et al. 2014) (Figure 2). Une analyse basée sur des études de GWAS (Ben-David et Shifman 2012) a distingué deux modules de

gènes qui étaient à la fois affectés par des variants rares et des variants communs, démontrant que ces deux types de mutations convergent vers les mêmes voies moléculaires avec des effets additionnels. Ces deux modules regroupent des gènes impliqués au niveau neuronal et plus particulièrement au niveau des synapses.

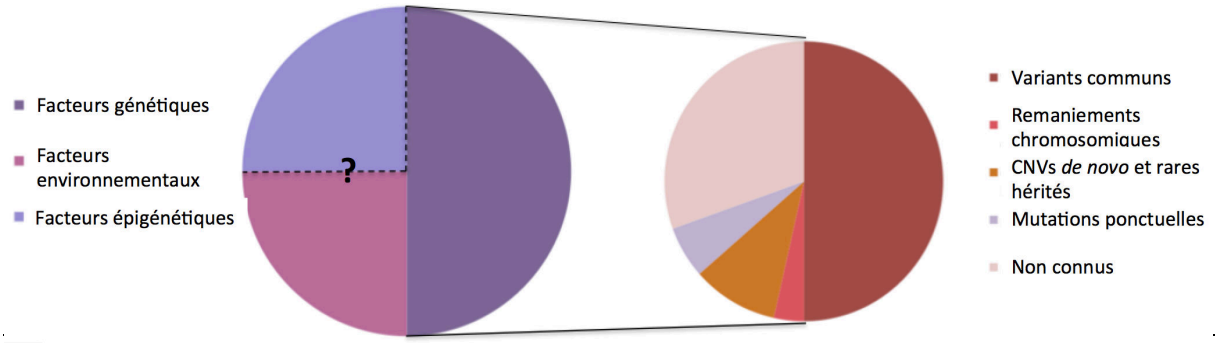


Figure 2 : Proportions relatives de facteurs mis en cause dans le développement des TSA. A gauche : causes diverses ; à droite : causes génétiques (ramenées / 100%)

Chez certains individus une seule mutation *de novo* suffit à induire le développement de TSA. Cette situation correspond à un modèle de gène majeur (un gène à forte pénétrance suffisant à lui seul pour causer les TSA); tandis que chez d'autres individus, c'est l'accumulation de variants à risque qui favorise et augmente la vulnérabilité aux TSA. Dans ce dernier cas, on se retrouve dans une situation correspondant à un modèle polygénique (présence de plusieurs variants hérités, chacun avec un faible effet, mais en association entre eux et avec la contribution de risques environnementaux, le risque d'atteinte de TSA est augmenté).

De plus, la présence de mutations *de novo* associée à des variants communs au sein d'un même individu va influencer le phénotype développé et ainsi expliquer la variabilité phénotypique observable entre différents patients (Figure 3). Il y a donc une interaction

entre les variants rares et communs dans le développement des TSA (Bourgeron 2015). Ces variants communs pourraient compenser ou augmenter à différents degrés les effets associés à la mutation *de novo*. Ainsi, la présence de plusieurs mutations et/ou d'allèles à risque ou de protection chez un même individu, peut induire le développement de TSA, et expliquer l'hétérogénéité et la complexité de ces troubles. Certains auteurs ont aussi suggéré que l'existence de variants hérités pourrait avoir un rôle « protecteur » contre des mutations causant les TSA, et ceci en particulier chez les femmes (Robinson et al. 2013; Ziats et Rennert 2016). Ces observations pourraient être en lien avec la prédominance plus forte des TSA chez les garçons. La prise en compte de la mutation principale causale, ainsi que le contexte génétique global sont des éléments importants dans l'évaluation de la gravité des troubles et peut expliquer la complexité des TSA.

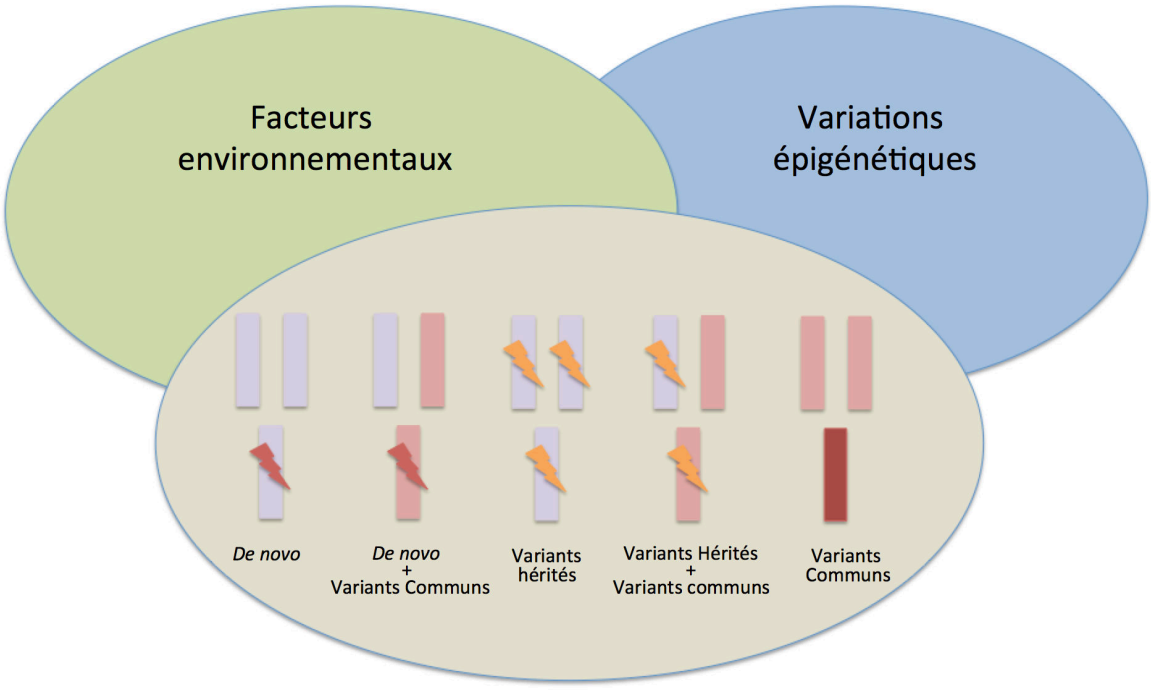


Figure 3: Implication des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. L'implication seule ou simultanée de ces facteurs va induire le développement de TSA et moduler les phénotypes observés. Figure modifiée selon Bourgeron et al. 2015.

Globalement, les études génétiques montrent qu'une cause génétique est identifiée chez environ 20% des patients, ceci par l'implication de nombreux gènes de vulnérabilité aux TSA, présentant différents types de mutations (*de novo*, héritées, CNVs, mutations ponctuelles). Ces observations permettent d'expliquer la difficulté rencontrée dans l'étude et la compréhension de ces troubles. Cependant, de nombreuses études récentes ont clairement démontré une convergence de ces gènes mutés vers un nombre plus restreint de voies biologiques déjà bien identifiées.

7-1-4/Gènes et réseaux fonctionnels

En analysant les réseaux d'interactions protéiques parmi les gènes impliqués dans les TSA, il a été trouvé que les mutations chez les patients TSA étaient enrichies pour les gènes codant pour des protéines de remodelage de la chromatine (O'Roak et al. 2012) ou impliqués dans des évènements neuronaux primordiaux tels que le guidage axonal, la motilité neuronale et la synaptogénèse (Gilman et al. 2011). Certaines études se sont intéressées aux différences et points communs des variants rares et des variants communs (Ben-David et Shifman 2012; Ben-David et Shifman 2013) en étudiant leur co-expression. Ces auteurs ont aussi démontré que des gènes mutés pouvaient être impliqués dans la plasticité neuronale, la synaptogénèse, la régulation de la transcription et le remodelage de la chromatine. En accord avec ces données, il a été montré qu'ils codent pour des protéines principalement exprimés dans les régions du cerveau associées à l'apprentissage, la mémoire et la perception sensorielle (Ben-David et Shifman 2012). Parmi les gènes associés aux TSA, 61% sont exprimés dans le cerveau dont 14% d'entre eux codent pour des protéines synaptiques (Huguet et al. 2013). A la fois des mutations ponctuelles rares et des CNVs *de novo* ont été identifiés au sein de gènes codant pour des protéines synaptiques chez des individus avec TSA (Huguet et al.

2013; Bourgeron 2016). Ces mutations ne représentent à elles-seules qu'un faible pourcentage des cas de troubles autistiques, en accord avec le modèle polygénique. Néanmoins, leur existence fournit des éclairages précieux sur les cascades moléculaires importantes dans la pathogénèse de ces troubles.

Des études fonctionnelles réalisées à partir de modèles expérimentaux ont montré l'impact de ces mutations sur la fonction synaptique.

Comme on pouvait s'y attendre, une grande partie des gènes identifiés ont un rôle dans le développement du cerveau, dans la formation et le fonctionnement des synapses et dans la neurotransmission. Cependant, d'autres voies semblent être impliquées (Figure 4) : synthèse protéique et métabolisme, modulation du processus de transcription, remodelage de la chromatine, signalisation calcique, voies mTOR (« mammalian target of rapamycin ») et voie ocytocine (Yoo 2015).

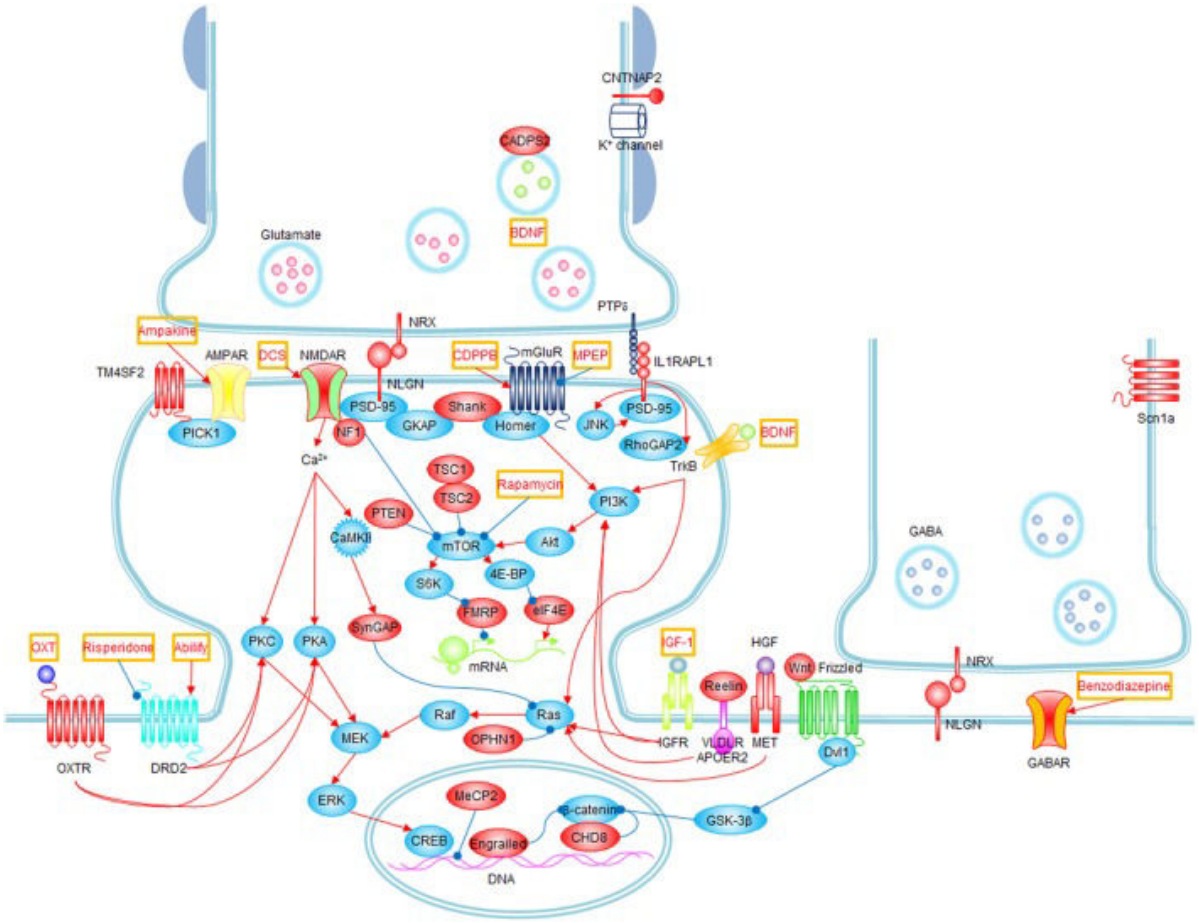


Figure 4 : Voies impliquées dans le développement de TSA et pistes de traitements. En rouge sont représentées les mutations ou polymorphismes associées aux TSA. Les flèches rouges correspondent à des activations tandis que les flèches bleues correspondent à des inhibitions. En rouge et en encadré jaune sont indiqués les traitements possibles et leurs cibles moléculaires. Figure issue de Won et al. 2013.

a/Voie synaptique : Gènes identifiés

Plusieurs centaines de gènes ont été identifiés comme gènes de vulnérabilité à l'autisme, certains étant associés de part la fonction de la protéine pour laquelle ils codent à un risque important. Cette catégorie de gènes à haut risque inclut des gènes synaptiques tels que les Neuroligines et *SHANK3* dont l'implication dans le développement des TSA a été identifiée au laboratoire. Les TSA font partie des synaptopathies qui correspondent à des troubles neuronaux causés par des dysfonctionnements synaptiques. De

nombreuses études ont démontré l'implication majeure de ce type de perturbations dans des troubles neurodéveloppementaux (Lepeta et al. 2016). La figure 5 décrit cette voie synaptique affectée dans les TSA.

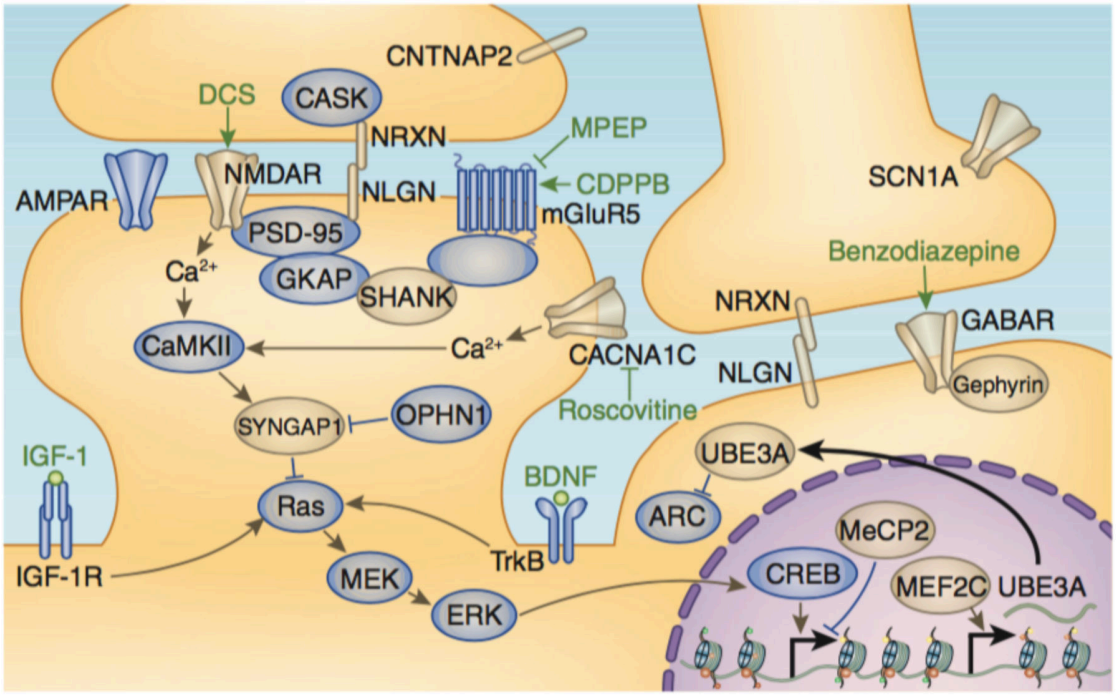


Figure 5 : Gènes synaptiques impliqués dans les TSA. Les gènes au sein desquels des mutations ont été détectées chez des patients TSA sont représentés en fond beige. En vert sont exposés des molécules agissant sur les comportements des patients ou reversant les phénotypes cellulaires. Figure issue de de la Torre-Ubieta et al. 2016.

Parmi ces gènes impliqués, sont décrits ci dessous certains d'entre eux particulièrement importants pour leur rôle synaptique:

- *NLGN*: Les neuroligines sont des protéines postsynaptiques d'adhésion cellulaire, elles sont transmembranaires et se lient aux neurexines qui sont présynaptiques. Cette interaction participe à la formation et au maintien des synapses. Le laboratoire a permis l'identification d'une mutation *de novo* de *NLGN4X* (Neuroligin 4, « *X-linked* ») chez deux frères avec une sévérité d'atteinte aux TSA différente (Jamain et al. 2003). En effet, l'un des frères présente un autisme

typique tandis que l'autre un syndrome d'Asperger. Ces observations reflètent bien le modèle multifactoriel influençant les phénotypes. Cette mutation a été transmise par la mère et ne le fut pas au troisième fils non atteint. Ce fut le premier gène synaptique associé aux TSA mettant en évidence un déficit possible de la voie synaptique dans les TSA. Il s'en est suivi, de nouveau au sein du laboratoire, l'identification d'une mutation au sein du gène *NLGN3* (Jamain et al. 2003) chez deux frères atteints (l'un d'autisme typique et l'autre d'un syndrome d'Asperger). Cette mutation fut ici aussi transmise par la mère. La prévalence de ces mutations chez les TSA est de 0,6-3,3% (Yoo 2015).

- *NRXN* : Les neurexines sont des protéines présynaptiques, formant un complexe trans-synaptique impliqué dans la formation de contacts synaptiques par interaction avec les NLGNs. Les NRXNs sont nécessaires à l'efficacité de la neurotransmission (Yoo 2015). Des mutations chez des patients atteints de TSA ont été détectées au sein des gènes *NRXN1* (Feng et al. 2006; Zahir et al. 2007), *NRXN2* (Gauthier et al. 2011), *NRXN3* (Vaags et al. 2012) et *NRXN4* aussi nommé *CNTNAP2* (Alarcón et al. 2008).
- *SHANK*: Ces gènes codent pour des protéines d'échafaudage synaptique. Des mutations de chacun des trois gènes de cette famille ont été associées aux TSA. Le laboratoire a fortement contribué à ces avancées. Des mutations ont tout d'abord été identifiées au sein du gène *SHANK3* (Durand et al. 2007) :

    - délétion de la fin de la région 22q13 à partir de l'intron 8 de *SHANK3* chez un patient autiste présentant une absence de langage et un retard mental.
    - insertion d'une guanine au sein de l'exon 21 de *SHANK3* chez deux frères autistes présentant des troubles du langage et un retard mental sévère. La

mutation n'est pas présente chez les parents et le frère sains, mais il est probable que la mère soit porteuse d'un mosaïcisme germinal (présence de cellules de génotypes différents au sein du pool germinal). Cette mutation provoque un décalage du cadre de lecture et induit l'expression d'une protéine tronquée.

- délétion de la partie terminale de la région 22q13 chez une fille atteinte de TSA présentant un retard de langage et une trisomie partielle de cette région chez son frère atteint du syndrome d'Asperger. La région en question contient 25 gènes dont le gène *SHANK3.*
- mutations rares non-synonymes chez 7 patients, non détectées chez les individus contrôles, mais hérités des parents sains.

Depuis, d'autres mutations *SHANK3* ont été mises en évidence chez des patients TSA.

Des mutations au sein du gène *SHANK2* ont été détectées chez des patients atteints de TSA (Pinto et al. 2010; Berkel et al. 2010). Le laboratoire a contribué à l'étude de cette association (Leblond et al. 2012) : une délétion *de novo* de 421kb a été identifiée chez un patient atteint de TSA et d'un retard mental modéré. De plus, il a été montré que des variants au niveau d'acides aminés conservés se trouvent enrichis chez les patients par rapport aux individus contrôles.

Enfin, il a aussi été détecté des mutations au niveau du gène *SHANK*1 (Sato et al. 2012).

- CNTN : Les contactines sont des molécules neuronales d'adhésion cellulaire. Elles ont un rôle important dans le développement neuronal tels que la neuritogénèse, le ciblage dendritique et axonale, la formation des synapses et leur plasticité (Murai et al. 2002; Shimoda et Watanabe 2009; Stoeckli 2010). Des mutations au sein des gènes *CNTN4* (Roohi et al. 2008; Cottrell et al. 2011), *CNTN5* et *CNTN6*

(Saus et al. 2010) ont été détectées chez des patients atteints de TSA. Au sein du laboratoire (Mercati et al. 2016), plusieurs CNVs (tous transmis) ont été identifiés chez des patients atteints de TSA : une délétion de *CNTN5* transmise par la mère atteinte à sa fille, une duplication de *CNTN5* (5 copies) chez une patiente atteinte de TSA et de TDAH, et une délétion de *CNTN6* chez 4 patients. Cette étude a aussi révélé un enrichissement de SNVs rares chez les patients TSA, ainsi que la présence de variants délétères supplémentaires chez les patients porteurs d'un variant *CNTN6*.

b/Traduction protéique

Le glutamate et le BDNF induisent l'activation de la voie mTOR avec pour effet une augmentation de la traduction protéique. Des défauts de cette voie induisent des défauts de traduction au sein des neurones et des synapses ainsi que des modifications de la densité synaptique (Tang et al. 2014; Bourgeron 2015). C'est aussi une voie essentielle dans la croissance et la prolifération cellulaire (Chen et al. 2015). Différentes études ont suggéré des altérations dans la traduction de protéines synaptiques (Kelleher et Bear 2008). En effet, des mutations affectant des gènes codant pour des protéines inhibant la traduction ont été détectées chez des patients TSA (*TSC1, TSC2, NF1* et *PTEN*) (Huguet et al. 2013). Ces protéines agissent en inhibant la voie PI3K-mTOR (Figure 6). En parallèle, des mutations au sein de gènes codant pour des protéines qui inhibent directement la traduction (*FMRP, CYFIP1*) ont été identifiées chez des patients (Huguet et al. 2013).

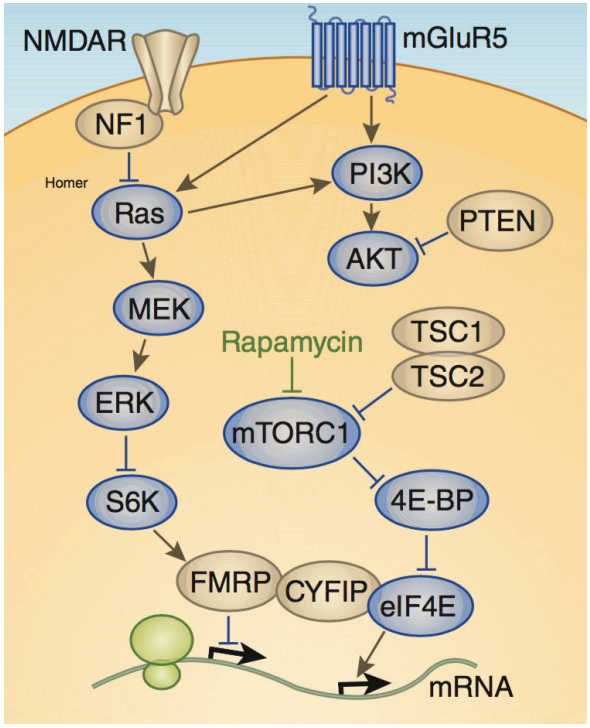


Figure 6 : Traduction protéique et TSA. Sur fond beige sont représentés les gènes pour lesquels des mutations ont été détectées chez les patients TSA. La rapamycine est représentée en vert. C'est une molécule destinée au traitement et qui permet d'agir sur la voie mTor. Figure issue de de la Torre-Ubieta et al. 2016.

7-1-5/Autisme syndromique

Ces syndromes comptent pour environ 10 à 20% des individus avec TSA et ces patients présentent souvent des dysmorphies (Chen et al. 2015). Le tableau 2 liste certaines formes d'autisme syndromique.

Syndromes	Mutation	Symptomes et comorbidités	Références
Neurofibromatose	NF1	Neurofibrome, troubles cognitifs, épilepsie, TSA	Garg 2013
Sclerose Tubéreuse	TSC1/TSC2	Désordres dont tumeurs bénignes de plusieurs organes (rein, poumons, cœur, yeux, peau), troubles de l'apprentissage, retard mental, automutilation, TOCs, ADHD, épilepsie, TSA	Curatolo 2004
Syndrome d'Angelman	Délétion 15q11-q13	Dysmorphies, retard développemental, troubles du sommeil, troubles du langage, ataxie, problèmes d'attention, épilepsie,hyperactivité, retard mental sévère, TSA	Smith et al. 1996; Bonati et al. 2007).
Syndrome de Cohen	COH1	Troubles oculaires, obésité, dysmorphie, retard mental, épilepsie, TSA	Howlin 2005
Syndrome de Down (Trisomie 21)	Trisomie du chromosome 21	Dysmorphies, retard mental, hypotonie, obésité	Moss 2016; Ji et al. 2011
Syndrome de l'X-Fragile	*FMR1*	Dysmorphies, troubles de l'apprentissage, troubles de la coordination motrice, retard mental, troubles du langage retard développemental, hyperactivité, hypersensibilité sensorielle TSA	Koukoui et al. 2007; Bhakar et al. 2012
Syndrome de Phelan-McDermid	Délétion 23q13.3	Dysmorphies, problèmes rénaux, retard développemental, retard mental, troubles du lanagage, TSA	Phelan et McDermid 2012
Syndrome de Potocki-Lupski	Duplication 17p11.2	Retard développemental, troubles du langage, hypotonie infantile, troubles cardio-vasculaires, retard mental, TSA	Potocki et al. 2007
Syndrome de Prader-Willi	Délétion 15q11-q13	Dysmorphies, obésité, TOCs, troubles de l'humeur et du comportement, retard mental léger, TSA	Lo et al. 2013
Syndrome de Rett	*MECP2*	Microcéphalie, troubles moteurs et cognitifs, épilepsie, retard mental, TSA sévères	Hagberg 1995; Steffenburg et al. 2001
Syndrome de Smith-Lemli-Opitz	DHCR7	Dysmorphies, troubles du sommeil, automutilation TSA	Bukelis et al. 2007
Syndrome de Smith-Magenis	Délétion 17p11.2	Dysmorphies, retard développemental, troubles du langage, auto-mutilation, troubles du sommeil, obésite, retard mental, TSA	Ori-Laje et al. 2010.
Syndrome de Timothy	CACN1C	Maladie cardiaque congénitale, arythmie cardiaque, troubles immunitaires, troubles cognitifs, TSA	Splawski et al. 2006
Syndrome de Williams-Beuren	Délétion 7q11.23	Troubles GI et cardiaques, hyperacousie, hypertonie, retard moteur, retard mental, absence d'inhibition sociale, TSA	Tordjman et al. 2012
Syndrome DeGeorge	Délétion 22q11.2	Troubles de plusieurs organes (cœur, rein, squelette, tube digestif), dysmorphie, troubles du système immunitaire, retard développemental, troubles mentaux, ADHD, TSA	Radoeva et al. 2014

Tableau 2 : Syndromes génétiques

a/Syndrome de Rett

Ce syndrome est un trouble neurologique progressif lié à l'X affectant entre autres le développement cognitif et les interactions sociales. Les symptômes se traduisent par un retard neuro-développemental, des convulsions et des TSA. Ce syndrome est causé par une mutation au sein du gène *MECP2* (« Methyl CpG binding protein-2 »). La protéine codée se lie à des CpG méthylés et régule ainsi leur expression. Les sujets atteints sont majoritairement des femmes et la mutation est souvent létale au stade embryonnaire chez les hommes.

Il est estimé qu'environ 40 à 97% des patients atteints de ce syndrome développent également des TSA (Ornoy et al. 2016).

b/Syndrome de l'X-Fragile (FXS)

Des TSA surviennent chez environ 21 à 50% des hommes atteints de FXS (Moss et Howlin 2009). Ce syndrome est causé par une expansion du trinucléotide CGG dans la région 5'-UTR du gène *FMR1* (Fragile Mental Retardation 1) situé sur le chromosome X. La sévérité est plus importante chez le genre masculin. Cette mutation induit une hyper-méthylation et ainsi l'extinction de ce gène (Bell et al. 1991). Le gène *FMR1* code une protéine d'interaction aux ARN, agissant ainsi le transport d'ARNm. Elle régule en particulier l'expression de protéines connues comme impliquées dans les TSA telles que les neuroligines, les neurexines et les SHANKs (Darnell et al. 2011) . Cette protéine joue ainsi un rôle dans la maturation dendritique et la plasticité synaptique.

c/Syndrome de Timothy

C'est une maladie très rare (moins de 20 cas au niveau mondial) dont les patients présentent des troubles neurodéveloppementaux (TSA, déficience intellectuelle et épilepsie). Tous les cas connus sont causés par des mutations d'un seul nucléotide au sein du gène *CACNA1C* codant pour le canal calcique CaV1.2 (canal calcique de type L). Entre 60 et 70% de ces patients présentent des TSA (Lai et al. 2014).

d/Syndrome de Phelan-McDermid (PMS)

Ce syndrome est causé par une délétion de la partie terminale du locus 22q13. Les symptômes consistent notamment en des dysmorphies, de l'hypotonie, un retard développemental, des troubles moteurs et un retard voire une absence de langage (Phelan et McDermid 2012). Au total, 600 individus ont été diagnostiqués atteints de ce syndrome. Dans la plupart des cas la mutation apparaît *de novo.* La région délétée varie en taille mais est en moyenne de 100kb et contient entre autres les gènes *ACR*, *SHANK3*,

and *RABL2B*. En 2001, une translocation entre les chromosomes 12 et 22 a été détectée chez un patient atteint de PMS. Cette translocation impliquait seulement le gène *SHANK3*, exposant le fait que ce gène soit responsable du développement de la maladie (Bonaglia et al. 2001). Ceci a été confirmé ultérieurement par d'autres études démontrant le rôle de SHANK3 dans ce syndrome (Wilson et al. 2003).

e/Sclérose Tubéreuse

C'est une maladie autosomale dominante qui est causée par des mutations au sein des gènes *TSC1* ou *TSC2*. Les patients atteints présentent pour 24 à 60% d'entre eux des TSA (Lai et al 2014). Les protéines codées par ces gènes inhibent la protéine Rheb (« Ras Homolog Enriched in Brain ») agissant ainsi négativement sur l'activation de mTORC1 (« Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 »). Des déficits en protéines TSC induisent une suractivation de la voie mTOR, entrainant une croissance et prolifération cellulaire, perturbant la synthèse de protéines dendritiques et entrainent des anomalies de la densité et morphologie des épines dendritiques. Ces mutations correspondent à l'une des voies moléculaires exposées précédemment.

f/Syndromes de Prader-Willi et d'Angelman

Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est causé par des modifications du locus 15q11-13 correspondant à une perte d'empreinte paternelle, une délétion, une translocation ou une disomie uniparentale maternelle (présence de deux allèles transmis par la mère, et donc absence de l'allèle paternel). La région en cause de ce syndrome comporte 16 gènes dont une partie est soumise à empreinte parentale. Les patients présentent une hypotonie à la naissance, une obésité ainsi que des troubles de l'apprentissage et du comportement. Le syndrome d'Angelman (SA) est quant à lui causé par la perte de

l'allèle maternel de ce locus. Le gène *UBE3A* (« E3 ubiquitin-protein ligase ») présent à ce locus n'est exprimé dans le cerveau que par son allèle maternel (Ornoy et al. 2016), dont la perte va induire le SA. Les patients sont atteints de déficit intellectuel, de troubles moteurs, d'absence de langage, d'épilepsie et de troubles du sommeil.

7-2/Immunité

Plusieurs études se sont intéressées à la possible contribution du système immunitaire dans le développement des TSA. Une étude de modèle murin a montré une connexion physique directe entre les vaisseaux lymphatiques reliés au système immunitaire et le cerveau, pouvant expliquer la présence de cellules immunitaires dans le cerveau. Ce résultat pose la question de l'existence d'un lien entre le système immunitaire et le développement de maladies neuronales (Louveau et al. 2015; Vijayakumar et Judy 2016). Des études chez des patients atteints de TSA ont démontré des différences de niveaux d'expression de gènes codant pour le complexe immunitaire inné (gènes principalement exprimés dans les lymphocytes NK) (Gregg et al. 2008), et plus précisément des analyses transcriptomiques (par RNA-seq) sur tissus *post-mortem* ont montré une augmentation de l'expression de gènes du système immunitaire (Voineagu et al. 2011; Gupta et al. 2014).

De plus, les patients atteints de TSA présentent une fréquence plus élevée d'état neuro-inflammatoire chronique, corrélé à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (Onore et al. 2012).

Une des comorbidités des TSA sont les troubles gastro-intestinaux. Les voies d'inflammation intestinale semblent être plus fortement déclenchées chez les enfants atteints de TSA et de TGI. Ces enfants présentent aussi des différences de composition

du microbiote (composition qui peut être altérée par un dysfonctionnement du système immunitaire (Dinan et al. 2015)) par rapport aux individus non atteints (Tomova et al. 2015). Cet aspect est intéressant car certains postulats présentent le système immunitaire comme l'une des connexions entre l'intestin et le cerveau, corrélant directement les données obtenues à partir des vaisseaux lymphatiques et celles du cerveau chez des modèles murins (Louveau et al. 2015). L'expression de gènes immunitaires dans le cerveau pourrait avoir des conséquences dans le développement du cerveau. Enfin des polymorphismes de plusieurs gènes associés au système immun ont été mis en cause dans les TSA : *CD99L2* (rôle dans l'extravasation de cellules immunitaires)(Ramos et al. 2012), ainsi que des allèles HLA (« Human Leucocyte Antigens ») tels que *HLA-DRB1* (Chien et al. 2012) et *HLA-A2* (Torres et al. 2006).

7-3/Autres

7-3-1/Environnement

Les variants génétiques peuvent pour certains induire à eux seuls les TSA. Cependant, d'autres variants vont conduire à la maladie en association avec des facteurs environnementaux (Vijayakumar et Judy 2016). Des études sont réalisées pour déterminer d'éventuelles interactions entre des facteurs environnementaux et le génome, qui pourraient ainsi induire le développement de TSA.

Des données épidémiologiques ont permis de distinguer des facteurs environnementaux pouvant augmenter les risques de développement des TSA (Chaste et Leboyer 2012). Certaines études ont associé aux TSA des risques environnementaux tels que des

complications prénatales, périnatales, au cours de l'accouchement et néonatales (Glasson et al. 2004; Maramara et al. 2014) (par exemple, un plus grand nombre de patients TSA ont été exposés à une pré-éclampsie par rapport aux individus non atteints, cette association étant augmentée avec la sévérité de la pré-éclampsie (Walker et al. 2015). Les résultats à ce sujet sont cependant controversés. En effet, des méta-analyses indiquent qu'une association directe entre les TSA et des complications au cours de la grossesse n'est pas évidente même s'il semble possible que ces complications puissent légèrement impacter le risque de développer des TSA. Il est à noter que ces méta-analyses n'excluent pas une association mais révèlent une nécessité d'augmenter la taille des études et l'amélioration des inclusions (Gardener et al. 2009; Gardener et al. 2011; Guinchat et al. 2012). Certaines études ont associé l'exposition à des produits chimiques aux TSA tel que le valproate (Roberts et al. 2007; Christensen et al. 2013), mais ces études doivent aussi être amplifiées. En ce qui concerne les vaccins, aucune preuve n'a été démontré quant à leur potentielle responsabilité de cas d'autisme (DeStefano et al. 2013; Madsen et al. 2002). Certaines études ont associé le diabète chez la mère (Li et al. 2016) ou les maladies autoimmunes maternelles (Chen et al. 2016), mais de la même façon ces résultats n'ont pas forcément été répliqués dans d'autres études (Hultman et al. 2002). Les informations exposées sur l'identification précise de facteurs extrinsèques demandent donc vérifications et réplications des analyses.

Un autre risque associé à l'autisme est l'âge du père. En effet, des études ont démontré que les hommes entre 40-50 ans avaient 2 à 5 fois plus de risque d'avoir un enfant atteint de TSA qu'un homme de moins de 30 ans (Reichenberg et al. 2006; Hultman et al. 2011). Il a été suggéré que cet aspect pouvait être du à des changements épigénétiques associés à l'âge au sein des cellules germinales, tels que des défauts de la méthylation de l'ADN (Hultman et al. 2011; Feinberg et al. 2015). L'âge de la mère augmente aussi le

risque mais sa contribution au développement de TSA est plus faible (Sandin et al. 2012; Lee et McGrath 2015).

Des facteurs environnementaux peuvent causer des stimuli qui vont ensuite modifier l'expression de gènes au sein de neurones par des évènements épigénétiques (cf. chapitre suivant) et induire certains troubles neurodéveloppementaux. Ainsi des facteurs environnementaux et génétiques peuvent être liés (Vijayakumar et Judy 2016).

7-3-2/Epigénétique

L'épigénétique réfère à des mécanismes induisant des changements de l'activité génique qui sont hérités mais qui ne sont pas causés par un changement de la séquence d'ADN. Les changements épigénétiques associés aux TSA correspondent principalement à des changements de la méthylation (Wong et al. 2014), mais il est possible que des modifications d'histones, de remodelage de la chromatine, de rétrocontrôle transcriptionnel et d'extinction de gènes par siRNA soient aussi impliqués (Ma et al. 2010).

Il est intéressant de noter que des modifications du processus de remodelage de la chromatine peuvent induire des mutations *de novo* pouvant potentiellement causer des TSA.

Une douzaine de gènes de modification de la chromatine ont été associés aux TSA (LaSalle 2013). Parmi eux, le gène *MECP2,* dont les mutations sont responsables du syndrome de Rett, code pour une protéine qui se fixe à l'ADN méthylé, forme un complexe avec d'autres protéines et éteint l'expression du gène.

Des mutations au sein du gène *CHD8* (« Chromodomain Helicase DNA binding protein 8 ») ont été régulièrement associées aux TSA. Ces mutations surviennent chez environ

0,4% des cas (O'Roak et al. 2012) et semblent présenter une forte pénétrance. Le gène *CHD8* code pour une protéine de remodelage de la chromatine ciblant notamment plusieurs gènes associés aux TSA tel que *SCN2A* (code pour un canal sodique) et *PTEN* (Cotney et al. 2015).

Le mécanisme de méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique jouant un rôle important dans le développement des TSA. En effet, une étude a été effectuée sur des jumeaux monozygotes exposés aux mêmes facteurs environnementaux mais dont un seul est atteint de TSA. Certaines différences de méthylation de l'ADN ont été observées au sein de ces paires de jumeaux (Wong et al. 2014). Des analyses de tissus *post-mortem* de patients et d'individus non atteints ont également montré des différences de méthylation (Ladd-Acosta et al. 2014). Une étude effectuée sur d'autres échantillons de cerveau a révélé une hypo-méthylation des régions impliquées dans le système immunitaire et une hyper-méthylation des gènes synaptiques (Nardone et al. 2014), ce qui corrèle avec une possible sur-activation du système immunitaire en cas de TSA ainsi qu'une inhibition des gènes impliqués dans le fonctionnement des synapses.

Plusieurs études ont démontré des différences de méthylation d'ADN à différents loci tels que *GABRB3, NLGN3, NRXN1, UBE3A, MECP2* et *OXTR* (le récepteur à l'ocytocine) dans le cortex frontal (Wong et al. 2014; Gregory et al. 2009; Nagarajan et al. 2006).

Enfin, il est aussi possible que des interactions « gène/environnement » influencent l'expression génique. Les systèmes immunitaires parentaux ou des toxines environnementales pourraient agir sur le stress oxydatif et la méthylation.

8/ Expression génique différentielle

Comme exposé précédemment, les patients atteints de TSA présentent des variations génétiques et épigénétiques. Il n'est donc pas étonnant que des différences d'expression puissent être observées. En effet, une étude (Voineagu et al. 2011) a permis de détecter 444 gènes exprimés différentiellement dans le cortex entre patients et contrôles, et de façon équivalente entre le cortex frontal et temporal, contre deux dans le cervelet, révélant que les changements d'expression génique au sein de TSA affectent principalement le cortex et ce de façon uniforme dans les différentes régions corticales. Aucune différence d'expression n'est observée entre ces deux régions corticales chez les patients TSA (alors que, comme attendu, c'est le cas chez les contrôles), exposant que les différences moléculaires normales, permettant une différenciation de ces régions, sont perturbées chez les patients. Ceci pourrait induire des anomalies de développement du cortex. Parmi tous ces gènes différentiellement exprimés entre les patients et les contrôles, 209 sont moins fortement exprimés et ont un rôle dans les fonctions synaptiques, tandis que les 235 gènes surexprimés sont impliqués dans les réponses immunitaire et inflammatoire. Ces résultats corrèlent de façon intéressante avec ce qui a été exposé précédemment. Une analyse de co-expression de gènes présentant des différences entre les patients et les individus contrôles a permis de distinguer deux « modules fonctionnels »: le premier module est enrichi en marqueurs neuronaux dont des gènes synaptiques, le second module comporte des gènes marqueurs des astrocytes et de la microglie, ainsi que des réponses immunitaires et inflammatoires. En associant ces données à celles de GWAS, les auteurs (Voineagu et al. 2011) ont détecté une convergence pour les gènes synaptiques mais pas pour les gènes du système immunitaire, leur faisant suggérer que les modifications d'expression pour ces derniers

seraient secondaires ou causées par des facteurs environnementaux. Ces observations ont été reproduites par d'autres auteurs (Gupta et al. 2014).

Une méta-analyse (Ch'ng et al. 2015) de 12 études d'analyse transcriptomique a été réalisée, avec un total de plus de 1000 individus dont 634 atteints de TSA, comprenant des échantillons de cerveau et des échantillons sanguins. Au niveau du cerveau, une surexpression de 30 gènes et un déficit d'expression de 49 gènes ont été simultanément détectés, tandis qu'au niveau sanguin 160 gènes sont surexprimés et 95 sous-exprimés.

9/Défauts du développement du cerveau de patients TSA

Des analyses neurobiologiques (électrophysiologie, neuro-imagerie fonctionnelle et structurale) ont identifié certaines anomalies dans le cerveau de patients atteints de TSA.

Des études par imagerie de résonnance magnétique (IRM) ont démontré une augmentation du volume global du cerveau (Courchesne 2002; Courchesne et al. 2001; Hazlett et al. 2011) chez les enfants de moins de 5 ans. Cet aspect disparaît à des âges plus tardifs (Courchesne et al. 2011). Plus précisément, une augmentation du volume de l'amygdale est détectée chez des enfants (2 à 12 ans) atteints de TSA (Nordahl et al. 2012; Schumann et al. 2004) qui ne l'est plus à l'adolescence (12 à 18 ans) (Schumann et al. 2004) (Figure 7). De même, il a été observé une accélération de l'extension du cortex chez les enfants atteints de TSA (Hazlett et al. 2005; Schumann et al. 2010; Carper et Courchesne 2005), suivi d'un amincissement au cours de l'adolescence et de l'âge adulte (Zielinski et al. 2014; Wallace et al. 2010). L'âge semble donc avoir un impact dans les modifications de développement cérébral chez les patients TSA. D'autres analyses d'IRM

ont noté une formation anormale du gyrus cortical (Wallace et al. 2013; Yang et al. 2016; Ecker et al. 2016) induisant des malformations du cortex chez les patients telles qu'une augmentation du nombre de petits plis ou de la taille du gyrus. Ces données traitant du cortex mettent l'accent sur l'implication du cortex dans les TSA.

La même technique a démontré une diminution du volume du corps calleux qui semble aussi corrélée au développement de TSA (Frazier et Hardan 2009). Cependant, une méta-analyse (Lefebvre et al. 2015) rapporte qu'aucune différence significative de volume ne peut être mise en évidence en ce qui concerne le volume du corps calleux et celui du cerveau entier. L'interprétation des données IRM n'est pas immédiate et comprend certaines limites.

Des études *post-mortem* ont démontré une réduction du nombre de neurones de l'amygdale, du gyrus fusiforme et du cervelet ainsi qu'une neuro-inflammation (Lai et al. 2014). Par contre, une étude réalisée sur des tissus cérébraux issus d'enfants et d'adolescents (2 à 16 ans) a révélé une augmentation du nombre de neurones dans le cortex préfrontal et non pas une diminution (Courchesne et al. 2011). Un point important à noter sur les études réalisées à partir de tissus *post-mortem* est que la majorité des ces tissus proviennent d'adultes, d'adolescents ou de pré-adolescents et que donc elles ne représentent pas la situation du développement précoce. De plus, le délai *post-mortem* peut différer selon les individus analysés ainsi que les causes de décès.

Enfin une malformation des mini-colonnes corticales (colonnes verticales de cellules pyramidales qui gravissent radialement à travers les différentes couches du cortex) a été observée (diminution de la taille, augmentation de la densité neuronale (Casanova et al. 2006) (Figure 7).

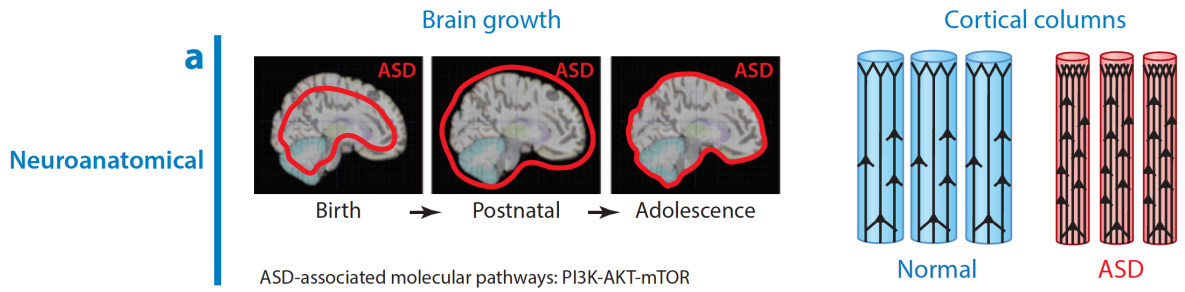


Figure 7 : Défauts de croissance du cerveau et de l'organisation corticale chez les patients atteints de TSA. La taille du cerveau de patients TSA est plus importante durant l'enfance mais cette différence se résorbe à l'adolescence. Une désorganisation des minicolonnes du cortex est observée avec une diminution de leur taille et une augmentation de leur densité cellulaire. Figure issue de Chen et al. 2015.

De nombreuses causes et voies moléculaires ont été associées aux TSA. Parmi elles, la voie synaptique semble avoir un impact important. Quelles sont les perturbations synaptiques observées dans les TSA ? Quels aspects de la synapse peuvent influencer sur le développement de ces troubles ?

II/Synapses

A l'issue de leur migration vers la région cible, les neurones émettent de leur corps cellulaire des prolongements cellulaires appelés neurites. Ces neurites forment les dendrites et un axone à l'extrémité duquel se trouve un cône de croissance. Ce cône de croissance interagit avec le cytosquelette, les cellules gliales et d'autres neurones. Il est sensible à l'environnement cellulaire, agit comme un senseur et oriente l'élongation des neurites de manière à ce que les neurones s'organisent en réseaux et forment des synapses avec des neurones pouvant être éloignés. Lorsqu'un contact est établi entre

deux neurones, l'axone va pouvoir transmettre des signaux à son partenaire post-synaptique. Les dendrites, une fois développés, sont essentiels à la transmission de l'information nerveuse et leur morphologie est minutieusement régulée.

1/Développement dendritique

Pendant le développement, l'arbre dendritique est dynamique, de nouveaux branchements sont formés, d'autres sont supprimés (Jan et Jan 2003). Cette dynamique démarre par une croissance dendritique lente suivie d'une phase rapide puis d'une longue phase de stabilisation (Williams et Truman 2004). Dans le cortex préfrontal humain, la croissance des dendrites du pôle basal des neurones pyramidaux débute aux alentours de 13 à 17 semaines de gestation (en fonction de la couche corticale) et s'étend durant la première année. Elle est suivie d'une phase de croissance plus lente (Mrzljak et al. 1992; Koenderink et al. 1994; Koenderink et Uylings 1995). Pour certaines cellules pyramidales telles que celles de la couche IIIC et de la couche V du cortex humain, la dendritogénèse se poursuit, au delà de la première année, entre deux et cinq ans (Koenderink et Uylings 1995; Martínez-Cerdeño 2016; Petanjek et al. 2008). Il est aussi intéressant de noter qu'en parallèle, dans certaines régions tel que le cortex préfrontal, le volume du corps cellulaire des cellules pyramidales augmente.

Cette mise en place de l'arbre dendritique est régulée par l'expression de certains gènes ainsi que par de nombreux signaux extracellulaires (Martínez-Cerdeño 2016). Au cours de ce processus, les réseaux d'actine et de microtubules ont un rôle primordial, et un déficit à ce niveau va perturber l'organisation complexe de l'arbre dendritique ainsi que sa taille, ceci pouvant être à l'origine de troubles neuro-développementaux tels que les TSA (Urbanska et al. 2008).

1-1/ Rôles des protéines d'échafaudage

Des protéines d'échafaudage connues tels que PSD95, SHANK et Densin-180 ont un rôle important, non seulement dans le maintien des synapses, mais aussi au préalable dans l'élaboration et la croissance des neurites.

1) Protéines SHANK (SH3 and multiple ankyrin repeat domains) : il s'agit d'une famille protéique de larges molécules qui interagissent avec de nombreux partenaires. L'expression de ces protéines augmente avec la maturation neuronale (Sala et al. 2001). Elles sont exprimées dans tout le neurone (corps cellulaire, dendrites et synapses) et sont associées à la cortactine (protéine d'interaction à l'actine) (Du et al. 1998). Ces protéines pourraient ainsi intervenir dans la mise en place du cytosquelette au sein des dendrites et dans l'élaboration de l'arborisation dendritique. A ce niveau, une autre interaction protéique, entre Shank et Densin-180 intervient en modulant le réarrangement de filaments d'actine. La protéine Densin 180 favorise l'organisation du réseau d'actine, et Shank en se liant à Densine-180 régule négativement son effet (Quitsch 2005). Une perturbation de la stœchiométrie du complexe protéique formé induirait un déséquilibre dans la dynamique des réseaux de microtubules et de filaments d'actine et perturberait le développement des dendrites.

2) La protéine PSD95 (Post-Synaptic Density-95) : lors du développement neuronal, PSD95 joue un rôle de régulateur négatif des branchements dendritiques (Charych et al. 2006). La surexpression de PSD95 dans des neurones immatures réduit l'arborisation dendritique tandis que l'inhibition de son expression l'augmente. Ces données tendent à montrer que PSD95 exerce un contrôle négatif sur la dendritogenèse. Ce contrôle s'exercerait probablement par une

désorganisation des microtubules (Charych et al. 2006). Cette protéine d'échafaudage exerce un premier rôle dans le développement de dendrites en agissant sur les réseaux d'actine et de microtubules, indépendamment de sa fonction purement synaptique. La forme non synaptique de PSD95 agit grâce à ses deux interacteurs protéiques Cypine et Snapine, réorganisant, par son interaction avec ces protéines, les microtubules et modifiant de ce fait la croissance et l'arborisation des dendrites. La Cypine se lie directement aux molécules de tubuline favorisant l'organisation des microtubules tandis que la Snapine agit en empêchant cette action de la Cypine (Akum et al. 2004; Chen et al. 2005; Charych et al. 2006).

3) La protéine Homer : Cette protéine s'exprime tout au cours du développement (Shiraishi et al. 2004). Elle joue à la fois un rôle important dans le guidage axonal (Foa et al. 2001) et la mise en place de l'arborisation dendritique par l'intermédiaire de son effet de régulation des flux calciques (Tanaka et al. 2006).
4) La protéine GRIP1 : Cette protéine est impliquée dans la mise en place des dendrites. Une perte d'expression perturbe l'initiation de la formation des dendrites et réduit leur densité (Hoogenraad et al. 2005).
5) La protéine Neurabine : Cette protéine se fixe à l'actine-F et par cette liaison permet la formation de dendrites (Terry-Lorenzo 2002). L'inhibition de son expression réduit la formation de neurites (Nakanishi et al. 1997).

1-2/ Rôles des Contactines

En parallèle de ces protéines d'échafaudage, une autre famille protéique agit sur la neuritogénèse : les contactines (CNTNs). Comme décrit précédemment, ce sont des

molécules d'adhésion cellulaire. La famille CNTN est composée de 6 membres (CNTN1-6) et fait partie de la sous-famille des Ig-CAM (« cell adhesion molecule »). Les CNTNs ont un rôle important dans le développement neuronal et particulièrement dans la formation des neurites (Shimoda et Watanabe 2009). Les différentes CNTNs ont des propriétés cellulaires distinctes. Par exemple, la CNTN4 joue un rôle dans le guidage axonal dans le bulbe olfactif (Kaneko-Goto et al. 2008). La CNTN6, quant à elle, favorise la croissance des dendrites apicaux du cortex (Ye et al. 2008).

Au laboratoire, nous avons réalisé une étude comparative des contactines 4-6 sur la neuritogenèse en focalisant sur deux propriétés particulières : l'élongation des neurites et l'arborisation dendritique. Nous avons plus particulièrement analysé le rôle de formes solubles de ces protéines extracellulaires exprimées par des cellules HEK (« Human Embryonic Kidney ») co-cultivées avec des neurones corticaux de rat maintenus en culture. Les formes solubles des CNTNs sont libérées après hydrolyse d'un groupement GPI qui les maintient initialement à la membrane. Nos observations démontrent l'existence d'effets variés d'une CNTN à l'autre : les CNTN4 et CNTN6 favorisent la longueur des neurites tandis que CNTN5 augmente particulièrement l'arborisation des dendrites et le nombre de branchements (Mercati et al. 2013, article présenté en annexe).

1-3/ Rôles de molécules régulatrices

La formation des dendrites est également rendue possible grâce à l'action de molécules régulatrices à des positions précises. Par exemple, la Kalirine7, qui est un facteur d'échange de Rac1, permet l'augmentation du volume des épines lorsqu'il se situe au niveau de la PSD. Mais s'il est mal localisé au sein du neurone (comme par exemple au

niveau du corps cellulaire), il va induire une formation anormale de neurites (Penzes et al. 2001). Le positionnement adéquat de ce type de molécules se fait par l'interaction de protéines d'échafaudage avec des protéines motrices (Kneussel 2005). Notamment, il a été démontré une interaction entre PSD95 et KIF1Bα, la myosine et la dynéine (Mok et al. 2002; Naisbitt et al. 2000), de même que GRIP1 interagit avec KIF5 (Kinesin related protein 5) (Setou et al. 2002).

2/Caractérisation des synapses

Les synapses correspondent aux lieux de contact et de transmission de signaux entre deux neurones. Elles sont composées d'un compartiment pré-synaptique et d'un compartiment post-synaptique qui se juxtaposent. Il existe deux sortes de synapses :

- les synapses électriques, au sein desquelles s'effectuent des transferts d'ions chargés et de petites molécules.
- les synapses chimiques au niveau desquelles l'activité électrique est transférée dans un sens unique, d'un neurone (pré-synaptique) à un autre (post-synaptique) grâce à des molécules chimiques. Suite à la propagation de potentiels d'action, une forte augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire au sein du bouton pré-synaptique, causée par l'activation de canaux calciques voltage-dépendants (tels que Cav2.1 et CaV2.2) est détectée par le senseur calcique synaptotagmine 1 (protéine de trafic cellulaire). La synaptotagmine 1 induit des modifications du complexe SNARE (SNAP = « Soluble NSF Attachment Protein » Receptor) qui active la fusion des vésicules contenant des neurotransmetteurs avec la membrane plasmique. Les neurotransmetteurs sont

ainsi libérés dans la fente synaptique (espace entre les deux protrusions) et se fixent ensuite aux récepteurs situés sur la membrane de la région post-synaptique. Le compartiment post-synaptique est composé de récepteurs aux neurotransmetteurs, de canaux et de molécules de signalisation. Cette liaison aux récepteurs va induire l'activation des molécules de signalisation intracellulaires, l'ouverture de canaux et la propagation du flux nerveux.

Au sein de synapses chimiques se trouvent deux sous-catégories: les synapses excitatrices dont le neurotransmetteur est le glutamate, ces synapses sont aussi nommées synapses glutamatergiques, et les synapses inhibitrices dont le neurotransmetteur est le GABA (« γ-aminobutryic acid » ou acide gamma aminobutyrique), ces synapses sont appelées synapses GABAergiques. Ces deux types de synapses présentent des différences de composition. Dans le cadre de nos études, nous nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux synapses glutamatergiques.

2-1/Densité Post-Synaptique

La microscopie électronique a permis de visualiser une région plus dense au niveau du compartiment post-synaptique, qui est nommée PSD (« Post-Synaptic Density »). Cette densité visible (Figure 8) est due à une forte concentration de protéines. La PSD serait constituée de 300 à 400 protéines différentes (Peng et al. 2004; Jordan et al. 2004). Les protéines PSD95, GKAP, SHANK et Homer correspondraient à environ 27% de la composition totale (Sugiyama et al. 2005). Elle est organisée en un échafaudage protéique dense situé sous la membrane et interagissant avec les protéines intramembranaires tels que des récepteurs et des molécules d'adhésion (Figure 8). En

plus de protéines d'échafaudage (telles que Homer1-3, SHANK1-3 et PSD95), au sein de la PSD se trouvent aussi des molécules de signalisation et des filaments du cytosquelette (Yoshihara et al. 2009; Lepeta et al. 2016).

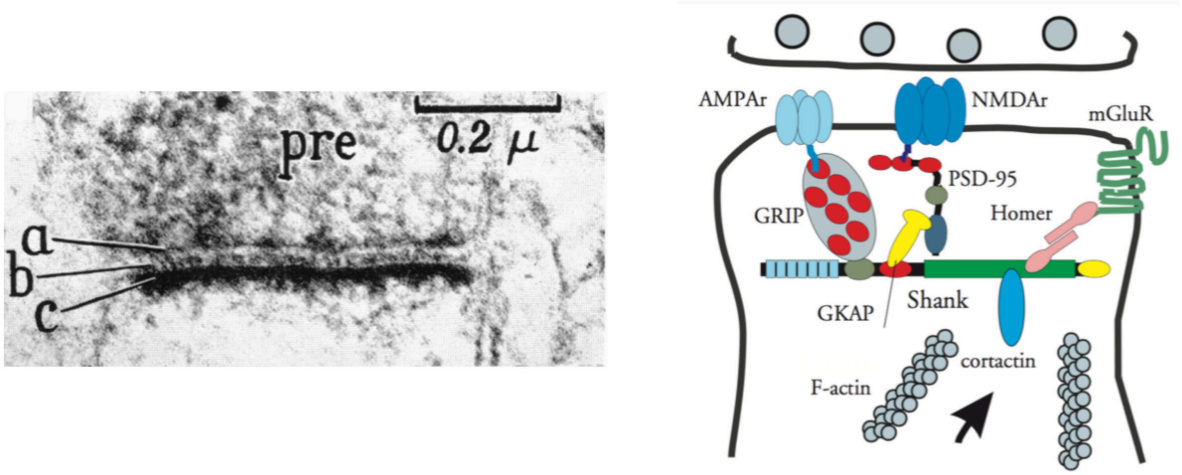


Figure 8 : Densité Post-synaptique. A gauche : PSD visualisée par microscopie électronique. a) partie pré-synaptique, b) partie post-synaptique, c) matériel extracellulaire observé au niveau de la clef synaptique. Figure issue de Gray 1959. A droite : Schématisation de la PSD comportant des récepteurs membranaires ainsi que des protéines d'échafaudage. Figure issue de Sheng et Kim 2000.

2-1-1/Récepteurs glutamatergiques

Au sein de la catégorie des récepteurs glutamatergiques, il existe deux sous-catégories :

- Les récepteurs ionotropiques (iGluRs), qui sont des tétramères protéiques intégrés à la membrane, composés de différentes sous-unités et correspondant à des canaux ioniques dépendants de ligands, parmi lesquels se trouvent :
    - les récepteurs AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole proprionique), hétérotétramères de sous-unités différentes : GluA1-4, ou homotétramères de GluA1 perméables au Ca^{2+}. La forme majoritaire au sein des neurones est composée de GluA2 et est imperméable au Ca^{2+} (Isaac et al. 2007). Les AMPARs permettent des courants de dépolarisation rapide. La dépolarisation qui suit l'activation de AMPARs

va pouvoir induire des flux calciques causés par l'activation de canaux calciques voltage-dépendants. Les courants permis par ces récepteurs sont nécessaires à la stabilisation des épines (Ethell et Pasquale 2005). De plus, leur activation, en augmentant modérément les concentrations de Ca^{2+}, va permettre de modifier la forme des épines motiles en une forme plus régulière avec une tête d'épine, agissant donc ainsi sur la diminution de la motilité de ces épines et leur stabilisation (Fischer et al. 2000).

  - Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) sont composés de deux sous-unités GluN1 et deux sous unités GluN2 ou GluN3 (les compositions majoritaires sont GluN1/GluN2A et GluN1 et GluN2B (Sanz-Clemente et al. 2013). Les canaux s'ouvrent en fonction du voltage, ils présentent une plus forte perméabilité au calcium que les AMPARs et se couplent à des effecteurs de signalisation intracellulaire tel que la CamKII, (« Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II ») importante pour l'homéostasie calcique et l'activité du neurone. Les NMDARs ont donc principalement un rôle dans la modulation des réponses synaptiques. Ces récepteurs agissent aussi sur la morphologie des épines. L'activité des NMDARs induit des potentialisations à long terme ou LTP (« Long Term Potentiation ») qui vont conduire en la croissance de filopodes et d'épines), ainsi qu'en l'augmentation du nombre de synapses et de la taille des épines (Ethell et Pasquale 2005; Hosokawa et al. 1995; Toni et al. 1999). Ces mécanismes participent à la plasticité des circuits neuronaux et à une efficacité durable de la transmission synaptique.

- Les récepteurs métabotropiques (mGluRs) sont des récepteurs couplés aux protéines G. Ils initient une cascade de signalisation permettant l'activation de

canaux ioniques, dont ceux du réticulum endoplasmique (RE), entrainant la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires situés au sein du RE. Ces récepteurs agissent aussi sur la morphologie des épines dendritiques induisant une morphologie associée à des épines moins fonctionnelles (élongation des épines) (Vanderklish et Edelman 2002).

Il est intéressant de noter que la stimulation des NMDARs induit des changements dans l'efficacité synaptique, tels que des LTP, LTD « Long-term depression » et permet le développement d'épines dendritiques. L'activation de AMPARs induit plutôt une stabilisation des synapses (Fischer et al. 2000). Les NMDARs permettant les flux calciques et les AMPARs ne les permettant que de façon très réduite, la mesure du ratio AMPA/NMDA indique ainsi une mesure relative de l'expression de ces récepteurs. La comparaison entre deux situations permet de mesurer un changement dans la transmission par les AMPARs ou NMDARs, de leur relative contribution et de l'excitabilité.

2-1-2/Protéines d'échafaudage de la PSD

En résumé, PSD95 se lie aux récepteurs glutamatergiques ionotropiques, Homer aux récepteurs glutamatergiques métabotropiques. Ces deux protéines se lient aussi aux Shank et vont ainsi former cet échafaudage qui peut interagir avec les filaments d'actine.

- SHANK : Cette protéine est un élément clef de cet échafaudage. Cette famille sera détaillée dans un chapitre présenté ultérieurement.
- PSD95 : Cette protéine se fixe à la sous-unité NR2 des NMDARs et de manière indirecte permet de faire le lien entre la PSD, le cytosquelette d'actine et les réserves de Ca^{2+} (par exemple au sein du réticulum endoplasmique situé au niveau des épines

dendritiques). Des études sur neurones d'hippocampe ont montré que PSD95 est mobilisé dans les compartiments post-synaptiques avant les NMDARs, jouant un rôle éventuel dans le recrutement et l'ancrage de ces récepteurs (Friedman et al. 2000). Des études utilisant des souris invalidées pour le gène de PSD95 ont montré l'absence d'anomalie dans la localisation des récepteurs NMDA (Migaud et al. 1998). D'autres protéines de la PSD sont probablement impliquées dans cet adressage des récepteurs à la membrane. Cependant, l'absence de PSD95 induit des défauts de plasticité, et sa surexpression une augmentation à la fois du nombre d'épines dendritiques, de leur volume et de la quantité de récepteurs AMPA (El-Husseini et al. 2000; Migaud et al. 1998). Les AMPARs peuvent être recrutés par PSD95 via la protéine Stargazine (Schnell et al. 2002).

- Homer : Cette protéine se fixe aux mGluRs et aux récepteurs IP3 (« Inositol trisphosphate») (Xiao et al. 2000). Homer est impliqué dans la maturation d'épines et l'augmentation de volume des épines (Sala et al. 2001). Homer se fixe à ses partenaires de la famille SHANK et coopère ainsi pour augmenter l'accumulation des protéines de la PSD dans les épines ainsi que des récepteurs IP3 (IP3R). Les IP3Rs sont des récepteurs à canaux calciques principalement situés au niveau du réticulum endoplasmique. Un variant d'Homer (Homer1a), ne possédant pas les domaines nécessaires pour former des multimères, est exprimé en fonction de l'activité neuronale et agit en tant que de dominant négatif, entrainant ainsi une diminution de la taille et du nombre d'épines dendritiques.

Ainsi, ces interactions protéiques relient indirectement différentes catégories de récepteurs, et permettent entre autres des inductions de relargage de Ca^{2+} des réserves intracellulaires via l'activation des IP3R.

2-2/Formation des épines

Le long des dendrites se forment des épines dendritiques qui sont des protrusions membranaires. Il existe deux catégories de protusions : les filopodes et les épines (Figure 9).

Différents stimuli vont induire la formation ou la modification de ces épines permettant ainsi la régulation de la transmission synaptique. Ces épines ne sont pas figées mais peuvent présenter des modifications de morphologie qui démontrent leur maturation et leur plasticité.

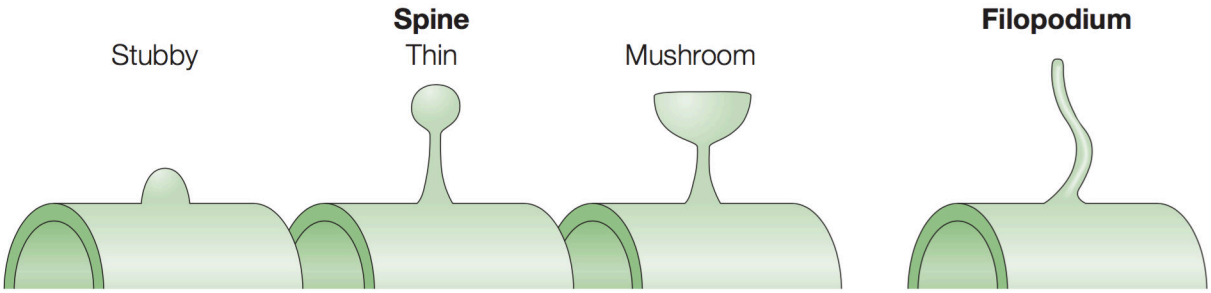


Figure 9 : Catégories des protusions dendritiques. Deux catégories sont décrites : les épines et les filopodes. Parmi les épines, se trouvent les épines dites « stubby », « thin » et « mushroom ». Figure issue de Yuste et Bonhoeffer 2004.

2-2-1/Filopodes

Au cours de la synaptogénèse, des filopodes dendritiques vont se former. Ce sont des prolongements fins et allongés, sans tête et la plupart d'entre eux sont sans PSD. Ils sont très motiles et flexibles, ce qui leur permet d'aller chercher des partenaires et de former des contacts. Ils n'ont pas à ce moment la machinerie nécessaire pour un fonctionnement synaptique. Chez la souris il a été estimé qu'environ 10-20% des filopodes donnent lieu à des épines et que la majorité d'entre elles vont ensuite

disparaître (Yoshihara et al. 2009). Ces proportions restent variables au cours du développement. Une étude a démontré qu'une réduction de la motilité des filopodes diminue la synaptogenèse à des stades précoces du développement (Kayser et al. 2008). Les protrusions sont essentielles à l'établissement de synapses matures et fonctionnelles et la protéine CamKII est importante dans ces étapes de maturation en favorisant la formation initiale de filopodes.

Des protusions peuvent aussi directement se transformer en épines fonctionnelles (Engert et Bonhoeffer 1999; Trachtenberg et al. 2002). Ces épines ont de longs « cous » et des petites têtes, permettant de les distinguer plus difficilement d'un point de vue morphologique des filopodes, mais leur motilité est par contre réduite (Yoshihara et al. 2009).

2-2-2/Epines dendritiques

Différentes catégories d'épines ont été établies (figure 9): « thin, stubby, mushroom » sur la base de critères spécifiques (Nimchinsky et al. 2002; Peters et Kaiserman-Abramof 1970), ci-dessous sont données des valeurs caractéristiques obtenues sur neurones pyramidaux de cortex de rat :

-« mushroom » : large tête et cou étroit, en forme de champignon, représente la forme la plus mature, longueur moyenne 5μm ; longueur moyenne du cou 0,8 μm et dimension moyenne de la tête 1,4x0,6μm

-« stubby » : pas de constriction importante entre la tête et la base, longueur moyenne 1μm

-« thin » : petite tête et cou étroit, longueur moyenne 1,6μm ; longueur moyenne du cou 1,1μm et dimension moyenne de la tête 0,6μm

La densité des épines est plus faible au niveau des dendrites basaux (dendrites émergeant de la base du neurone pyramidal) par rapport aux dendrites apicaux (dendrite émergeant du sommet du neurone pyramidal), et cette densité varie avec la distance par rapport au corps cellulaire (Benavides-Piccione et al. 2013).

Chaque type d'épines a un fonctionnement différent : les « mushroom » et « stubby » sont stables et vont former des synapses persistantes très fonctionnelles, tandis que les « thin » sont assez instables, motiles, de courte durée de vie et moins actives (Rochefort et Konnerth 2012; Martínez-Cerdeño 2016).

Au sein de ces épines, un enrichissement en actine et en protéines d'interaction à l'actine est observé, ce qui induit une modulation des épines selon le dynamisme de l'actine-F (mécanismes de polymérisation/dépolymérisation) (Chazeau et Giannone 2016).

2-2-3/Formation et maturation des synapses

La synapse se crée lors d'un contact s'établissant entre une terminaison pré-synaptique et une terminaison post-synaptique. Comme évoqué précédemment, ceci est permis par des molécules d'adhésion cellulaires (CAMs) tels que les neuroligines (post-synaptiques) et les neurexines (pré-synaptiques) qui se lient entre elles à travers la clef synaptique. Elles permettent ainsi de maintenir et de stabiliser un contact synaptique. Ces CAMs ont à la fois un rôle dans la formation de synapses et leur maintien. Pour rappel, il est intéressant de noter que parmi les gènes associés aux TSA se trouvent *NRXN* et *NLGN*, exposant ainsi un potentiel défaut au niveau de la formation et du maintien des synapses chez les patients TSA. En effet, il a été montré qu'une suppression des NLGNs induisait une diminution du nombre de synapses (Dahlhaus et al. 2009; Shipman et al. 2011).

Une fois un contact établi, la morphologie des protusions change. Les différentes protéines nécessaires à l'établissement et au fonctionnement de la synapse vont

s'accumuler. Elles vont développer une PSD, ce qui va induire une augmentation du volume de la tête. La structure se stabilise et l'épine devient fonctionnelle (Zuo et al. 2005). Cette augmentation de volume est parfaitement corrélée à l'accumulation de AMPARs (Zito et al. 2009) et du cytosquelette d'actine (Honkura et al. 2008). De plus, il y a aussi corrélation entre la taille de la tête de l'épine et la force du maintien de la synapse, probablement relié à la quantité des AMPARs (Kasai et al. 2003).

2-3/Synaptogénèse

La synaptogénèse se déroule en différentes phases (Figure 10) avec en premier lieu une importante formation de synapses, dont une grande partie ne sera plus présente à l'âge adulte (beaucoup sont éliminées vers la puberté). Plusieurs vagues ont lieu. Cinq phases chez l'homme se distinguent (Bourgeois 2008) :

- Phase1 : dès 280 jours de gestation, a lieu dans le protocortex
- Phase 2 : aux alentours de 12-17 semaines, a lieu dans le cortex embryonnaire qui présente déjà une activité spontanée
- Phase 3 : vers 20-24 semaines jusqu'à la petite enfance (2-3 ans), consiste en la formation d'une grande quantité des synapses
- Phase 4 : a lieu durant la suite de l'enfance et correspond à une phase durant laquelle le nombre de synapses ne varie pas et reste à son niveau maximal, avec une forte diminution à la fin de cette phase
- Phase 5 : a lieu durant la vie adulte et correspond à une phase figée du nombre de synapses.

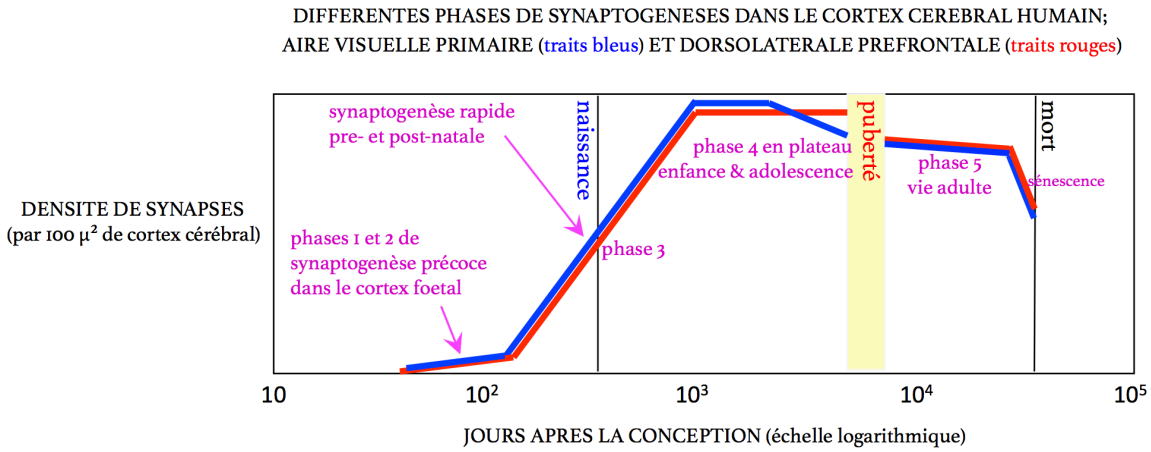


Figure 10 : Différentes phases de la synaptogénèse dans le cortex cérébral humain. Les traits bleus correspondent à l'aire visuelle primaire, les traits rouges à la région dorsolatérale préfrontale. Figure adaptée de Bourgeois 2008.

Au cours du développement, la formation des synapses est principalement réalisée par l'extension de nombreux filopodes dont certains vont pouvoir entrer en contact avec des cônes de croissance et ainsi créer des synapses. Les stimuli induisant des LTP vont permettre une augmentation de l'extension des filopodes et ainsi la formation de nouvelles épines. Ceci est permis grâce aux NMDARs et à la présence de Ca^{2+}. CamKII a aussi un rôle dans la formation de nouvelles épines lors de l'induction de certains LTP.

Les protusions dendritiques sont donc primordiales dans la mise en place des synapses, leur morphologie est aussi essentielle et reflète leur rôle, stade de maturation et fonctionnalité. De plus, des défauts au niveau des densités par dendrite et des caractéristiques de ces protusions, peuvent modifier l'activité synaptique neuronale, et expliquer certains troubles neurodéveloppementaux. L'analyse de ces aspects par imagerie est donc un point essentiel.

Un autre point intéressant à noter est que des éléments de la machinerie de traduction sont présents au sein de certaines épines dendritiques. Ainsi, une synthèse protéique peut avoir lieu localement, probablement pour répondre aux changements d'activité neuronale.

2-4/Plasticité synaptique

Il est important que certaines synapses soient maintenues actives mais il est aussi nécessaire que les synapses puissent présenter une certaines plasticité selon l'activité neuronale. Les épines sont des structures dynamiques et peuvent changer de morphologie. Cette plasticité est particulièrement primordiale pour l'apprentissage et la mémoire (Lepeta et al. 2016; Bailey et al. 2015) et est corrélée à des changements de la morphologie des épines qui dépendent de l'activation des NMDARs. Elle peut être permise par une LTP (« Long-Term Potentiation » ou potentialisation à long terme) résultant d'une activité synaptique répétée avec augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique, et aussi par une LTD (« Long-Term Depression » ou dépression à long-terme) induite par des stimulations de faible fréquence entrainant une diminution de cette efficacité. Ces changements vont provoquer une modification des composants des synapses et ainsi permettre une certaine plasticité. Les LTP seraient plutôt associés à une synaptogénèse, induisant la formation d'épines et l'augmentation du volume d'épines préexistantes et les LTD à une perte de synapses en induisant un rétrécissement voire une rétractation des épines (Nägerl et al. 2004) (Figure 11).

En effet, la stimulation induisant des LTP augmente la polymérisation d'actine dans les épines, tandis que des stimulations à faible fréquence induisant des LTD vont entrainer

une dépolymérisation de l'actine. Il a été montré que les petites et moins fortes épines étaient impliquées dans les LTP, alors que les épines les plus larges seraient plus stables et moins sujettes à la plasticité (Tada et Sheng 2006).

La régulation de la dynamique de l'actine (polymérisation/dépolymérisation) a donc plusieurs effets tels que la croissance, la forme et la motilité.

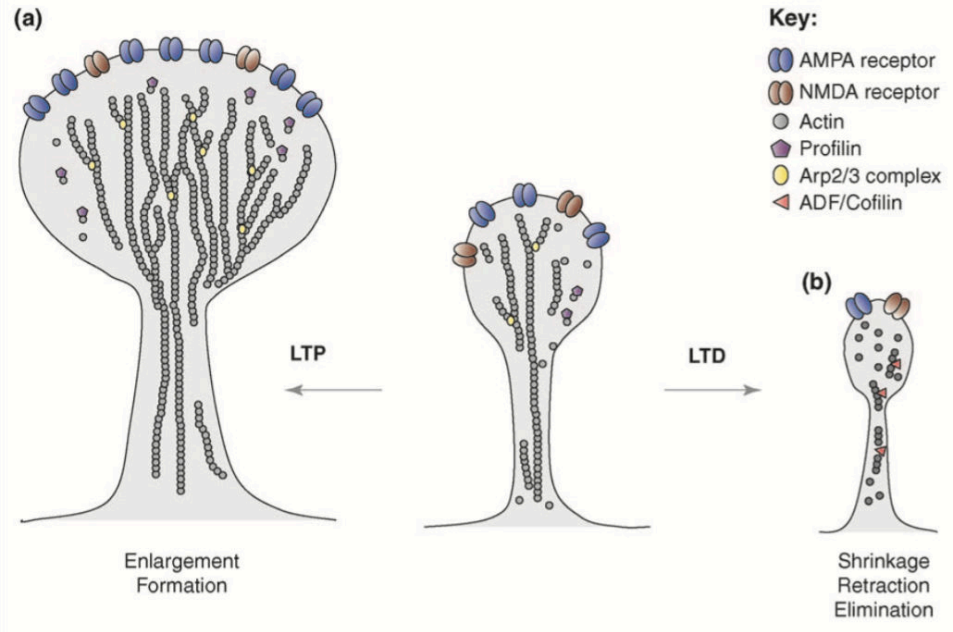


Figure 11 : Changements dans la structure et la morphologie des épines induits par des LTP et LTD. (a) Les LTP induisent un élargissement des épines par une augmentation de la quantité de filaments d'actine et un recrutement de AMPARs. (b) Les LTD induisent une dépolymérisation de l'actine entrainant un rétrécissement voire une rétractation des épines. Figure issue de Tada et Sheng 2006.

La plupart du temps les protéines qui permettent le remodelage des épines, sont les mêmes que celles qui permettent initialement leur formation. Par exemple, l'actine au sein des épines est dynamique. Il a été montré que seulement 5% de l'actine dans les épines était stable (Star et al. 2002).

3/Calcium

Le calcium intracellulaire est très important pour la mise en place et la plasticité du cytosquelette des dendrites. Son action passe par différentes voies (Figure 12) dont celle des Rho GTPases (Konur et Ghosh 2005).

La protéine CamKII (Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II), présente à la fois un rôle dans la plasticité synaptique mais aussi un rôle dans la croissance dendritique (Pattinson et al. 2006). Son absence induit des modifications dans l'arborisation dendritique. Son activation quant à elle, est fonction de l'activité synaptique et de l'entrée de Ca^{2+}, et est importante pour l'induction de LTP et donc pour la plasticité synaptique. CamKII possède différents substrats tels que les AMPARs, les NMDARs et PSD95 (Yoshimura et al. 2000). Cette molécule joue un rôle dans la formation de filopodes et d'épines ainsi que de synapses en se fixant aux filaments d'actine et aux protéines de la PSD (Jourdain et al. 2003; Pratt et al. 2003).

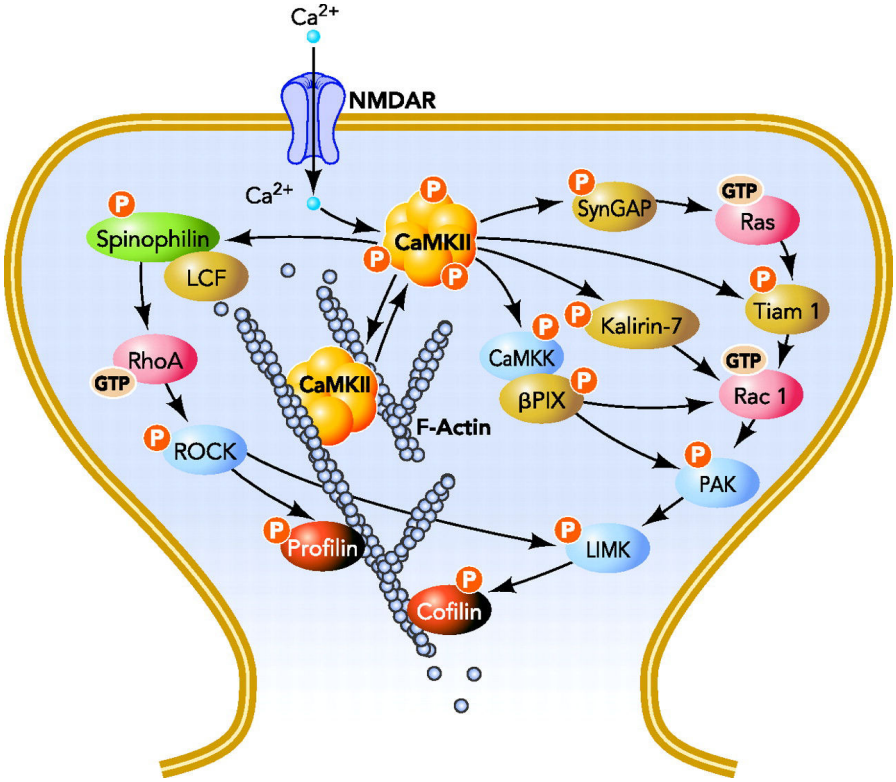


Figure 12 : Voies de signalisation induites par Ca^{2+} et impliquant CaMKII. Des flux calciques ont lieu à travers les NMDARs. Le calcium active la molécule CamKII qui peut directement se lier à l'actine mais qui induit aussi plusieurs voies de signalisation agissant sur ce cytosquelette d'actine. Figure issue de Okamoto et al. 2009.

Les concentrations de calcium (Ca^{2+}) varient selon l'acticité cellulaire et les concentrations cellulaires sont la résultante d'activités de divers types neuronaux (la concentration basale est comprise entre 50 et 100nM, elle varie en fonction de l'activité neuronale et peut augmenter jusqu'à 1mM) (Berridge et al. 2000). Le Ca^{2+} a un effet sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Le calcium peut entrer dans la cellule par l'intermédiaire des récepteurs de neurotransmetteurs canaux ioniques (NMDARs), des sous-types de AMPARs perméables au Ca^{2+} (peu fréquents) et des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Figure 13). De plus, du Ca^{2+} peut être stocké dans certaines épines au sein d'éléments tel que le réticulum endoplasmique (RE), et être libéré en réponse à des signaux. La présence de ce réticulum pouvant contenir du Ca^{2+} dépend du type d'épines :

la majorité des épines de type « mushrooms » comportent des RE, tandis que seulement 20% des « thin » en contiennent (Spacek et Harris 1997).

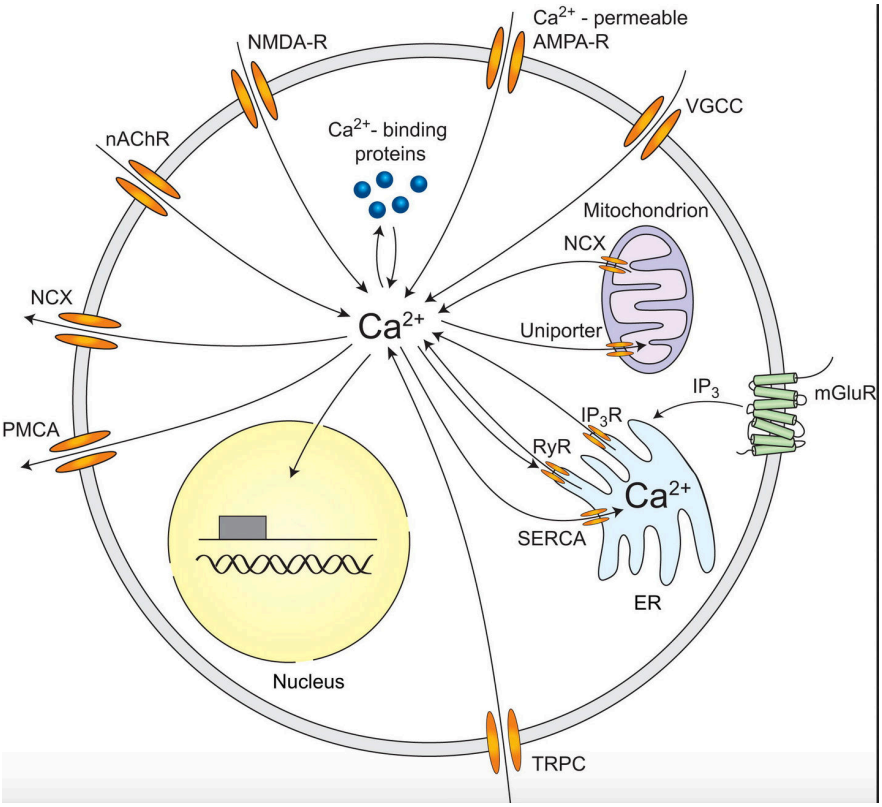


Figure 13 : Différentes voies d'entrée de calcium. Parmi les modes d'entrée du Ca^{2+} on trouve les NMDARs, les formes d'AMPARs perméables au Ca^{2+} ainsi que les IP3Rs du RE activés par les mGluRs qui permettent de relarguer le Ca^{2+} stocké au sein du RE. Figure issue de Grienberger et Konnerth 2012.

L'augmentation des quantités de calcium intracellulaire peut agir sur la morphologie des épines. Par exemple des augmentations transitoires et modérées au sein de l'épine pouvant être dues à une activation des NMDARs par de faibles quantités de glutamate entrainent une élongation de cette épine ainsi que la formation de nouvelles épines ; des augmentations massives et persistantes de concentration en Ca^{2+}, pouvant être causées par une forte quantité de glutamate, induisent une réduction de la taille des épines voire leur disparation. Réciproquement, la structure même de ces épines peut modifier le

transport de Ca^{2+}(Korkotian et Segal 1999). Par exemple, les « thin » ne facilitent pas les passages de Ca^{2+} tandis que les épines avec une tête large tête (« mushroom ») sont plus à même de permettre la capture de Ca^{2+}. Cependant, les petites épines de type « long thin » subiraient moins de fuite de Ca^{2+} le long de leur cou fin (Noguchi et al. 2005), et pourraient ainsi permettre des LTP, ce qui corrèlerait avec une plasticité plus élevée de ce type d'épines, comparée à celle des « mushrooms », plus stables.

De façon intéressante, il semblerait que le Ca^{2+} entrant par les NMDARs induise un ralentissement du renouvellement des filaments d'actine, possiblement par des protéines régulatrices de l'actine sensibles au Ca^{2+} tel que la Gelsoline, mais aussi probablement par CamKII (Ethell et Pasquale 2005).

Le passage d'ions, tels que le Ca^{2+} est primordial dans le fonctionnement du neurones : ces flux d'ions vont jouer sur le potentiel de repos et le potentiel d'action, sur la transmission de signaux électriques et ainsi sur la libération de neurotransmetteur en induisant des cascades de signalisation intracellulaire. Comme exposé, le Ca^{2+} présente un rôle dans la croissance neuronale, la différenciation, la plasticité synaptique. Des perturbations des quantités et des flux calciques peuvent induire des troubles du développement et du fonctionnement neuronal. C'est donc un aspect important à analyser lors de l'étude de maladies neurodéveloppementales, par exemple par des approches d'imagerie calcique.

4/Astrocytes

La mise en place et la fonctionnalité des synapses nécessitent d'autres éléments tels que les cellules gliales et la matrice extracellulaire qui se trouvent autour des neurones

(Lepeta et al. 2016). La communication entre les cellules gliales et les neurones est importante pour différents aspects tels que la synaptogénèse, la transmission synaptique et la plasticité synaptique (Chung et al. 2015; Fields 2002). Ces deux types de cellules communiquent à travers différents facteurs notamment des neurotransmetteurs et des protéines de surface.

Les astrocytes jouent un rôle dans le contrôle de la transmission synaptique. Ils agissent sur l'activité neuronale en augmentant les quantités de Ca^{2+} intracellulaire et en sécrétant diverses molécules (Chung et al. 2015). Pour citer certains exemples, les astrocytes vont participer à la synaptogénèse en sécrétant de la trombospondine qui est une protéine nécessaire à la formation de synapses (Christopherson et al. 2005) ainsi que des neurotrophines, permettant d'agir sur la synaptogénèse et la plasticité (Ethell et Pasquale 2005).

Les astrocytes vont pouvoir moduler l'activité synaptique excitatrice en relargant des « gliotransmetteurs » tel que le glutamate ou de la D-sérine qui est un co-agoniste des NMDARs, favorisant ainsi la transmission glutamatergique (Schell et al. 1995). De plus, ils peuvent moduler la quantité de glutamate en le capturant des compartiments extracellulaires via leurs propres transporteurs (Pannasch et al. 2011). Le relargage de glutamate par les astrocytes va pouvoir agir sur les LTP et les LTD (Park et al. 2015).

De plus, il semblerait que les cellules gliales puissent participer dans le développement des TSA. Une activation anormale de la microglie a été observée chez des patients TSA avec des anomalies se traduisant par une augmentation de la densité des cellules microgliales (Morgan et al. 2010).

En conclusion, les astrocytes ont un rôle en particulier dans la formation, la stabilité et la plasticité des synapses ainsi que sur leur fonctionnalité telle que l'excitabilité

neuronale, l'activité synaptique, la mise en place des réseaux neuronaux (Dallérac et Rouach 2016). La présence et la prise en considération de ces cellules sont importantes dans la mise en place et l'étude de cultures neuronales.

5/Troubles neurodéveloppementaux

De nombreuses études génétiques ou modèles animaux ont démontré que des protéines impliquées dans le développement et le fonctionnement de synapses glutamatergiques ont un rôle dans le développement de TSA (Volk et al. 2015). Des mutations dans des gènes codant pour des protéines synaptiques induisent des défauts de fonction ou de densité dans plusieurs troubles neurologiques. De plus, la période de développement des TSA corrèle avec la période critique de formation intensive de synapses et de maturation.

De nombreuses maladies neuro-développementales présentent des défauts de dendrites ou d'épines (morphologie, composition, fonctionnalité). Les symptômes de ces maladies pourraient être dus à des anomalies de formation ou de maturation de ces éléments (Figure 14) (Martínez-Cerdeño 2016).

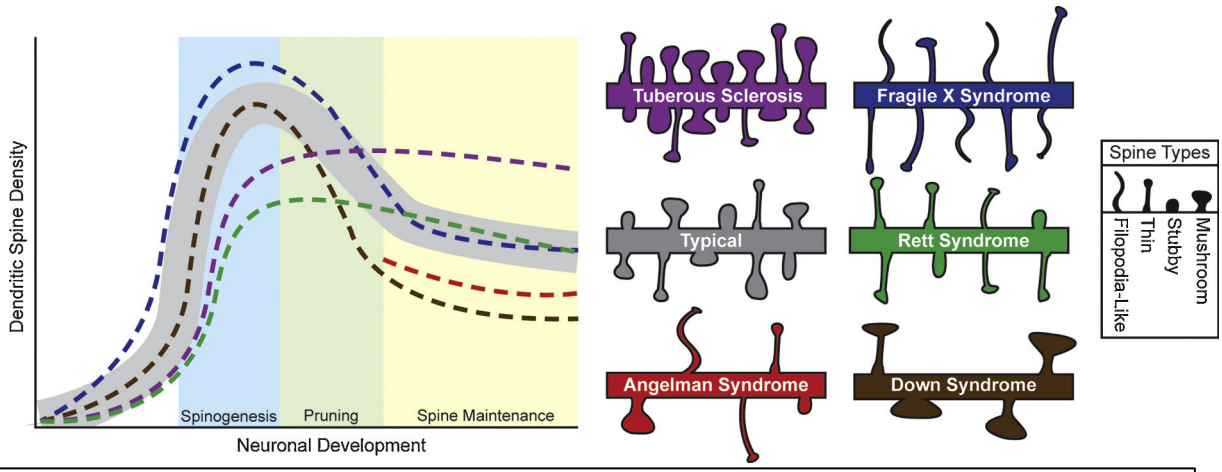


Figure 14 : Altérations des épines dendritiques dans les troubles associés à l'autisme. En gris est représentée la situation d'individus non atteints. Les autres couleurs représentent chacune un syndrome autistique pour lequel on peut observer des variations de densité ou de la distribution relative de chaque type de protusions dendritiques. Figure issue de Phillips et Pozzo-Miller 2015.

5-1/Autisme non syndromique

Quelques études réalisées à partir de tissus *post-mortem* de patients TSA et un plus grand nombre d'études sur modèles animaux ont été décrites. Une extrapolation directe des résultats obtenus à partir de modèles animaux ne peut évidemment être applicable au développement du cerveau chez l'homme.

Pour l'autisme non syndromique, différentes études sur tissus *post-mortem* ont démontré :

1) une diminution de la densité d'épines dendritiques de neurones pyramidaux chez certains patients, la morphologie des épines quant à elle ne présentait pas de défaut (Williams et al. 1980).
2) une augmentation du nombre d'épines des dendrites du pôle apical des neurones pyramidaux dans la couche II du cortex et dans la couche V du lobe temporal. Cette augmentation de densité est observée à partir de cerveaux de masse plus faible et majoritairement issus de patients présentant des déficits cognitifs (Hutsler et Zhang 2010).

3) une diminution du nombre de dendrites des neurones du cortex préfrontal dorso-latéral chez certains patients (Mukaetova-Ladinska et al. 2004).
4) une diminution de l'arborisation dendritique au niveau des régions CA1 et CA4 de l'hippocampe (Raymond et al. 1996; Hutsler et Zhang 2010).

L'ensemble de ces observations démontre clairement la présence d'anomalies au niveau des dendrites et de leurs épines chez des patients atteints de TSA. Cependant, des différences sont perçues d'une étude à l'autre, pouvant pointer le fait que ces aspects peuvent être dépendants de plusieurs facteurs tels que la région cérébrale, la couche corticale, l'âge et le nombre d'individus étudiés ainsi que le délai et le protocole de fixation.

Au niveau moléculaire, des mutations ont été détectées chez des patients atteints de TSA au sein de gènes codant pour des protéines essentielles au fonctionnement synaptique :

- *GRIN2B* (Kenny et al. 2014). Ce gène code pour la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA. Un SNP (Single Nuceotide Polymorphism) de *GRIN2A* (code pour la sous-unité GluN2A des NMDARs) a été associée aux TSA ((Barnby et al. 2005). Il est envisageable que des modifications au niveau de ces sous-unités puissent affecter le fonctionnement de ces récepteurs.
- *GluA2* ((Ramanathan et al. 2004) et *GluA3* (Guilmatre et al. 2009). Ces gènes codent pour des sous-unités des récepteurs AMPA, leurs mutations pourraient modifier leur fonctionnalité.
- *SHANK* 1-2-3 : Comme exposé précédemment, plusieurs mutations ont été détectées au niveau de ces gènes. Des défauts des protéines SHANK entrainent

des pertubations au niveau de la PSD et donc des épines dendritiques. Ce point sera discuté ultérieurement.

- *NLGN* (Jamain et al. 2003; Laumonnier et al. 2004). Des modèles murins ont montré que des mutations au sein du gène *NLGN3* induisaient des défauts de transmission synaptique par les AMPARs (Etherton et al. 2011) et que des mutations au sein de *NLGN1* induisaient une réduction de la fonctionnalité des NMDARs (Blundell et al. 2010).
- *NRXN* : Des mutations au sein des gènes de la famille NRXN induisent des défauts dans la transmission synaptique (Südhof 2008). Plus particulièrement, NRXN3 est nécessaire au recrutement de AMPARs en réponse au LTP (Aoto et al. 2013).

5-2/Autisme syndromique

De même que pour l'autisme non syndromique, des études sur tissus *post-mortem* ont été réalisées chez des patients atteints de formes syndromiques d'autisme.
Chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile, les études ont démontré :

1) une augmentation de la densité d'épines dendritiques de certaines régions du cortex (Irwin et al. 2001)
2) une augmentation de la longueur des épines dendritiques et une diminution du nombre d'épines courtes dans certaines régions du cortex, reflétant des anomalies de la morphologie et de la maturité des épines dendritiques (Irwin et al. 2001; Rudelli et al. 1985; Hinton et al. 1991)

Des études à partir de modèles animaux dans lesquels le gène *FMR1* est délété apportent les mêmes informations : une augmentation de la densité en longues épines

dendritiques, une augmentation d'épines présentant une morphologie immature (McKinney et al. 2005; Irwin et al. 2002; Comery et al. 1997). En plus de ces effets, il a été montré des déficits de certaines protéines synaptiques telles que PSD95 (Ifrim et al. 2015).

Ces études montrent un rôle potentiel de FMRP dans la mise en place et la maturité des épines dendritiques.

Des analyses sur tissus *post-mortem* de patients atteints du syndrome de Rett ont montré :

1) une diminution de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux des couches III et V dans certaines régions du cortex (Armstrong et al. 1995)
2) une diminution de la densité d'épines dendritiques (Belichenko et al. 1994)

Chez les modèles murins de TSA, il a été observé une diminution de l'arborisation dendritique, de la densité des épines dendritiques et une altération de la morphologie de ces épines (Stuss et al. 2012; Nguyen et al. 2012; Belichenko et al. 2009).

Des modèles murins mimant l'effet de facteurs environnementaux potentiellement à l'origine de TSA ont aussi été développés. Le modèle de l'acide valproïque montre une altération de l'arborisation dendritique dans l'hippocampe et dans d'autres régions tel que le cortex préfrontal ainsi qu'une altération de la densité des épines dendritiques en fonction de la région, telle qu'une diminution dans le cortex préfrontal et une augmentation dans l'hippocampe ventral (Bringas et al. 2013).

En conclusion, une altération significative des dendrites et des épines dendritiques s'observe dans les TSA. Elle se traduit en général plus particulièrement par une diminution du nombre d'épines matures, suggérant un retard de maturation chez les patients atteints.

5-3/Dérégulation de la balance excitation/inhibition (E/I) et connectivité neuronale

Cet équilibre est essentiel à l'homéostasie du cerveau (Takahashi et al. 2012), un déséquilibre pouvant induire le développement de troubles neuropsychiatriques. De façon générale, les interneurones (neurones GABAergiques) transmettent des signaux inhibiteurs, les neurones glutamatergiques transmettent quant à eux des signaux excitateurs. Un déséquilibre au sein de l'un des types de neurones va perturber cette balance E/I. Il a surtout été suggéré une augmentation du ratio E/I chez les patients atteints de TSA (Coghlan et al. 2012; Rubenstein et Merzenich 2003). Cette théorie de la dominance excitatrice corrèle avec la comorbidité fréquente qui est l'épilepsie, causée par une hyperactivité neuronale. Des études ont montré que des patients atteints de TSA présentaient des taux sanguins plus élevés de glutamate (Shimmura et al. 2011) ainsi qu'une une diminution de la quantité de GABARs dans plusieurs régions du cerveau dont le cortex (Blatt et Fatemi 2011). De plus, des études d'optogénétique au sein du cortex de souris, induisant une augmentation de la balance E/I, ont entrainé des troubles dans les interactions sociales (Yizhar et al. 2011). Néanmoins, la situation est assez complexe et des études ont montré des résultats allant plutôt dans le sens d'une augmentation de l'inhibition (Gustafsson 1997; Bertone et al. 2005).

Une théorie émet l'hypothèse d'une connectivité neuronale anormale chez les TSA. Dans certains cas l'augmentation du nombre de synapses induirait une augmentation du nombre de connexions, à l'inverse une diminution du nombre de synapses induirait une réduction de la connectivité (Bourgeron 2015). Deux aspects de la connectivité sont à prendre en compte : la connectivité à longue distance, c'est à dire entre différentes régions du cerveau, et la connectivité locale (Belmonte 2004). Une théorie expose une hyper-connectivité locale parallèlement à une hypo-connectivité à distance (Just et al. 2004). Ceci corrèle avec les résultats de Casanova (Casanova et al. 2002) qui a observé au niveau du cortex un nombre plus important de mini-colonnes, de plus petite taille, entrainant donc une domination des connexions à courte distance par rapport à celles de longues distances. Des défauts de migration neuronale, de guidage axonale ou de synaptogénèse peuvent induire des perturbations (importantes) de la connectivité.

Un certain nombre de défauts au niveau de la formation et du fonctionnement des synapses est observé avec les TSA. A ce niveau, la famille SHANK semble essentielle. Les données génétiques associées à des études fonctionnelles exposent que ces protéines peuvent jouer un rôle important dans le développement des TSA.

III/SHANK

La famille protéique SHANK/ProSAP (SH3 and multiple ankyrin (ANK) repeat domain) est composée de trois membres (SHANK1/2/3). Ces trois protéines sont exprimées dans

différentes régions du cerveau (cf. ultérieurement) et se situent au niveau de la densité post-synaptique des synapses glutamatergiques.

1/ Structure protéique

Les protéines SHANK sont composées de plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine : un domaine composé de 6 répétitions ANK contigües, un domaine SH3 (« SRC Homology 3 »), un domaine PDZ (« PSD95/Discs large/Zona occludens »), un domaine riche en proline et un domaine SAM (« Sterile Alpha Motif ») (Figure 15). Ces différents domaines présents dans la structure des protéines SHANK correspondent à des sites d'interaction avec différents acteurs de la PSD. De plus, de part leur important poids moléculaire (155 à 225 kDa), les différents domaines qui les constituent et leur nature multimérique, elles peuvent se lier à plusieurs protéines à la fois, ce qui leur confère un rôle primordial dans l'organisation du complexe multiprotéique de la PSD. Comme évoqué précédemment, le complexe ainsi formé permet l'interaction entre des protéines d'échafaudage (SHANK, Homer, PSD95), des protéines d'ancrage, des récepteurs AMPA, NMDA et métabotropiques, des protéines de signalisation et des protéines du cytosquelette (Lim et al. 1999). A titre d'exemple, le domaine PDZ de SHANK interagit avec SAPAP (« SAP90/PSD-95-Associated Proteins »), la région riche en proline avec la cortactine et Homer et le domaine SAM avec d'autres protéines SHANK (formation d'homomultimères) (Lim et al. 1999; Du et al. 1998; Naisbitt et al. 1999; Schultz et al. 2008). Une description plus précise de ces interactions est développée ci-dessous.

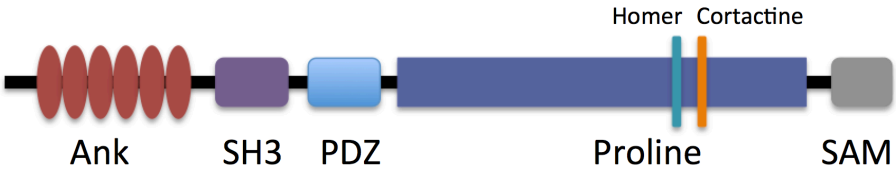


Figure 15 : Schématisation de la structure des protéines de la famille Shank. Ces protéines sont constituées d'un domaine Ankyrine, d'un domaine SH3, d'un domaine PDZ ainsi que de sites de liaison à Homer et Cortactine.

A travers leurs différents domaines d'interaction avec diverses protéines de la PSD (Figure 16), les protéines SHANK sont impliquées à plusieurs niveaux au sein de la synapse.

1-1/Ankyrine

Ce domaine est composé de 6 répétitions de motifs Ankyrine. Il permet principalement l'interaction avec l'α-fodrine qui est une protéine liant l'actine. Ce qui permet ainsi une liaison indirecte au cytosquelette d'actine. Ce domaine peut aussi fixer la Sharpine (« SHANK Associated RH Domain Interactor ») dont le rôle au sein des neurones est mal connu (Lim et al. 2001; Bockers et al. 2001).

1-2/SH3 :

Ce domaine interagit avec la protéine GRIP (« Glutamate Receptor-Interacting Protein ») qui est elle aussi une protéine d'échafaudage possédant des domaines PDZ. Elle se fixe en particulier aux récepteurs AMPA (Sheng et Kim 2000). Ce domaine permet une interaction indirecte avec des récepteurs glutamatergiques. Il se fixe aussi à la Densin-180 qui est une autre protéine d'échafaudage de la PSD et qui se lie à l'α-Actinine, à

CamkII et à la β-Catenine (Strack et al. 2000; Walikonis et al. 2001; Quitsch 2005; Heikkilä et al. 2007).

1-3/PDZ

Le domaine PDZ interagit avec la protéine SAPAP qui elle-même se lie à d'autres protéines d'échafaudage telles que PSD95 et S-SCAM (« Synaptic Scaffolding Molecule »).

- SAPAP lie le domaine PDZ via sa partie C-terminale. Cependant, le variant d'épissage SAPAP1b ne possèdant pas de domaine C-terminal ne peut pas se lier aux protéines SHANK et influence indirectement la formation de ce complexe protéique via SHANK. Cette forme de SAPAP1 semble avoir un rôle important dans le recrutement des protéines SHANK aux synapses. En effet, des études ont démontré qu'une surexpression de SAPAP1b inhibait la présence des SHANK à la synapse (Naisbitt et al. 1999). En parallèle de sa liaison à SHANK, SAPAP se lie à PSD95 (Boeckers et al. 1999) et permet une interaction indirecte entre SHANK et PSD95.
- PSD95 va pouvoir ensuite soit se fixer directement aux récepteurs NMDA, soit indirectement aux récepteurs AMPA via la protéine Stargazine (Chen et al. 2000; Kornau et al. 1995). Sachant que l'activation des NMDARs nécessite la présence de AMPARs à proximité (Carbonetto 2014), il est important que ces récepteurs soient correctement positionnés à la membrane, conférant ainsi aux protéines d'échafaudage un rôle primordial dans la fonctionnalité des synapses.

Il est intéressant de noter que SHANK peut aussi se lier directement aux récepteurs glutamatergiques métabotropiques (Tu et al. 1999) et à certaines formes de récepteurs ionotropiques (cependant la majorité des AMPARs et NMDARs ne le font pas) (Uemura et al. 2004).

De plus, PSD95 interagit avec les Neuroligines. Comme exposé précédemment, ces dernières se lient aux Neurexines situées au niveau pré-synaptique, ce qui permet la formation d'une fente synaptique (Irie et al. 1997). Par ce fait, SHANK interagit indirectement avec ces protéines d'ancrage et permet un maintien des contacts synaptiques.

En parallèle βPIX, qui est un facteur d'échange pour les RhoGTPases, peut se fixer à ce domaine de SHANK (Park et al. 2003). Il semblerait donc que SHANK soit impliqué dans la signalisation par les Rho GTPases, qui elles-mêmes ont un rôle dans la modification du cytosquelette d'actine.

1-4/Région riche en proline

C'est la région la plus longue de la protéine, elle représente plus de la moitié de la structure de SHANK. Cette région interagit avec Homer et Cortactine (Tu et al. 1999; Du et al. 1998), et plus généralement avec différents domaines protéiques de type SH3, EVH1 et WW. Il est donc possible que les protéines SHANK lient d'autres protéines via cette région riche en proline.

- Homer : Cette molécule se fixe aux protéines SHANK via son propre domaine EVH1 (Tu et al. 1999). En parallèle, Homer lie les mGluR à leur effecteur : le récepteur IP3. C'est une protéine importante pour une signalisation efficace entre ces deux récepteurs, permettant ainsi un meilleur relargage du calcium intracellulaire en réponse à la stimulation du récepteur. Une déstabilisation de SHANK3 pourrait induire un déficit de recrutement d'Homer à la synapse et donc une perturbation probable de la signalisation synaptique.
- Cortactine : Se lie à SHANK3 via son propre domaine SH3 (Naisbitt 1999). Elle interagit aussi avec l'actine F et est présente au niveau des lamellipodes et des

cônes de croissance des neurones (Du 1998, Wu 1993). Une stimulation des récepteurs glutamatergiques va induire son recrutement au niveau des synapses (Naisbitt et al. 1999). Il semblerait que cette protéine soit importante dans la modulation du cytosquelette d'actine en réponse à un signal au niveau des épines dendritiques (Sheng et Kim 2000). Une anomalie au niveau de la protéine SHANK3 pourrait modifier sa liaison à la cortactine et de ce fait déstabiliser la formation et le maintien des épines dendritiques. Cependant, une étude a montré que la stimulation des récepteurs NMDA peut induire un déplacement de Cortactine des épines vers les dendrites (Hering et Sheng 2003) et donc un remodelage du cytosquelette à ce niveau. Il semble pouvoir y avoir des changements de la structure de l'épine et probablement un effet sur la plasticité synaptique en fonction de l'activité.

- Abi1 (« Abelson tyrosine kinase interacting protein 1 »): Une autre interaction intéressante de ce domaine est celle impliquant la protéine Abi1. Cette protéine a un rôle dans la signalisation des récepteurs à la tyrosine kinase ainsi que dans la modulation du cytosquelette d'actine (Kreienkamp 2008). Après une stimulation des récepteurs NMDA, Abi est envoyé au noyau où il joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Proepper et al. 2007) et il peut être envisagé qu'il agirait à ce niveau sur l'expression de gènes synaptiques.

Ce domaine riche en proline peut aussi interagir avec d'autres protéines se liant à l'actine telles que Abp1 et agir ainsi sur le cytosquelette au sein des épines. Abp1 est situé au sein des épines après stimulation des NMDARs, et peut moduler le lien entre la PSD et le cytosquelette en fonction de l'activité neuronale (Kreienkamp 2008).

1-5/Domaine SAM

Ce domaine se situe en position C-Terminale de la protéine. Les motifs SAM peuvent se lier entre eux et ainsi permettre la formation d'homodimères et d'hétérodimères (Schultz et al. 2008; Sheng et Kim 2000). D'autres domaines (Ank-SH3-PDZ) peuvent aussi contribuer à cette multimérisation, mais de façon moins prononcée (Kreienkamp 2008). De plus, ce motif est nécessaire au recrutement adapté de Shank3 au niveau synaptique (Boeckers et al. 2005). Une perte de ce domaine pourrait induire un déséquilibre de la matrice protéique de la PSD en ne permettant plus la formation d'un socle central.

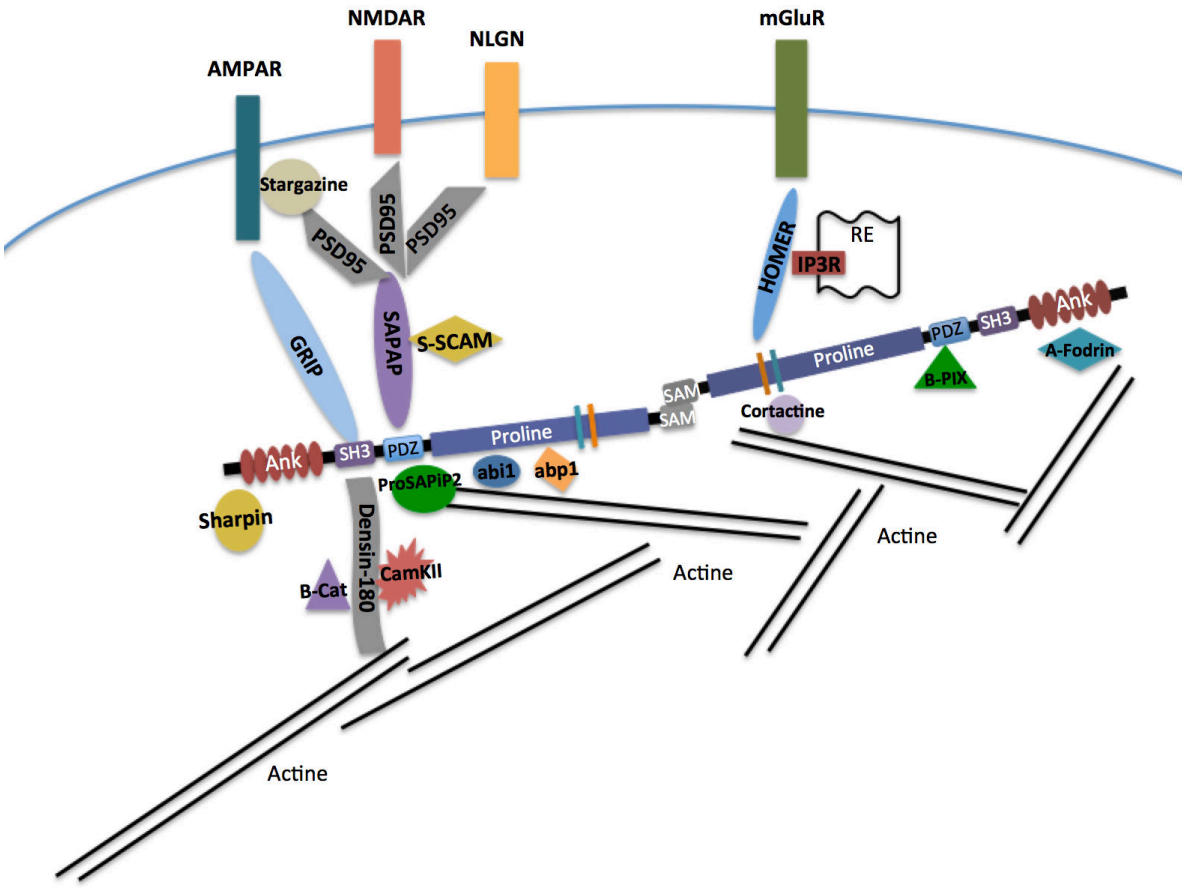


Figure 16 : Schématisation des diverses interactions de Shank3. Shank3 interagit avec plusieurs autres protéines de la PSD, lui conférant un rôle clef d'échafaudage. Ank : domaine Ankyrine, B-cat : β-caténine, RE : Réticulum Endoplasmique

2/Caractéristiques de Shank3

La protéine SHANK3 est aussi connue sous le nom de ProSAP2 et mesure 185kDa. Chez l'homme, son gène est situé sur le chromosome 22, au niveau de la région télomérique. Il est fortement conservé au cours de l'évolution, est composé de 22 exons et mesure 58kb (Sheng et Kim 2000; Wang et al. 2011). Des études précédentes ont suggéré que ce gène pouvait être sujet à un épissage alternatif (Lim et al. 1999).

2-1/Génétique

Différentes catégories de mutations ont été détectées au niveau de ce gène : des délétions, des mutations non synonymes, des mutations faux sens et des insertions (Durand et al. 2007; Moessner et al. 2007; Gauthier et al. 2009). Comme exposé précédemment, en plus de son rôle dans le développement de formes non syndromiques de l'autisme, le gène *SHANK3* est fortement impliqué dans le développement du syndrome Phelan-McDermid (Bonaglia et al. 2001; Bonaglia et al. 2006). Les mutations au sein du gène *SHANK3* sont présentes chez 0,5-0,7% des patients atteints de TSA (Uchino et Waga 2015; Leblond et al. 2014). Cette prévalence augmente avec la sévérité du syndrome. En effet, elle atteint 2,12% chez les patients atteints de TSA présentant un retard mental modéré à sévère (Leblond et al. 2014). Les patients atteints de TSA et porteurs de mutations tronquantes de *SHANK3* présentent un QI moyen de 30, démontrant qu'une altération de ce gène conduit à des troubles sévères (Leblond et al. 2014).

De plus, la pénétrance des mutations *SHANK3* est élevée. Aucune mutation tronquante n'a été détectée chez des individus contrôles et seulement 1,07% de mutations avec des effets délétères (Leblond et al. 2014).

Il est aussi intéressant de noter un potentiel effet-dose de *SHANK3*. En effet, il a été observé au sein d'une famille d'un patient atteint de TSA présentant une délétion de Shank3, que le frère diagnostiqué atteint du syndrome d'Asperger est quant à lui porteur d'une duplication de ce gène (Durand et al. 2007).

2-2/Implication du gène *SHANK3* dans le développement d'autres troubles

Le gène *SHANK3* est impliqué dans le développement de formes d'autisme non syndromique et syndromique, mais aussi d'autres maladies neuropsychiatriques.

2-2-1/Schizophrénie

Des mutations *SHANK3* ont été détectées chez des patients atteints de schizophrénie. Parmi ces cas, une situation est particulièrement intéressante : une mutation tronquante *de novo* a été trouvée chez 3 frères d'une même famille (probablement due à une mosaïque dans les cellules germinales du père) et ces trois individus ont été diagnostiqués schizophrènes (Gauthier et al. 2010).

2-2-2/Bipolarité

Quatre études, (7 patients au total) ont exposé le développement d'un état bipolaire chez des patients PMS (Verhoeven et al. 2012; Willemsen et al. 2012; Denayer et al. 2012; Vucurovic et al. 2012). Parmi ces cas, deux frères porteurs d'une délétion de la

partie terminale de la région 22q13, comprenant le gène *SHANK3*, et atteints par le syndrome de Phelan McDermid ont développé à 17 et 27 ans un comportement bipolaire (Denayer et al. 2012).

La raison pour laquelle des patients porteurs d'une mutation de *SHANK3* peuvent développer différents troubles est inconnue. Il y a probablement d'autres facteurs qui contribuent au développement de chacun de ces troubles qui ont un point commun, celui du développement de la synapse. En additionnant leurs effets, des troubles différents vont se mettre en place et ainsi induire des symptômes variables en fonction de la combinaison finale de ces facteurs.

2-3/Expression

2-3-1/Expression tissulaire

SHANK3 est exprimé modérément dans le cerveau par rapport à d'autres tissus tels que le cœur (Lim et al. 1999). Cette protéine est le membre de sa famille le plus exprimé dans le striatum (Figure 17). On le retrouve aussi au niveau du thalamus et des cellules granulaires du cervelet. Hors du système nerveux central, SHANK3 est exprimé abondamment dans le cœur, et modérément dans la rate (Peça et al. 2011; Boeckers et al. 1999; Naisbitt et al. 1999; Sheng et Kim 2000; Lim et al. 1999). L'expression de cette protéine dans d'autres tissus que le cerveau suggère un rôle de jonction cellulaire et probablement de régulateur du cytosquelette (Sheng et Kim 2000; Lim et al. 1999). Ceci corrèle avec les résultats d'une autre étude (Raab et al. 2010) montrant la présence de SHANK3 au niveau des jonctions neuromusculaires des muscles squelettiques chez les

rongeurs suggérant que SHANK3 permet l'ancrage adéquat des récepteurs glutamatergiques au niveau des synapses du système nerveux périphérique.

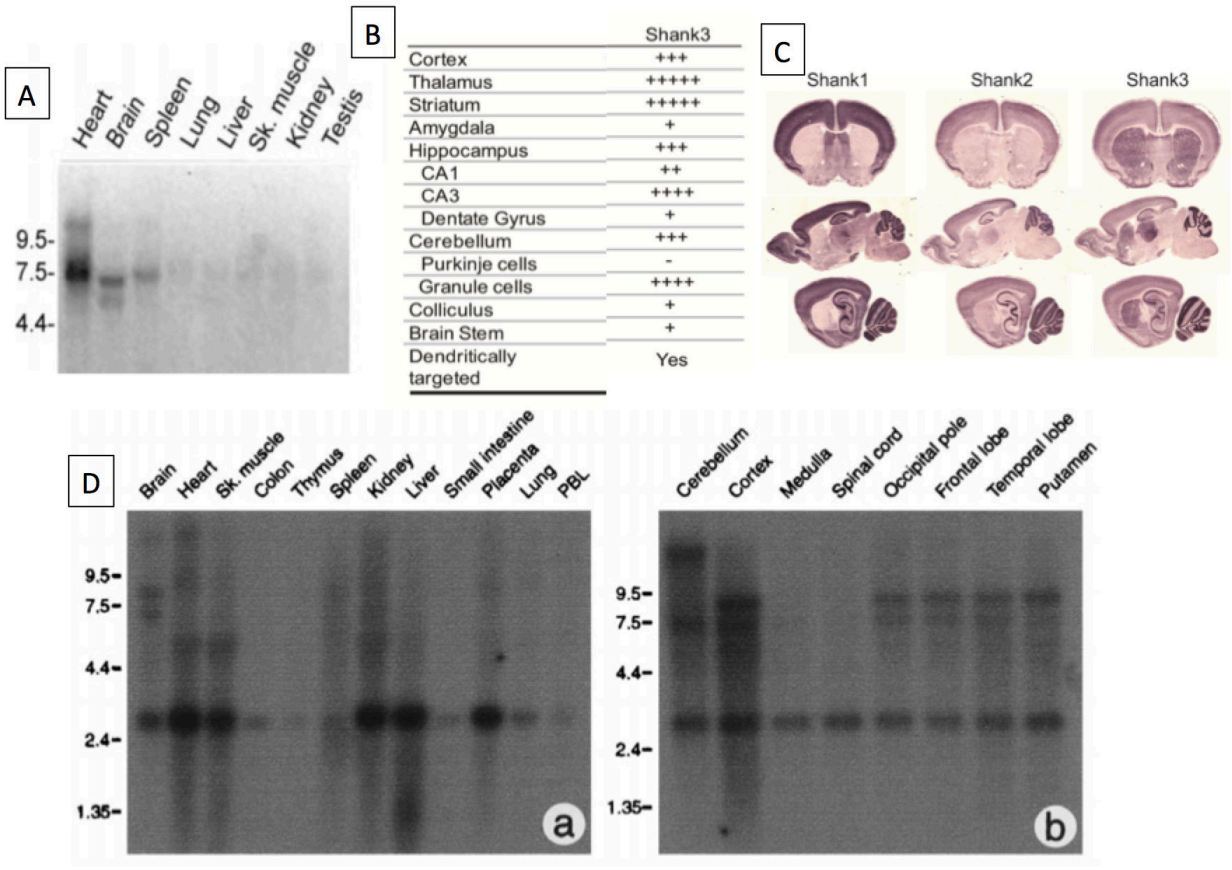


Figure 17 : Expression de SHANK3 chez la souris et l'humain. A/ Expression de SHANK3 au sein de différents organes de rat (Northern-Blot). Figure issue de Lim et al. 1999. B/ Tableau de l'expression de SHANK3 dans les différentes régions du cerveau murin. C/ Expression des membres de la famille SHANK dans le cerveau murin (Hybridation in-situ). B/ et C/ Figures issues de Peça et al. 2011. D/Expression de SHANK3 au sein de différents organes humains (Northern-Blot): a/ hors système nerveux central, b/ cerveau. Figure issue de Bonaglia et al. 2001.

2-3-2/Cinétique d'expression

La protéine SHANK3 fait partie des premières protéines à être exprimées lors de la mise en place de la PSD (Boeckers et al. 2002), après SHANK2. L'expression de SHANK3

évolue au cours du développement (Figure18). Dans le cas du cerveau, SHANK3 est faiblement exprimé avant la naissance et son expression augmente rapidement au stade postnatal précoce. A l'âge adulte son expression augmente par rapport au stade embryonnaire (Böckers et al. 2004). La période d'augmentation de son expression semble corréler avec la maturation synaptique (Uchino et Waga 2013). Dans les neurones en développement, les protéines SHANK sont concentrées au niveau de cônes de croissance (Du et al. 1998; Durand et al. 2012) (ce qui serait en accord avec son éventuel rôle dans l'extension et la mobilité de ce cône), puis s'accumulent au niveau des synapses, et plus précisément au niveau de la PSD où se trouve un pic de concentration dans la partie profonde (à environ 25-30nm sur 40-50nm de PSD) (microscopie électronique-immunogold) (Naisbitt et al. 1999). Il a été estimé qu'environ 300 molécules de SHANK seraient présentes par complexe de PSD (Sugiyama et al. 2005). De plus, la surexpression d'une forme de SHANK3 sauvage montre un positionnement de la protéine aux extrémités des filaments d'actine et une accumulation au niveau des épines dendritiques (Durand et al. 2012), exposant ainsi son rôle important dans l'interaction entre la PSD et le cytosquelette d'actine et probablement dans la mise en place et la fonctionnalité des épines dendritiques.

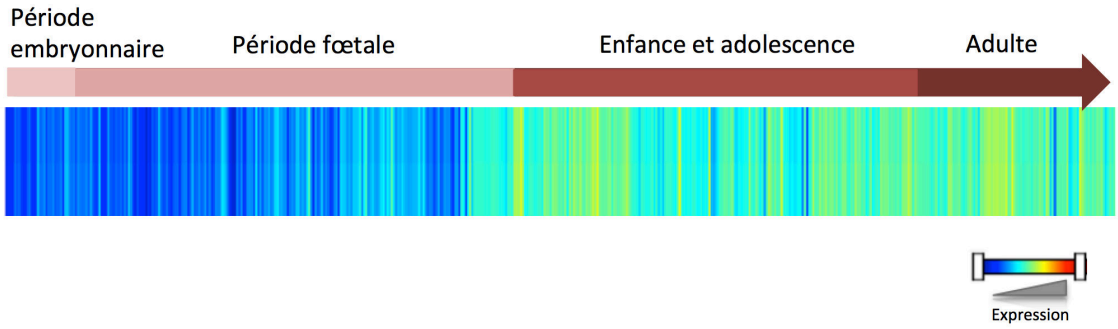


Figure 18 : Expression de SHANK3 au cours des phases de développement chez l'homme. Source : Allen Brain Atlas (http://www.brain-map.org/). L'expression de Shank3 est faible en période embryonnaire et augmente en fin de période fœtale.

Un point intéressant à noter est que l'ARNm de *SHANK3* présente une localisation somatique et dendritique (Böckers et al. 2004). On peut donc penser à une probable traduction dans le compartiment post-synaptique (en effet des ribosomes ont été détectés au niveau basal des épines dendritiques (Steward et Levy 1982)) et que cette traduction peut être régulée localement. De plus, les protéines SHANK3 peuvent être déplacées d'une PSD à une autre (Tsuriel et al. 2006) indiquant une régulation post-transcriptionnelle de la présence de SHANK3 dans les épines dendritiques. En parallèle, en réponse à une activité synaptique, les protéines SHANK sont détruites par le système d'ubiquitination, ce qui permet probablement une modulation et plasticité des épines en fonction de l'activité synaptique (Ehlers 2003). Un autre niveau de contrôle de l'expression de SHANK3 se fait au niveau épigénétique. En effet, l'activité des ses promoteurs est dépendante de leur méthylation (Ching et al. 2005). Il a été démontré que cette méthylation permettait la régulation de l'expression tissu-spécifique de *SHANK3* (Beri et al. 2007) ainsi que de ses différents isoformes (Uchino et Waga 2013). De plus, le niveau de méthylation diffère chez les patients atteints de TSA (Zhu et al. 2014). Un aspect épigénétique au niveau de ce gène pourrait avoir un rôle dans le développement de ces troubles.

2-3-3/Epissage alternatif et isoformes

Peu de données sur les isoformes de *SHANK3* chez l'humain sont connues. Un certain nombre d'informations sont issues d'une comparaison effectuée avec celles obtenues chez les modèles murins.

Les différents isoformes sont obtenus par combinaison de promoteurs différents et d'épissage alternatif (Figure 19). Le gène *SHANK3* comportent 5 CpG island qui sont bien conservés chez l'homme et les murins, suggérant que les isoformes détectés chez ces animaux, existent probablement chez l'humain (Uchino et Waga 2013; Uchino et Waga 2015).

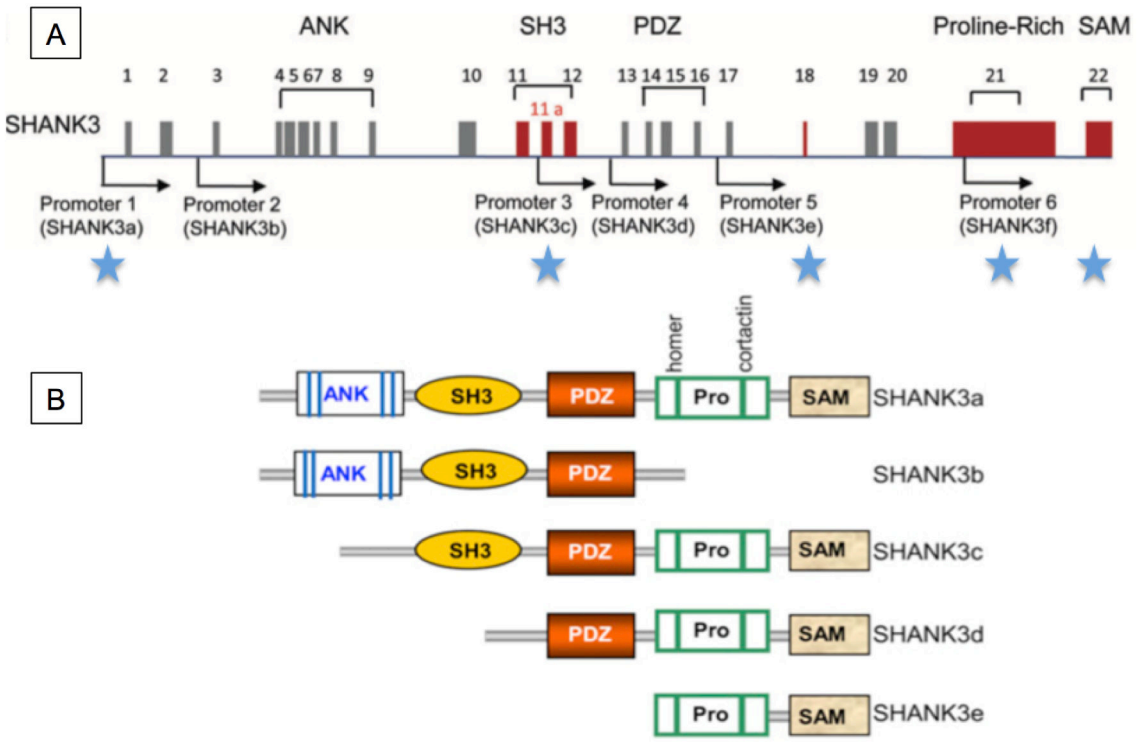


Figure 19 : Epissage et structure des isoformes de Shank3. A/Les exons codant pour chaque domaine protéique ainsi que les promoteurs alternatifs sont indiqués. En rouge sont représentés les exons pouvant être épissés. Les étoiles bleues correspondent aux CpG island. Figure modifiée de Zhu et al. 2014. B/ Six isoformes de SHANK3 sont exposées dans la littérature, présentant une composition différente des domaines. Figure issue de Jiang et Ehlers 2013.

Certaines études ont référencé différentes formes des isoformes exposées ci-dessus. Différentes études ont révélé des formes Shank3c-1, Shank3c-2, Shank3c-3 et Shank3c-4

(Waga et al. 2014). Ces deux dernières formes ont leur promoteur au niveau de l'intron 10, mais Shank3c-4 ne présente pas d'exon 21. L'étude de ces isoformes est assez complexe, et il est fortement probable que des isoformes supplémentaires ne soient pas encore connues, en particulier dans le cerveau humain. L'Allen Brain Atlas donne accès à l'expression de chacun des exons à différents âges et selon différentes régions cérébrales.

Les différentes isoformes de SHANK3 peuvent avoir des rôles distincts au niveau de la mise en place des synapses et de leur fonctionnement, et donc contribuer différemment au développement des TSA. En effet, cet épissage alternatif va entrainer la présence d'isoformes ne possédant pas un ou plusieurs domaines ; et la présence ou l'absence de certains domaines va moduler les possibilités d'interaction avec d'autres protéines de la PSD et ainsi entrainer différentes cascades intracellulaires. Par exemple, pour rappel, le domaine PDZ entre en interaction avec la cortactine qui elle-même se lie à l'actine. L'absence du domaine PDZ aura pour conséquence de réduire les interactions du cœur protéique de la PSD avec le cytosquelette (Lim et al. 1999), et l'on peut suggérer que la stœchiométrie d'isoformes en présence ou en absence de PDZ va permettre de moduler l'action du cytosquelette au niveau de la formation et de la morphologie des épines.
De plus, ces différentes isoformes pourraient aussi avoir des localisations distinctes. C'est en effet le cas pour les formes Shank3c-3 et Shank3c-4 qui sont respectivement situées au niveau des épines dendritiques et le long des dendrites et axones (Benthani et al. 2015). Pour cela, l'épigénétique joue probablement un rôle important. Comme exposé précédemment, des études *post-mortem* ont démontré que les CpG islands de *SHANK3* présentaient une méthylation différente en fonction du tissu cellulaire et qu'ils étaient ainsi impliqués dans l'expression tissu-spécifique de SHANK3 et de ses isoformes (Beri

et al. 2007; Ching et al. 2005; Maunakea et al. 2010). Il a été observé une augmentation de la méthylation de l'ADN des CpG intragéniques de *SHANK3* ainsi que des différences des épissages alternatifs de certains exons tels que l'exon 21 chez les patients atteints de TSA et présentant une méthylation accrue (Zhu et al. 2014).

2-4/Rôles cellulaires de SHANK3

Comme cela a été exposé précédemment, SHANK3, grâce à ses différents domaines, peut interagir indirectement via d'autres interacteurs intermédiaires avec différentes classes de récepteurs glutamatergiques (NMDAR via PSD95/SAPAP, mGluR via Homer et AMPAR via GRIP). SHANK3 participe ainsi à l'assemblage étroit des complexes protéiques de ces récepteurs et au maintien de leur équilibre, mais aussi à l'établissement d'un lien étroit entre les voies de signalisation de ces différents récepteurs.

En parallèle, SHANK3 interagit aussi avec Cortactine, qui elle même se lie à l'actine. SHANK3 permet de mettre en liaison le cytosquelette d'actine et les récepteurs glutamatergiques et pourrait induire le modelage de ce cytosquelette en fonction de la signalisation de ces récepteurs. Cette protéine pourrait très certainement agir sur la mise en place, le maintien et la maturation des épines dendritiques. De plus, les protéines Shank et Cortactine co-localisent au niveau des cônes de croissance (Du et al. 1998; Naisbitt et al. 1999), suggérant un rôle dans la croissance des neurites.

Différents types d'études ont permis de comprendre de façon plus fine les rôles de SHANK3.

2-4-1/Etudes in vitro (surexpression et invalidation du gène = « knockdown »)

Une étude (Roussignol et al. 2005) a démontré que la surexpression de SHANK3 dans des neurones dépourvus d'épine induit la formation de protusions dendritiques (75% des protusions ainsi formées présentent un profil d'épines matures, 25% un profil de filopodes/d'épines non matures). Une transfection avec d'autres protéines partenaires de la PSD n'entraine pas l'apparition de protusions (Roussignol et al. 2005). Les résultats de ces auteurs démontrent que la protéine SHANK3 est essentielle à la formation d'épines dendritiques. De plus, la transfection de SHANK3 muté au niveau du domaine PDZ ou du site d'interaction avec Homer induit une forte localisation dans le corps cellulaire et très peu au niveau du dendrite, tandis que les formes mutées au niveau du domaine ankyrine ou du site d'interaction avec la Cortactine sont localisées à la fois dans le corps cellulaire du neurone et dans le dendrite. Ainsi, les domaines PDZ et le site d'interaction avec Homer jouent un rôle crucial dans le bon adressage de SHANK3 au niveau des dendrites. Au cours de cette étude, d'autres expérimentations ont montré un rôle probable de la partie N-terminale (comprenant les sites d'interaction avec Homer et Cortactine et le domaine SAM) dans l'induction d'épines et du domaine PDZ dans leur maturation (Roussignol et al. 2005). L'induction de la formation des épines est réalisée via l'interaction entre SHANK et les complexes protéiques associés aux récepteurs glutamatergiques. Les effets de SHANK3 sont réversés par des antagonistes de ces récepteurs. Il semblerait aussi que la surexpression de SHANK3 entraine le recrutement de récepteurs glutamatergiques actifs. Cette étude a aussi démontré que ce recrutement se fait par l'intermédiaire de sites d'interaction aux récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA (PDZ), et métabotropiques mGluR (Homer). La surexpression d'une forme SHANK ne présentant pas de domaine PDZ, qui comme montré précédemment permet l'interaction avec ces récepteurs, réverse les effets observés lors d'une surexpression de

SHANK3. En conclusion, SHANK3 permet la formation d'épines dendritiques grâce à son interaction par le domaine PDZ avec les récepteurs des synapses excitatrices. Enfin, les épines dendritiques ainsi induites présentes des contacts présynaptiques (colocalisation avec la synaptophysine) et sont fonctionnelles (analyse des courants mEPSCs : « miniature Excitatory Postsynaptic Currents ») (Roussignol et al. 2005). En parallèle de cette étude, l'invalidation du gène *SHANK3* a été réalisée au sein de neurones d'hippocampe en culture par l'utilisation de siRNA. Les résultats de cette étude ont montré d'une part une diminution de la densité des épines et d'autre part une augmentation de la longueur de ces épines. Un défaut de protéine SHANK3 induirait de ce fait une diminution du nombre de synapses glutamatergiques. Il est à noter que ces données morphologiques ne permettent pas de conclure à une diminution de l'activité fonctionnelle des neurones (Roussignol et al. 2005).

Une étude effectuée au sein du laboratoire a permis de compléter les connaissances sur les rôles et le fonctionnement de SHANK3 (Durand et al. 2012). Des transfections de séquences de *SHANK3* sauvage et mutées ont été effectuées sur des neurones de rat. Ceci a permis à la fois d'étudier les rôles de cette protéine mais aussi les conséquences de l'expression de formes mutées (mutations qui ont été détectées chez des patients atteints de TSA : mutation stop et mutations non synonymes). Une surexpression de la séquence sauvage induit une augmentation de la quantité d'actine F, du nombre de synapses et favorise la maturation morphologique (élargissement des têtes d'épines par une augmentation de la quantité d'actine). De plus, deux autres études ont démontré que l'action de SHANK3 passait par un effet sur l'actine et qu'un stabilisateur d'actine pouvait réverser le phénotype causé par un déficit de SHANK3 (Duffney et al. 2013; Duffney et al. 2015). Il semble y avoir un rôle important de cette protéine dans la bonne mise en place du cytosquelette d'actine, et que les anomalies synaptiques observées

puissent être causées par un déséquilibre de l'organisation du cytosquelette d'actine. Au niveau fonctionnel, cette surexpression de SHANK3 induit une augmentation de la fréquence des mEPSCs ainsi que de la motilité des cônes de croissance. La forme tronquée (mutation en amont du site de liaison à Homer) quant à elle est quasiment absente au niveau des filaments d'actine. Elle est faiblement présente le long des dendrites et absente au niveau des épines, s'accumulant au niveau du noyau. En comparaison à la surexpression de la forme sauvage, sa surexpression n'induit pas de modification au niveau de la polymérisation d'actine, indiquant que la partie C-Terminale a un rôle crucial dans l'interaction et le modelage du cytosquelette d'actine, mais entraîne une diminution du nombre de synapses et de la largeur des épines. Fonctionnellement, cela réduit la fréquence et l'amplitude des mEPSCs ainsi que la motilité des cônes de croissance. En résumé, l'expression d'une forme tronquante de SHANK3 affecte donc la mise en place et la morphologie des épines dendritiques ainsi que la motilité du cône de croissance (Durand et al. 2012). Cette mutation semble avoir un effet dominant négatif, probablement causé par un défaut de recrutement à la synapse ou par une instabilité protéique. Les autres mutations étudiées dans cet article sont des mutations non tronquantes, héritées ou non, se situant au niveau du domaine Ankyrine. Elles induisent globalement de plus faibles effets, avec un effet d'amplitude intermédiaire pour la mutation *de novo*. Cette dernière semble avoir principalement un impact sur des évènements précoces puisque, de la même façon que la mutation tronquante, elle perturbe la motilité du cône de croissance. Cependant les deux autres mutations héritées induisent tout de même quelques effets, notamment sur la formation des épines.

Une étude récente (Cochoy et al. 2015) s'est intéressée aux différentes conséquences de mutations situées à des positions distinctes du gène : mutations induisant un codon stop

au niveau du domaine SH3, du domaine Proline (en amont du site de liaison à Homer) ou au niveau du domaine SAM (surexpression par transfection sur neurones de rat). Les résultats ont exposé des effets délétères lorsque la protéine est délétée au niveau des domaines SH3 et Proline affectant la localisation de la protéine, l'arborisation dendritique, la densité des épines et le nombre de synapses excitatrices. Aucun effet n'est observé pour une délétion du domaine SAM.

2-4-2/Modèles murins

Différentes lignées de modèles murins ont permis l'étude des rôles de Shank3 :

1/ Délétion des exons 4 à 9 (Souris Shank3e4-9). Plusieurs travaux ont étudié ce type de modèle (Bozdagi et al. 2010; Wang et al. 2011; Jaramillo et al. 2016). Cette délétion correspond à une perte du domaine Ankyrine.

Au niveau comportemental, ces modèles de souris mutantes présentent des déficits dans les interactions sociales et dans les interactions vocales ainsi que des comportements de toilettage intensif.

Au niveau biochimique, ce modèle démontre en particulier une altération dans l 'expression des protéines Homer 1b/c, GluA1, GluN2A et de SAPAP au sein de l'hippocampe (Wang et al. 2011) et de Homer 1b/c, PSD95, GluA2 et GluA3 au sein du striatum (Jaramillo et al. 2016).

Au niveau développemental, il a été montré que des neurones d'hippocampe de souris âgées de 4 semaines présentent une diminution de leur densité synaptique et une augmentation de la longueur de leurs épines, tandis qu'à 10 semaines la longueur des épines diminue (Wang et al. 2011).

Au niveau fonctionnel, il a été observé une diminution des LTP et de l'amplitude des mEPSCs et une augmentation de la fréquence de ces mEPSCs et du ratio AMPA/NMDA.

La perte du domaine Ankyrine semble induire des modifications au niveau de la mise en place des synapses et de leur fonctionnalité.

2/ Délétion de l'exon 9 (Shank3$^{\Delta 9}$) correspondant au dernier motif d'ankyrine (Lee et al. 2015). Ces souris ne présentent pas de troubles du comportement ou d'interaction ni de déficits au niveau des mEPSCs. Cependant une augmentation de la fréquence des mIPSCs (« miniature Inhibitory Postsynaptic Currents ») au niveau de l'hippocampe ainsi qu'une diminution dans le cortex préfrontal sont observées.

3/ Délétion des exons 13 à 16 (Shank3B-/-) (Peça et al. 2011). Cette délétion induit une perte de la région codant pour le domaine PDZ.

Au niveau comportemental, ces souris présentent un comportement répétitif de toilettage (« grooming »), des lésions de la peau, des comportements anxieux ainsi qu'une réduction des interactions sociales.

Au niveau biochimique, différentes altérations ont été décrites, telles qu'une perturbation de l'expression de certaines protéines de la PSD au niveau du striatum (diminution des niveaux de SAPAP3, Homer, PSD93, GluA2, GluN2A et GluN2B), une diminution de la densité des épines dendritiques et une augmentation de la longueur des épines.

Au niveau fonctionnel, une diminution de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs associés aux AMPARs de cellules striatales chez ces souris Shank3B-/- a été mise en évidence. Ces résultats pourraient résulter d'une diminution du nombre de synapses fonctionnelles (étant donné qu'aucune anomalie de la fonction présynaptique n'a été visualisée) ainsi que d'un défaut de fonctionnement des synapses formées (Peça et al. 2011).

Au sein de cette même étude, des souris présentant une délétion des exons 4 à 7 ont aussi été générées (souris Shank3A-/-) (domaine Ankyrine), mais peu d'analyses ont été effectuées sur ce modèle car les déficits comportementaux et physiologiques étaient moins importants. Cependant, on peut noter une faible diminution des interactions sociales ainsi que de la densité de synapses cortico-striatales.

Les travaux de Mei et al (2016) ont porté sur l'étude de la suppression et de la restauration (par une méthode Cre-dépendante) du domaine PDZ (souris Shank3$^{fx/fx}$) (Mei et al. 2016). Au niveau comportemental, les souris mutées présentent de l'anxiété, des troubles de la coordination motrice, un toilettage répétitif et des troubles des interactions sociales. Au niveau biochimique, les concentrations de SAPAP3, Homer1b/c, NR2A, NR2B et GluA2 sont réduites. Une réduction de la densité synaptique est aussi observée. Au niveau fonctionnel, les souris mutées présentent une diminution de la fréquence des mEPSCs. Aux alentours de l'âge de 3 mois, du tamoxifène (qui active la Cre-recombinase) est administré aux souris, permettant la restauration du domaine PDZ manquant. Ceci rétablit les quantités des autres protéines synaptiques ainsi que la densité synaptique. De plus, cette restauration génétique réduit le temps de toilettage et restaure un comportement social similaire à celui des souris sauvages, mais présentent peu d'effets sur les symptômes d'anxiété et de troubles de la coordination motrice. Ces résultats démontrent de façon très intéressante, qu'une restauration génétique d'une forme non mutée de SHANK3 à l'âge adulte, permet de supprimer une grande partie des phénotypes induits par la mutation.

4/Délétion de l'exon 11 (Shank3αβ-/-) (Schmeisser et al. 2012). Cette délétion induit une perte du domaine SH3. Au niveau comportemental, ces souris présentent, à 3 mois, des lésions au niveau de la tête et/ou du cou, probablement causées par un toilettage

intensif.

Au niveau biochimique, aucune différence de l'épaisseur de la PSD et de la densité synaptique n'a été observée. Cependant, une réduction du nombre de récepteurs GluA, ainsi qu'une augmentation des quantités de SHANK2 et GluN2B ont été reportées.

5/Délétion de l'exon 21 ($Shank3^{\Delta C/\Delta C}$) (Kouser et al. 2013; Duffney et al. 2015). Cette délétion induit la suppression du domaine d'interaction de SHANK3 à Homer et Cortactine.

Au niveau comportemental, ces souris présentent des troubles au niveau du traitement des informations spatiales, de la coordination motrice et des interactions sociales, mais aussi une hypersensibilité à la chaleur, et des comportements de toilettage intensif chez les souris âgées (10-13 mois).

Au niveau biochimique, il n'y a pas de modification des niveaux des protéines de la PSD mais une augmentation du récepteur glutamatergique de type GluR5 dans les fractions synaptiques (hippocampe) est observée. De plus, aucune perturbation au niveau de la densité synaptique n'a été mise en évidence.

Au niveau fonctionnel, une diminution de la fréquence de mEPSCs a été détectée ainsi qu'une augmentation du ratio AMPA/NMDA.

Un modèle hétérozygote de cette délétion, $Shank3^{+/\Delta C}$ a été étudié (Duffney et al. 2015). Ces souris présentent des troubles des interactions sociales. Au niveau fonctionnel, une diminution des NMDAR-mEPSCs a été observée, ainsi qu'une diminution du ratio NMDA/AMPA, des quantités de NR1 et NR2A dans les fractions synaptosomales du cortex frontal, mais pas dans le lysat total. De plus, une diminution des niveaux de β-PIX et d'actine ont été mis en évidence. Ces résultats montrent de façon importante que l'état hétérozygote de la mutation est suffisant pour induire des troubles fonctionnels et

comportementaux.

6/Insertion G (Shank3$^{G/G}$) (Speed et al. 2015). Un autre modèle intéressant a été généré en insérant un nucléotide G au sein de l'exon 21, ce qui a conduit a un décalage du cadre de lecture et à un codon stop prématuré. Ces souris présentent des troubles de l'apprentissage moteur et de la coordination, mais ne présentent ni troubles des interactions sociales ni comportements anormaux de toilettage. Au niveau fonctionnel, le ratio NMDA/AMPA est diminué ainsi que la fréquence des mEPSCs au niveau de l'hippocampe. Il semblerait que la transmission et la plasticité synaptique soient affectées chez ces souris.

	Mutations	*Phénotypes*	Références
Cultures			
	Ank	Localisation nucléaire et dendritique	Roussignol et al. 2005
	Ank	↘Formation d'épines ↘Motilité du cône de croissance (mutation *de novo)* Rôle adressage Maturation épines	Durand et al. 2012
	SH3	Localisation nucléaire, faible dans les dendrites ↘Arborisation dendritique ↘Densité des épines ↘Nombre de synapses excitatrices	Cochoy et al. 2015
	Proline	Localisation nucléaire, faible dans les dendrites ↘Arborisation dendritique ↘Densité des épines ↘Nombre de synapses excitatrices	Cochoy et al. 2015
	Nter	↘NR1 et GluR1/2/3 ↘Courants AMPA et NMDA ↘Densité et taille des synapses	Roussignol et al. 2005
	Nter	Ø au niveau des filaments d'actine et des épines ↘Nombre de synapses ↘Largeur des épines ↘Fréquence et amplitude des mEPSCs ↘Mobilité du cône de croissance	Durand et al. 2012
	Homer	Localisation nucléaire, faible dans les dendrites Rôle adressage Induction épines	Roussignol et al. 2005
	Cortactine	Localisation nucléaire et dendritique Induction épines	Roussignol et al. 2005
	SAM	Pas d'effet	Cochoy et al. 2015
Modèles Murins			
Shank3e4-9	Ank (délétion exon4-9)	Troubles des interactions sociales et vocales Toilettage intensif ↘Homer, GluA1, GluN2A, SAPAP (Hippocampe) ↘Homer, PSD95, GluaA2, GluA3 (Striatum) ↘Densité synaptique ↘LTP ↘Amplitude des mEPSCs ↗Fréquence des mEPSCs ↗Ratio AMPA/NMDA	Bozdagi et al. 2010; Wang et al. 2011; Jaramillo et al. 2015
Shank3Δ9	Dernier Ank (délétion exon 9)	↘mIPSCs	Lee et al. 2015
Shank3αβ-/-	SH3 (délétion exon 11)	Lésions cutanées ↘GluA2 ↗Shank2, GluN2B	Schmeisser et al. 2012
Shank3B-/-	PDZ (délétion exon13-16)	Toilettage intensif Comportements anxieux ↘Interactions sociales ↘SAPAP3, Homer, PSD93, GluA2, GluN2A, Glun2B ↘Densité des épines ↗Longueur des épines ↘Fréquence et amplitude des AMPAR-mEPSCs	Peça et al. 2011
Shank3fx /fx	PDZ (délétion exon13-16)	Comportements anxieux Troubles de la coordination motrice Toilettage intensif Troubles des interactions sociales ↘SAPAP3, Homer, GluN2A, GluN2B, GluA2 ↘Densité synaptique ↘Fréquence des mEPSCs	Mei et al 2016
$Shank3^{\Delta C/\Delta C}$	Domaines de liaison à Homer et Cortactine (délétion exon 21)	Troubles de la coordination motrice Troubles des interactions sociales Toilettage intensif ↗GluR5 ↘Fréquence des mEPSCs ↗AMPA/NMDA	Kouser et al. 2013, Duffney et al. 2015
$Shank3^{+/\Delta C}$	Domaines de liaison à Homer et Cortactine (délétion exon 21)	Troubles des interactions sociales ↘NMDAR-mEPSCs ↘NMDA/AMPA ↘GluN1, GluN2A, actine, β-Pix	Duffney et al. 2015
$Shank3^{G/G}$	Insertion dans exon 21	Troubles de l'apprentissage Troubles moteurs Troubles de la coordination ↘NMDA/AMPA ↘Fréquence des mEPSCs	Speed et al. 2015

Tableau 3 : Résumé des modèles cellulaires ou murins des TSA

A travers ces modèles, on observe différents effets causés par des délétions au sein de *SHANK3* (tableau 3). Ceci peut être du à la fois à une altération différentielle de chaque isoforme de SHANK3 ainsi qu'à des altérations sélectives des interactions de SHANK3 avec les autres protéines de la PSD. Ces perturbations pourraient conduire à une réduction de formation d'épines dendritiques et à un dysfonctionnement des synapses glutamatergiques. En effet, cette hypothèse corrèle avec les analyses fonctionnelles effectuées sur les modèles de souris, car on observe pour un certain nombre une altération au niveau des enregistrements électrophysiologiques.

Une étude a utilisé un autre modèle récent (iPSCs). Ces résultats seront décrits dans la partie consacrée à ce modèle.

3/Autres membres de la famille SHANK

Les différents domaines des protéines de la famille SHANK présentent une homologie de séquences en acides aminés de 63 à 87%.

Chez l'homme, le gène *SHANK1* est situé en position 19q13.3 et mesure 55kb. Il est composé de 23 exons. La protéine SHANK1 mesure 224kDa et est exprimée exclusivement dans le cerveau. Deux promoteurs alternatifs (Guilmatre et al. 2014) et 4 sites d'épissage (Lim et al. 1999) sont connus. Chez la souris, la protéine est fortement exprimée dans le cortex et l'hippocampe (Lim et al. 1999; Böckers et al. 2004).

Le gène *SHANK2* est situé en position 11q13.3 chez l'humain, mesure 621kb et est composé de 25 exons (Jiang et Ehlers 2013). La protéine SHANK2 mesure 158kDa et est très fortement exprimée dans le cerveau, surtout au niveau des cellules de Purkinje du cervelet et à de plus faibles niveaux dans le foie et le rein (Boeckers et al. 1999; Peça et al. 2011; Schmeisser et al. 2012). Son gène présente 4 sites d'épissage (Lim et al. 1999).

Il est le premier membre de la famille SHANK à être présent au niveau de la PSD. La forme majeure de SHANK2 exprimée dans le cerveau ne présente aucun domaine Ankyrine (Kreienkamp 2008; Sheng et Kim 2000). La forme totale (SHANK2E) est surtout exprimée dans les cellules épithéliales (McWilliams et al. 2004).

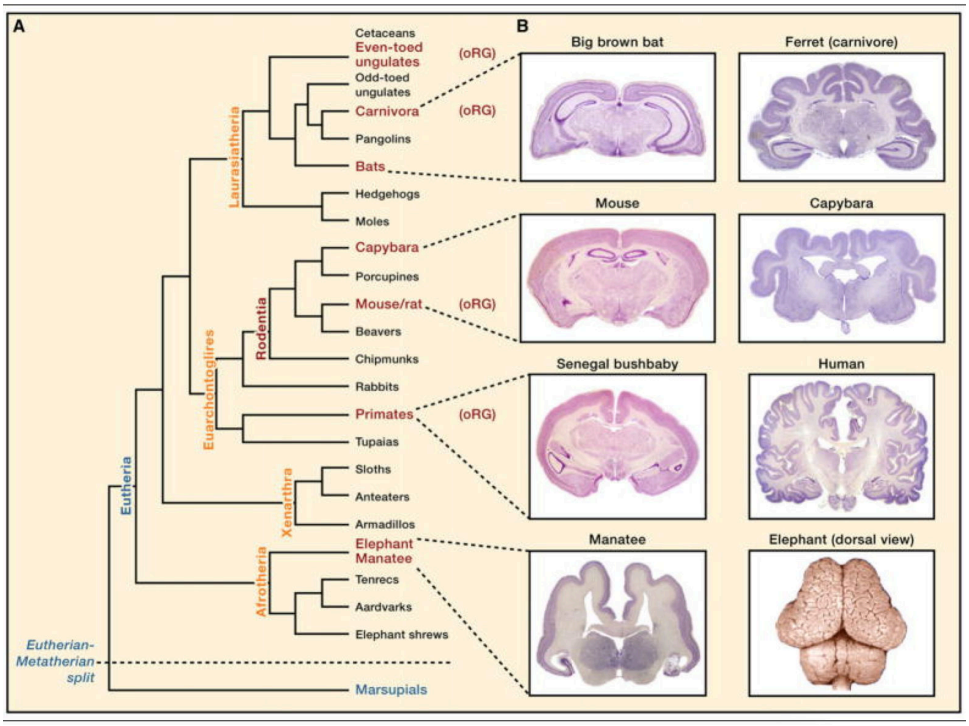
Des mutations au sein du gène *SHANK1* ont été détectées chez des patients atteints de TSA et présentant un QI normal. Plus précisément, les mutations tronquantes hétérozygotes de *SHANK1* sont présentes chez environ 0,04% des patients à travers le spectre autistique (Leblond et al. 2014). Des mutations au sein du gène *SHANK2* ont été détectées chez des patients atteints de TSA présentant un retard mental modéré. Les mutations tronquantes hétérozygotes de ce gène représentent 0,17% des patients (Leblond et al. 2014).

La pénétrance des mutations de ces deux gènes est plus faible que pour *SHANK3*. Il semblerait que ces mutations doivent être associées à d'autres facteurs pour induire le développement des TSA.

Des modèles de souris existent aussi pour ces deux gènes. Les souris Shank1 KO montrent une augmentation de l'anxiété, une diminution de la communication vocale, de la locomotion et de la mémoire à long terme, mais une augmentation de la mémoire de travail (Silverman et al. 2011; Hung et al. 2008; Wöhr et al. 2011). Les souris Shank2 KO présentent une hyperactivité, une augmentation de l'anxiété, des comportements de toilettage répétitifs et des troubles dans les interactions vocales et sociales (Schmeisser et al. 2012; Won et al. 2012).

Les modèles murins ont été essentiels pour la caractérisation des protéines SHANK ainsi que pour la compréhension des conséquences de mutations *in vivo*. Ces modèles peuvent ainsi permettre une certaine représentation de maladies

neurodéveloppementales. Cependant, un certain nombre de différences non négligeables au niveau du cerveau séparent l'humain aux modèles animaux, tant par la taille, la complexité et la cinétique de développement du cerveau, que par la mise en place et la connectivité neuronale (Figure 20). En particulier, le cortex s'est complexifié au cours de l'évolution, et la mise en place du cortex humain diffère de celle d'autres espèces : surface, augmentation du nombre et de la diversité des cellules corticales, régions corticales supplémentaires, augmentation des périodes de formation de progéniteurs corticaux et de neurogénèse (Lui, Hansen, et Kriegstein 2011). Le modèle murin ne peut donc pleinement représenter la situation d'individus humains, le modèle d'iPSCs permet de s'affranchir de certaines de ces différences.



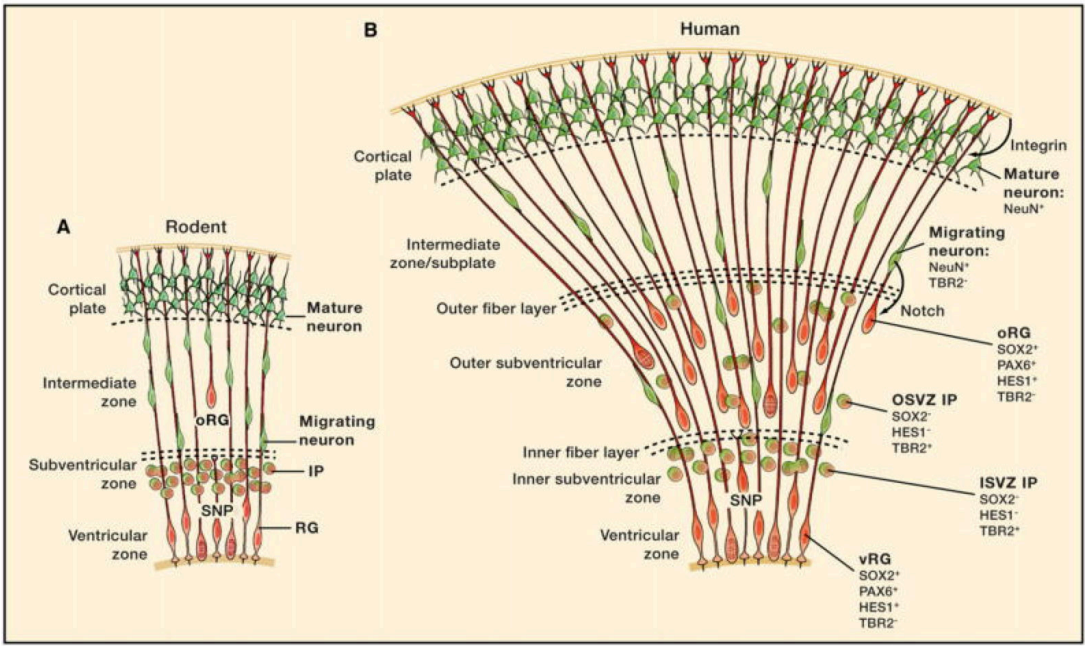


Figure 20 : Différences au niveau du système nerveux central entre l'humain et les espèces animales. En haut: arbre phylogénique présentant les variations de la taille et de la forme du cerveau au cours de l'évolution. En bas sont schématisées les différences dans le développement du néocortex entre l'humain et les rongeurs. On peut observer une augmentation de la complexité du développement cortical chez l'humain. Images issues de Lui et al. 2011.

IV/ Modèle d'étude de cellules souches pluripotentes induites

Les cellules pluripotentes sont des cellules ayant la capacité de se différencier en tous types cellulaires. Dans le corps humain, les seules cellules présentant cette capacité sont les blastocystes de la masse de cellules interne (ICM), présents au cours du stade précoce du développement embryonnaire (De Vos et al. 2016). En contrôlant les conditions de culture, il est possible de maintenir cette caractéristique de pluripotence *in vitro*. Ceci a donc permis, à partir de blastocystes, de mettre en culture des cellules souches embryonnaires (ESCs) (Martin 1981; Evans et Kaufman 1981). Les deux caractéristiques principales de ces ESCs sont l'immortalité (capacité de se renouveler indéfiniment) et la pluripotence (Martin 1981; Evans et Kaufman 1981). Ainsi il est possible d'obtenir en grande quantité, différents types de cellules différenciées. Ces ESCs ont permis plusieurs applications telles que l'étude du développement de certains types de tissus mais aussi la différentiation en certains types cellulaires, avec l'espoir de faire avancer la médecine régénérative. Cependant, l'utilisation des ESCs en médecine régénérative présente certaines limites : un rejet immunitaire après transplantation (antigènes différents de ceux des patients) ainsi qu'une limitation éthique pour l'utilisation de ces cellules. De plus, les cellules ainsi obtenues ne correspondent pas exactement à celles des patients, de part le fait que leurs génomes sont différents. Une reprogrammation de cellules somatiques en un autre type cellulaire pourrait donc limiter ces inconvénients.

1/Avancées antérieures

1-1/« Somatic Cell Nuclear Transfer » (SCNT)

Les premières expérimentations exposant la possibilité d'une reprogrammation cellulaire furent de transférer le noyau d'une cellule somatique au sein d'un « œuf » non fécondé énucléé (Wakayama et al. 2001; Gurdon 1962). Cette cellule va ensuite se diviser et donner un embryon génétiquement identique à la cellule somatique donneuse. Ces cellules présentent les mêmes antigènes que les donneurs et n'induisent de ce fait pas de rejet après transplantation chez ces mêmes individus (Tanabe et al. 2014). Ainsi une cellule pluripotente possédant un matériel génétique choisi tout en évitant un rejet immunitaire a pu être obtenue. L'un des premiers succès de cette technique fut le transfert du noyau d'une cellule épithéliale intestinale de grenouille adulte dans un œuf non fécondé énucléé en 1962 par John Gurdon (Gurdon 1962). Cependant chez l'humain, lors des premiers tests, ces cellules arrêtaient leur développement au stade 8 cellules (Egli et al. 2011). En 2013, il a été possible d'établir des ntESCs humaines (transfert de noyaux de fibroblastes de fœtus humain dans des ovocytes énucléées) (Tachibana et al. 2013). Cette méthode a démontré que l'état de pluripotence pouvait être rétabli chez des cellules différenciées et que donc ce processus était réversible.

1-2/Fusion cellulaire

Des expérimentations ont permis de démontrer la possibilité de reprogrammation par fusion entre deux types cellulaires. La première réussite fut la fusion entre des cellules musculaires et des cellules amniocytaires entrainant l'expression de gènes musculaires dans les cellules non musculaires (Blau et al. 1983). La fusion de cellules ES et de cellules somatiques, quant à elle, induit la reprogrammation de ces dernières en cellules

pluripotentes (Tada et al. 2001; Cowan et al. 2005), montrant ainsi que, tout comme les ovocytes, les cellules pluripotentes peuvent reprogrammer un noyau somatique en un état pluripotent. Ceci étant probablement permis par des facteurs de reprogrammation présents dans la cellule pluripotente. Cette fusion entraine des modifications épigénétiques induisant l'expression de gènes de pluripotence (qui sont fortement exprimés dans des cellules pluripotentes tels que les gènes Oct3/4).

Les SCNT et les expérimentations de fusion cellulaire ont montré que les « œufs » non fécondés et les cellules ES contiennent des facteurs pouvant induire la pluripotence au sein de cellules somatiques.

1-3/Clonage

En 1997, le transfert d'un noyau d'épithélium mammaire dans un ovocyte énucléé a permis le clonage d'une brebis (Wilmut et al. 1997). Il s'en est suivi le clonage de diverses espèces (souris, lapins, vaches, chèvres et porcs) (Tanabe et al. 2014).

1-4/Facteurs de conversion

L'expression de facteurs spécifiques de lignées permet de convertir directement une cellule somatique en un autre type cellulaire sans passer par un état pluripotent. Certaines protéines ont donc la capacité d'induire une reprogrammation cellulaire appelée trans-différenciation (reprogrammation d'une cellule somatique en une autre cellule somatique). Par exemple la protéine MYOD (« Myoblast Determination Protein ») permet la conversion de fibroblastes en myoblastes (Davis et al. 1987). Sa surexpression peut induire l'expression de gènes spécifiques du muscle squelettique dans d'autres

types cellulaires, telles que des cellules épithéliales de la rétine pigmentaire. Cependant, MYOD ne permet pas l'extinction de l'expression de gènes spécifiques des lignées ectodermales et endodermales, elle permet seulement la reprogrammation de cellules du mésoderme. Ainsi un seul facteur ne semble pas suffire pour permettre la reprogrammation de tous types cellulaires. Un autre exemple est la surexpression de C/EBP induisant la conversion directe de cellules B en macrophages (Xie et al. 2004). Ces résultats démontrent que l'expression ectopique de certains gènes peut induire une conversion du type cellulaire.

Ceci expose que les cellules somatiques ont la capacité d'être converties en d'autres types cellulaires, même après différenciation et développement. De plus, ces méthodes de SCNT et clonage exposent le fait que les ovocytes possèdent des facteurs capables de réverser le statut différencié de certaines cellules en une pluripotence. Cependant, ces différentes techniques présentent certaines limitations inhérentes à l'utilisation de cellules souches embryonnaires et n'offrent que des possibilités limitées d'obtention de tous types de cellules.

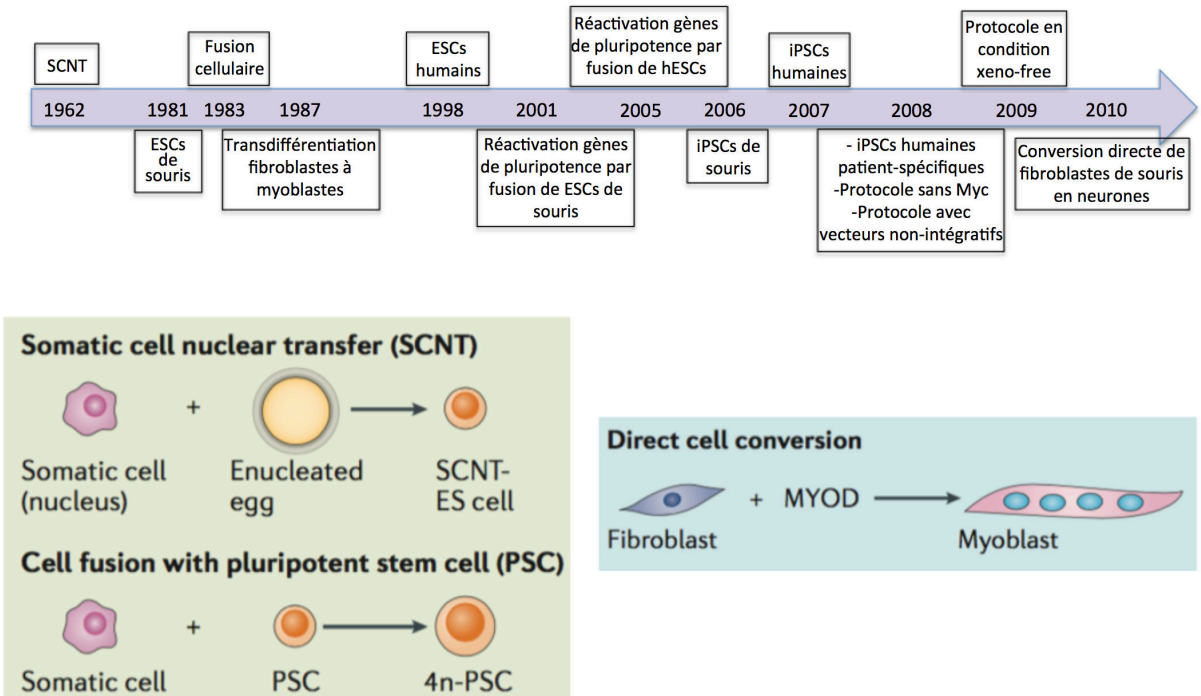


Figure 21 : Avancées ayant permis le développement d'iPSCs. En haut : Chronologie des avancées sur la reprogrammation cellulaire. En bas : Représentation des premières techniques de reprogrammation. Figures modifiées à partir de Takahashi et Yamanaka 2016.

2/ « induced Pluripotent Stem Cells » (iPSCs)

Pour se défaire des limitations attribuées aux ESCs, un nouveau type de cellules pluripotentes a été mis en place en se basant sur les données acquises des expérimentations de transferts nucléaires et de trans-différenciation.

2-1/Obtention d'iPSCs

En 2006 le laboratoire du professeur Yamanaka a permis la reprogrammation de fibroblastes de souris en cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) (Takahashi et Yamanaka 2006). Différentes molécules ont été démontrées comme étant des acteurs de la pluripotence et potentiellement des facteurs de reprogrammation. Dans cette étude, 24 facteurs ont été sélectionnés en fonction de leurs rôles ou de leur niveau d'importance d'expression dans les cellules ES. L'hypothèse fut que ces facteurs

pouvaient intervenir dans la maintenance de l'identité cellulaire des ES et qu'ainsi ils pouvaient être des gènes candidats importants pour l'induction d'un état de pluripotence dans des cellules somatiques. Afin d'identifier avec certitude lesquelles de ces protéines présentaient ce rôle de facteur de reprogrammation, des expérimentations de transduction rétrovirale ont été menées. Ces transductions ont tout d'abord été effectuées sur des fibroblastes embryonaires de souris (MEFs = « Mouse Embryonic Fibroblasts ») pour chacune des protéines et par combinaisons de plusieurs d'entre elles. Il a été trouvé qu'une combinaison des facteurs OCT3/4, SOX2 (SRY-box2), KLF4 (« Krüppel-loke factor 4 ») et C-MYC (« Myelocytomatosis oncogene ») (facteurs OSKM) induisait la pluripotence cellulaire. Ces 4 facteurs ont ensuite été introduits au sein de cultures de fibroblastes de souris adultes où ils ont aussi permis la reprogrammation de ces cellules somatiques non embryonnaires. Les cellules ainsi obtenues présentent les mêmes caractéristiques que les ESCs. A l'image des ESCs, elles sont pluripotentes et peuvent se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires. De même, elles induisent la formation de tératomes, de chimères et franchissent les tests de complémentation tétraploïde. De plus, cette reprogrammation cellulaire induit une reprogrammation épigénétique. En effet, il a été observé une déméthylation des promoteurs de gènes de pluripotence (tels que Oct4 et Nanog), un profil de méthylation des histones et d'expression de gènes très proche de celui des cellules ES ainsi qu'une réactivation du chromosome X éteint dans les lignées femelles. Au cours de la reprogrammation, une élongation des télomères a lieu (Takahashi et Yamanaka 2006). Ce protocole induit la formation de colonies d'iPSCs qui sont sélectionnées par leur expression sélective de différents marqueurs endogènes tels que OCT4, Nanog, Tra1-81 et SSEA4, et la phosphatase alkaline.

En 2007, l'équipe de Yamanaka a généré des iPSCs humaines suivant le même protocole

(Takahashi et al. 2007). En parallèle, une autre équipe a généré des iPSCs humaines avec une autre combinaison de facteurs : Oct3/4, Sox2, Nanog et Lin28 (Yu et al. 2007). A noter que lors de la reprogrammation de cellules humaines, contrairement à la reprogrammation des cellules murines, il n'y a pas de réactivation du chromosome X (Plath et Lowry 2011).

2-2/Limitations

2-2-1/ES vs iPSCs

Les cellules ainsi obtenues présentaient un profil proche de celui des ES : morphologie similaire ainsi que l'expression de mêmes marqueurs de pluripotence. Certaines études ont exposé des différences entre ces deux types cellulaires au niveau de leurs transcriptomes, protéomes et épigénomes (Liang et Zhang 2013; Ruiz et al. 2012; Chin et al. 2009; Ghosh et al. 2010). Cependant, d'autres études n'aboutissent pas aux mêmes conclusions (Guenther et al. 2010; Bock et al. 2011). Le nombre de cellules analysées semble impacter les conclusions issues de chacune de ces études, il est aussi envisageable que les conditions de culture y contribuent.

2-2-2/Risque tumoral

Un point négatif est principalement à déplorer : des tumeurs se sont développées au sein des souris chimères, probablement induites par la réactivation du gène *C-MYC* (Okita et al. 2007). Des équipes ont développé des protocoles permettant l'obtention d'iPSCs sans utiliser *C-MYC* (Nakagawa et al. 2007; Wernig et al. 2008). Elles ont ainsi réduit les

risques de développement de tumeurs. Cependant, C-MYC est un facteur important dans l'obtention d'iPSCs et dans leur capacité de transmission aux cellules germinales dans les chimères. Un protocole a ensuite été mis en place pour contrer ce désavantage en utilisant le facteur L-MYC à la place de C-MYC réduisant ainsi le risque tumoral mais pas le niveau d'efficacité (Nakagawa et al. 2010).

2-2-3/Risques de modifications génétiques et épigénétiques

Comme décrit précédemment, la reprogrammation semble pouvoir entrainer des modifications épigénétiques qui risquent d'altérer le phénotype des cellules étudiées. De plus, des mutations telles que des CNVs peuvent avoir lieu au cours de la reprogrammation et après des repiquages des cellules en sous-cultures (passages) (Kang et al. 2015).

2-2-4/Faible taux d'efficacité et durée importante

Le taux d'obtention de cellules iPSCs par expérimentation est assez faible. Moins de 1% des fibroblastes mis en présence des facteurs OSKM deviennent des iPSCs (Tanabe et al. 2014). D'autres études (Wernig et al. 2007) ont à leur tour obtenu des iPSCs et ont réussi à augmenter la pluripotence de ces cellules. Un autre aspect négatif de cette technique est la durée nécessaire à l'obtention d'iPSCs qui est de plusieurs mois à partir du moment où les cellules somatiques donneuses sont accessibles.

2-3/Processus de reprogrammation

Ce processus est un mécanisme complexe et sa caractérisation n'est pas complétement

éclairée. Cependant, de nombreuses études ont permis des avancées dans sa compréhension.

Le mécanisme de reprogrammation s'effectue à travers plusieurs évènements qui ont lieu soit de façon séquentielle soit en parallèle. Différentes hypothèses sur le mécanisme de reprogrammation ont été émises mais plusieurs ont été contredites. L'hypothèse finale serait que ce processus se déroule en deux étapes : tout d'abord stochastique puis déterministe, expliquant ainsi le faible nombre de cellules reprogrammées : beaucoup de cellules démarrent le processus de reprogrammation mais peu le terminent. Par exemple, il a été démontré que le processus de reprogrammation était initié dans plus de 20% des fibroblastes humains (Tanabe et al. 2013). En effet, 7 jours après la transduction par OSKM, 20% des cellules expriment TRA-1-60 (qui est un marqueur de surface spécifique aux cellules souches pluripotentes humaines). Quinze jours après la transduction, un certain nombre de cellules perdent cette expression de TRA-1-60 (montrant ainsi que l'événement limitant est plutôt la maturation que l'initiation) pour n'atteindre au final qu'un taux de 1% de cellules reprogrammées (Tanabe et al. 2014). De cette façon certains événements de reprogrammation vont être achevés, d'autres pas, et ainsi des iPSCs seront obtenues à différents temps de façon aléatoire.

Durant les premières étapes de la reprogrammation, les facteurs OSKM induisent des changements stochastiques dans l'expression des gènes (Buganim et al. 2012). Seulement quelques cellules franchissent cette étape limitante. Les facteurs OSKM peuvent se lier à des régions de la chromatine non accessibles à d'autres et ainsi permettre l'expression ou la répression d'autres gènes (Soufi et al. 2012). Dans un premier temps, les facteurs OSKM se fixe aux promoteurs et « enhancers » de gènes précoces de pluripotence afin d'induire leur expression. Selon l'étude de Soufi et al., C-

MYC semble avoir un rôle important dans l'engagement des trois autres facteurs au niveau de la chromatine. Parvailleurs, C-Myc se fixe aux promoteurs et « enhancers » de gènes de détermination somatique afin d'empêcher l'expression de ces gènes (Soufi et al. 2012; Sridharan et al. 2009). Dans un second temps, de façon déterministe, ces facteurs se fixent à des gènes de pluripotence plus tardifs. Il semblerait donc que les facteurs OSKM entrainent tout d'abord la génération partielle de cellules reprogrammées qui deviendront ensuite des iPSCs à part entière. Cependant, d'autres études présentent la possibilité d'une étape d'initiation non stochastique (David et Polo 2014) exposant la difficulté de la compréhension de ces mécanismes.

Une autre étude (Hawkins 2014) présente un processus en 3 étapes en se basant sur les travaux de plusieurs équipes (Tanabe et al. 2013; Hanna et al. 2009): initiation, maturation, stabilisation. Durant la phase d'initiation les gènes somatiques sont éteints par méthylation, la prolifération cellulaire est augmentée, le métabolisme passe d'une phosphorylation oxydative à une glycosylation, une réactivation de l'activité des télomérases ainsi qu'une transition de mésenchyme à épithélium (MET) ont lieu. La phase de maturation correspond à l'étape limitante (Tanabe et al. 2013) qui cause probablement la faible efficacité de reprogrammation. Durant cette phase des changements épigénétiques permettant l'expression des premiers gènes de pluripotence se produisent. Plusieurs études ont suggéré que l'expression de Nanog est nécessaire pour le passage des cellules de la phase de maturation à celle de stabilisation (Silva et al. 2009). Seulement 1% des cellules ayant initié le processus de reprogrammation vont atteindre le stade de stabilisation (Tanabe et al. 2013). Cette phase nécessite une répression des transgènes. Ainsi, seules les cellules qui ont activé l'expression endogène de gènes de pluripotence vont pouvoir maintenir leur capacité de pluripotence à ce stade. L'expression endogène de gènes de pluripotence est facilitée par la déméthylation

de promoteurs de ces gènes, ce qui explique pourquoi les inhibiteurs de méthyl-transférases accélèrent la reprogrammation en iPSCs.

2-4/Facteurs et voies

Plusieurs facteurs et voies ont un rôle important dans la génération d'iPSCs telles que la modification d'histones et la méthylation d'ADN.

2-4-1/Modification d'histones

Les promoteurs des gènes dont l'expression augmente au stade précoce de la reprogrammation ont des marques d'histones actives (régulation positive de la transcription) : H3k4me3, et les promoteurs qui sont activés à des stades plus tardifs au cours de la reprogrammation sont porteurs de H3k4me3 et H3K27me3 (inactivation, rôle inhibiteur de la transcription) ou de seulement H3K27me3 (Polo et al. 2012).

Au démarrage de la reprogrammation (48h après la transduction), OCT3/4, SOX2 et KLF4 se fixent à des promoteurs localisés au niveau de chromatine compactée. Les H3K4s ne sont pas méthylées dans ces régions, et après la liaison de ces facteurs, cette hétérochromatine va s'ouvrir. En parallèle, c-MYC peut se fixer à des régions de chromatine ouverte qui sont modifiées par des H3k4me1,2 ou 3 mais ne peut se lier à des régions fermées de lui même, pour cela il nécessite l'aide des 3 autres facteurs OSK (Tanabe et al. 2014). Ainsi les OSK sont les initiateurs ouvrant les barrières épigénétiques et augmentant l'accessibilité de facteurs de transcription impliqués dans la reprogrammation. A noter que les facteurs OSKM ne peuvent se lier à des régions fermées de chromatine modifiée par H3K9me3 dans les phases précoces de la reprogrammation (Soufi et al. 2012). L'efficacité de reprogrammation peut être

augmentée en agissant sur les modifications d'histones.

2-4-2/ Méthylation de l'ADN

Les promoteurs de plusieurs gènes marqueurs des cellules ES (tels que Nanog et Oct3/4) sont déméthylés au cours de la reprogrammation (Takahashi et Yamanaka 2006; Takahashi et al. 2007). Des changements de méthylation adéquats sont importants pour permettre une totale reprogrammation. Dans les cas de cellules qui sont partiellement reprogrammées, les changements de méthylation d'ADN sont insuffisants aux *loci* de gènes associés aux cellules ES (tel que Nanog et Oct3/4) (Mikkelsen et al. 2008), ainsi un traitement par un inhibiteur de méthyl-transferase (réduisant donc la méthylation de l'ADN) augmente l'efficacité de la reprogrammation en induisant la maturation de cellules partiellement reprogrammées afin qu'elles deviennent des iPSCs entièrement reprogrammées (Mikkelsen et al. 2008).

2-5/Facteurs augmentant l'efficacité de reprogrammation

Plusieurs types de facteurs peuvent augmenter l'efficacité de reprogrammation : des gènes associés à la pluripotence tels que *UTF1* ou *SALL4*, des gènes régulateurs du cycle cellulaire telle que Cyclin D (promouvant ainsi les capacités de renouvellement cellulaire), ainsi que des modificateurs épigénétiques tel que SUV39H1 qui vont pouvoir influencer l'expression de facteurs de pluripotence (Onder et al. 2012; Zhao et al. 2008; Takahashi et Yamanaka 2016). L'inhibition d'acteurs de la méthylation de l'ADN tels que Mbd3 permet d'augmenter le taux de reprogrammation (Rais et al. 2013). D'autres protéines telles que Lin28 et Lin 41 (Worringer et al. 2014, 7; Tanabe et al. 2013) agissant sur les micro-RNAs, jouent un rôle dans la pluripotence de cellules, et leur

régulation peut influencer les succès de reprogrammation. De plus, la reprogrammation cellulaire s'effectue aussi avec des changements de l'expression de micro ARNs (miRNAs) qui sont des petits ARNs non codant se fixant à des séquences complémentaires d'ARNm et induisant une dégradation ou un « silencing » de cet ARNm (Wang et al. 2013). Certains miRNAs permettent d'augmenter et de réduire l'efficacité de reprogrammation (Yang et al. 2011), voire aussi de générer, seuls et sans facteur, des iPSCs (Miyoshi et al. 2011).

Un autre point important permettant une augmentation de l'efficacité de la reprogrammation est la stœchiométrie des facteurs de reprogrammation utilisés. Un deséquilibre des facteurs limite les capacités de reprogrammation.

2-6/Evolution technique

2-6-1/Vecteurs

Dans un premier temps, les facteurs « Yamanaka » étaient introduits par des virus intégratifs. Ce mode intégratif entraine des risques de cassure, d'activation anormale de gènes à proximité mais aussi de réactivation des gènes intégrés. Des méthodes alternatives ont permis l'introduction de ces facteurs par des vecteurs non intégratifs: des plasmides (Okita et al. 2008), des adénovirus (Stadtfeld et al. 2008), le virus Sendai (Fusaki et al. 2009), mais aussi des transposons de type PiggyBac (Woltjen et al. 2009), des ARNm (Warren et al. 2010), des protéines perméables à la membrane (Kim et al. 2009) et des petits composés moléculaires (Hou et al. 2013). Ainsi ces cellules ne présenteront pas de danger pour des applications cliniques.

2-6-2/Cellules somatiques reprogrammées

Les cellules initiales peuvent maintenant provenir de méthodes moins invasives : cellules épithéliales du rein recueillies dans l'urine, cellules buccales, cellules du cordon ombilical, kératinocytes des cheveux, pulpe de dent et sang périphérique. Les cellules ensuite dérivées auront un profil d'expression globalement similaire mais peuvent tout de même présenter certaines différences (Chen et al. 2013).

2-6-3/Cellules somatiques induites

Ces iPSCs peuvent ensuite être différenciées en différents types cellulaires suivant des protocoles spécifiques tels que en neurones, cardiomyocytes, cellules rénales (De Vos et al. 2016).

2-6-4/Reprogrammation directe

La mise en place de ces multiples protocoles a été suivie du développement de plusieurs méthodes de reprogrammation directe d'une cellule somatique à une autre : fibroblastes en cardiomyocytes (Ieda et al. 2010), fibroblastes en neurones (Vierbuchen et al. 2010), fibroblastes en cellules hépatocytaires (Huang et al. 2011).

2-7/Différenciation en cellules neuronales

Deux principales méthodes en 2D ont été développées : soit un passage par le stade EBs (« Embryoid Bodies »), soit par conversion directe.

2-7-1/ « Embryoid Bodies »

L'induction neuronale des cellules souches se déroule par la formation de EBs avec du FGF. Il y a ensuite une induction en rosettes neuronales (qui sont des organisations polarisées de cellules neuroépithéliales) par l'utilisation de combinaisons de morphogènes tels que Wnt, SHH, BMPs, RA et FGF (Lim et al. 2015). Les cellules neuroépithéliales peuvent être différenciées en différents types : neurones dopaminergiques avec par exemple les facteurs SHH et WNT8 (Kriks et al. 2011), motoneurones de la moelle épinière en présence d'acide rétinoïque et de SHH («Sonic hedge hog »*)* (Li et al. 2005), interneurones GABA (Liu et al. 2013) et neurones corticaux : Noggin, SB431542, FGF2, EGF et BDNF (Boissart et al. 2013). Ce type de protocole donne la possibilité d'avoir une étape intermédiaire d'obtention de progéniteurs neuronaux (NPCs) ou cellules souches neuronales (NSCs) qui peuvent se renouveler.

2-7-2/Conversion directe

Des études ont réalisé une conversion neuronale à partir de cellules souches pluripotentes humaines avec l'expression d'un seul facteur : Neurogenin2, NeuroD1 ou ASCLA (Zhang et al. 2013; Chanda et al. 2014). Les neurones ainsi obtenus forment rapidement des synapses deux semaines après l'induction neuronale, réduisant fortement la durée nécessaire par rapport aux autres protocoles. De plus, cela permet d'obtenir une culture homogène avec 100% de cellules corticales (Zhang et al. 2013). Cependant, un point négatif est à déplorer : ces protocoles ne présentent pas d'étape à laquelle les cellules peuvent être amplifiées (permettant l'obtention d'un stock de cellules utilisables à un stade intermédiaire de différenciation), nécessitant un grand

nombre initial de cellules somatiques.

2-8/Applications

Des recherches sur des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (neurones dopaminergiques) et Alzheimer (neurones corticaux) ainsi que des maladies neurodévelopementales telles que l'autisme et la schizophrénie ont été réalisées (Yagi et al. 2011; Sánchez-Danés et al. 2012; Brennand et al. 2011).

2-8-1/Modélisation de maladies (maladies psychiatriques)

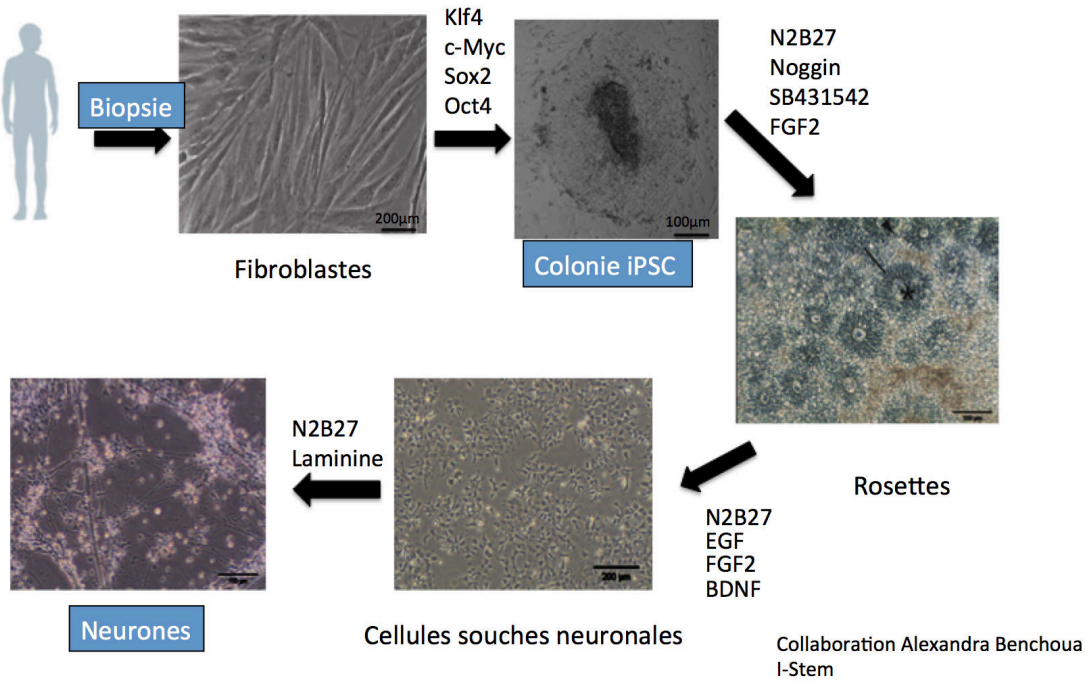
Un des principaux intérêts de l'utilisation des iPSCs est de pouvoir travailler sur des cellules présentant des caractéristiques génétiques identiques à celles des cellules d'intérêt issues de patients. Ainsi, les cellules dérivées d'iPSCs vont permettre de modéliser des maladies *in vitro*. Nous nous intéressons ici plus particulièrement aux maladies neuronales. Différents protocoles ont été développés permettant d'obtenir le type cellulaire adéquat représentatif de la pathologie d'intérêt. Ceci dépend des spécificités du protocole : des étapes, du milieu de culture, de la concentration et de la nature des facteurs. Plus de 40 types de cellules neuronales peuvent être obtenues: des neurones glutamatergiques, GABAergiques, dopaminergiques, des motoneurones mais aussi des astrocytes et des oligodendrocytes (Wen et al. 2016). Cependant il est à noter qu'il n'est pas possible d'obtenir des cultures entièrement pures d'un type cellulaire (Wen et al. 2016). Pour les TSA, aucun sous-type neuronal n'a été clairement associé, mais les neurones corticaux ont leur importance. En effet, le cortex est essentiel dans les fonctions cognitives, qui sont affectées chez les patients, mais aussi par le fait que les

symptômes associés aux TSA peuvent correspondre à des défauts de connectivité corticale et de migration neuronale au niveau du cortex cérébral (Just et al. 2006). De grandes avancées ayant eu lieu dans la différenciation en neurones corticaux tels que les neurones pyramidaux, qui représentent 80% des neurones corticaux, et les interneurones corticaux, vont permettre une modélisation de maladies telles que l'autisme et la schizophrénie.

En plus du sous-type neuronal, la couche corticale est à prendre en considération, les neurones de chaque couche ayant des fonctions différentes. Par exemple, ceux des couches II et III sont impliqués dans la majorité des projections intracorticales, tandis que ceux de la couche VI envoient la majorité de leurs projections au niveau du thalamus (Espuny-Camacho et al. 2013). La prise en compte des phases du développement cérébral et plus particulièrement cortical *in vivo* est un élément clef. La cinétique d'expression des marqueurs de différenciation et leur combinaison permettent de donner une identité particulière aux cellules.

Au cours de ce travail de thèse, le protocole utilisé a été celui publié dans Boissart et al 2013. Les iPSCs sont induites par les facteurs « Yamanaka » au sein de vecteurs viraux « Sendaï Virus ». Les cellules souches ainsi obtenues sont mises en culture en présence du facteur FGF2 et peuvent être amplifiées. Au bout de 10 jours de culture, des rosettes neurales sont collectées et mises en culture avec les facteurs FGF, EGF et BDNF. A cette étape-ci, une amplification des LCPs (« Late Cortical Progenitors ») obtenus est effectuée. Ces cellules progénitrices sont ensuite différenciées en neurones en absence des facteurs de croissance. Les cellules ainsi obtenues présentent les caractéristiques (expression de marqueurs cellulaires) des neurones glutamatergiques corticaux des couches II à IV. L'observation de marqueurs de pluripotence permet lors des premières étapes de s'assurer de l'obtention de cellules pluripotentes. Lors de la différenciation, les

marqueurs de détermination sont observés (Figure 21).



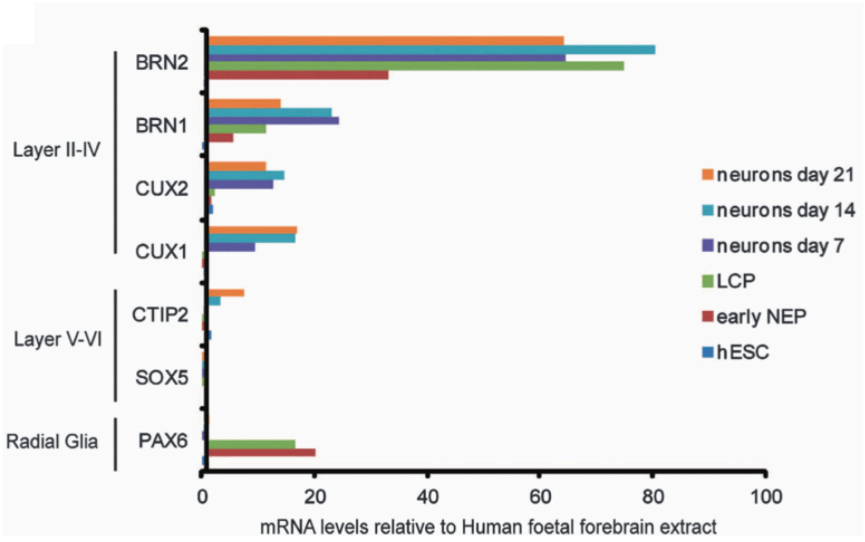


Figure 21 : Obtention de neurones glutamatergiques corticaux des couches II à IV. En haut : les différentes étapes du protocole de reprogrammation et différenciation sont représentées. En bas : Les cellules obtenues expriment des marqueurs des couches corticales II à IV. Haut de la figure : Données du laboratoire ; Bas de la figure : données publiées dans Boissart et al 2013.

2-8-2/ Etudes de maladies neuropsychiatriques effectuées à partir d'iPSCs

Des iPSCs issues de cellules de patients ont pu être dérivées dans les 3 types cellulaires majoritaires qui sont importants dans la balance E/I, aspect primordial dans le fonctionnement neuronale et probablement dans le développement de maladies neuropsychiatriques. Il s'agit de neurones excitateurs (Boissart et al. 2013), interneurones (Nicholas et al. 2013) et astrocytes (Krencik et Zhang 2011).

Dans la littérature et dans le cadre des travaux de thèse, différentes caractéristiques de ces cellules ont été étudiées par différentes approches expérimentales (Western-Blot, Immunocytochimie, Electrophysiologie): la morphologie des neurones, l'expression de protéines synaptiques ainsi que des analyses fonctionnelles.

- Schizophrénie : Plusieurs études ont permis d'étudier des cellules neuronales issues d'iPSCs de patients schizophrènes (cas sporadiques et mutations identifiées). Parmi ces études, des iPSCs produites par des vecteurs épisomaux non intégratifs d'individus contrôles (membres non atteints de la familles et un individu contrôle extérieur à la famille) et de patients porteurs d'une mutation frame shift du gène *DISC1* ont été différenciées en neurones corticaux (Wen et al. 2014). Les neurones de ces patients présentent des défauts dans la formation de synapses, dans le relargage des vésicules synaptiques, dans la fréquence des courants excitateurs spontanés, ainsi qu'une dérégulation de la transcription de gènes synaptiques et de l'expression de protéines en interaction avec DISC1. Pour confirmer les résultats de ces études, les auteurs ont généré des iPSCs isogéniques par la méthode TALEN *(«* Transcription activator-like effector nucleases ») (Wen et al. 2014). D'autres travaux ont étudié des neurones issus d'iPSCs chez des cas sporadiques de patients schizophrènes et ont montré une diminution du nombre et de la longueur des neurites, de la connectivité

neuronale, du nombre de synapses exprimant PSD95, ainsi qu'une altération de l'expression de gènes et du métabolisme oxydatif. Ces phénotypes ont pu être réversés par des traitements tels que la loxapine ou l'acide valproïque (Brennand et al. 2011; Paulsen et al. 2012).

- Bipolarité : Des neurones et des NPCs de cas sporadiques ont été générés. Ces cellules présentent des défauts dans la signalisation calcique ainsi que dans l'expression de gènes impliqués dans le développement et dans la plasticité neuronale (Chen et al. 2014; Madison et al. 2015).

- Syndrome de Rett : Une étude a développé des neurones (glutamatergiques et GABAergiques) dérivés d'iPSCs de patients présentant une mutation au sein du gène *MECP2* (Marchetto et al. 2010). Les auteurs ont ainsi pu obtenir des cultures représentant la mosaïque d'expression de *MECP2* due à l'inactivation aléatoire d'un des chromosomes X. Les neurones porteurs de la mutation présentent une diminution de la taille du corps cellulaire, une altération de la densité d'épines dendritiques et une diminution du nombre de synapses excitatrices (réduction du marquage V-Glut), suggérant ainsi un défaut synaptique. Ces résultats sont confirmés par d'autres études (Cheung et al. 2011; Ananiev et al. 2011). Il a aussi été observé une diminution de la fréquence et de l'amplitude des courants synaptiques spontanés et des courants calciques. Ces résultats corrèlent avec ceux observés à partir de modèles murins et de cerveaux *post-mortem*. Il a été possible de reverser le défaut de synapses glutamatergiques et l'expression de MeCP2 avec un traitement à la gentamicine (un antibiotique de la famille des aminoglycosides, se liant à une sous-unité ribosomique, et réduisant les corrections à l'étape de la traduction : un autre acide aminé est positionné

à la place du codon stop, entrainant tout de même l'expression de la forme longue de la protéine mutée) (Marchetto et al. 2010). D'autres études utilisant des neurones issus d'iPSC de patients Rett ont trouvé le même type de résultat au niveau de la taille du corps cellulaire (Kim et al. 2011; Cheung et al. 2011). Une de ces études a utilisé des contrôles isogéniques: les neurones au sein de leurs cultures dont le chromosome X portant la mutation est inactivé. Cependant, en fonction des études, l'inactivation du chromosome X est soit aléatoire (Marchetto et al. 2010), soit non-aléatoire (Cheung et al. 2011).

Une mutation au sein du gène *CDKL5* entraine un syndrome de Rett atypique. Des neurones issus d'iPSCs de patients porteurs de cette mutation présentent des altérations des épines dendritiques identiques à celles observées dans le modèle murin (Ricciardi et al. 2012). Une diminution de l'expression de CDKL5 induit des défauts de formation d'épines dendritiques, de la quantité de VGlut1 et une augmentation du nombre d'épines dendritiques de morphologie de filopodes.

- Syndrome de l'X-fragile (FSX): Les différentes études de ce syndrome via des neurones issus d'iPSCs ont démontré des altérations des neurites, de l'expression de PSD95, de l'activité calcique et de la réponse au glutamate (Doers et al. 2014; Liu et al. 2012; Sheridan et al. 2011). Un point intéressant à noter est que les modèles murins et les études à partir de cerveaux humains *post mortem*, avaient démontré une augmentation de la densité des épines (Irwin et al. 2001; Comery et al. 1997) alors que les modèles iPSCs montrent des épines moins nombreuses et plus courtes (Sheridan et al. 2011). Il est possible que *in vivo*, un mécanisme compensatoire soit mis en place. Une autre explication serait que cette différence soit due à la culture en 2D.

- Syndrome de Timothy : Des NPCs et des neurones corticaux issus d'iPSCs de patients porteurs d'une mutation au sein du gène causal (*CACNA1C*) présentent des défauts de différentiation et de signalisation calcique. Les neurones montrent une diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase et une augmentation de la dopamine et de la noradrénaline. Les phénotypes ont pu être reversés par un traitement par inhibiteurs des kinases dépendantes à la cycline tel que la Roscovitine, ou des inhibiteurs de canaux de type L (Paşca et al. 2011).

- Syndrome de Phelan Mc-Dermid : Des neurones corticaux dérivés d'iPSCs de deux patients porteurs d'une délétion 22q13 d'environ 1Mb (couvrant *SHANK3*) ont été générés (Shcheglovitov et al. 2013). Seulement 15% de leurs neurones exprimaient des marqueurs corticaux et 2 à 5% les différentes protéines SHANK. Pour minimiser l'hétérogénéité des cultures, les cellules ont été marquées avec CAMKIIα-GFP, marqueur spécifique des neurones avancés dans la maturation. Cependant, cette équipe obtenait des cultures de patients et d'individus contrôles présentant une densité neuronale différente, ce qui risquait d'influencer leurs résultats obtenus. Pour contrôler les différences de densité cellulaire (ainsi que les variables de conditions de culture), des co-cultures de cellules contrôles et de cellules de patients (infectés avec CAMKIIα-GFP ou CAMKIIα-mKate2) ont été effectuées afin d'avoir des conditions les plus identiques possibles. Les neurones de patients présentent une diminution du nombre de synapses, de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs excitateurs, et plus précisément une diminution des courants AMPA et NMDA due à une diminution du nombre de AMPARs et NMDARs, montrant ainsi des défauts dans la transmission synaptique excitatrice. De plus, une diminution des niveaux d'ARNm et de la protéine SHANK (non tronquée) a été observée. Une expression exogène de SHANK3 permet de reverser le phénotype

démontrant ainsi le rôle de ce gène dans les anomalies de ces neurones. Un traitement à l'IGF1 induit le même effet (Shcheglovitov et al. 2013). Un autre aspect intéressant de cette étude a été de montrer la présence de trois populations de synapses excitatrices : 1/ exprimant SHANK3 uniquement, 2/ exprimant SHANK3 et PSD95 ou 3/ exprimant seulement PSD95. Le traitement à l'IGF1 (« Insulin-like Growth Factor-1 ») induit une augmentation de l'expression de PSD95 dans les synapses exprimant PSD95 et induit également une diminution de l'expression de SHANK3.

- TSA : Des neurones d'un patient porteur d'une translocation *de novo* du gène TRPC6 (« Transient Receptor Potential Canonical 6 ») ont été générés (Griesi-Oliveira et al. 2015). Ce gène code pour un canal calcique et est impliqué dans la formation d'épines dendritiques et de synapses. Les neurones issus de patients présentent une altération du développement neuronal, une diminution de la longueur et de l'arborisation des neurites, de la densité de marquages VGLUT1 et de la densité des épines dendritiques et des synapses ainsi que de la signalisation calcique. Ce phénotype a pu être reversé par le traitement à l'IGF1 ou à l'hyperforine (qui est un activateur des canaux TRPC6).
Une autre étude a été réalisée sur des neurones corticaux glutamatergiques issus de hESCs dont le génome a été édité induisant une mutation dans le gène *NRXN1* (Pak et al. 2015). Les neurones ainsi obtenus présentent des altérations dans le relargage de neurotransmetteurs et dans l'expression de gènes associés à l'adhésion cellulaire et à la différenciation neuronale ainsi qu'une diminution de la différenciation gliale.

Une autre étude effectuée par nos collaborateurs d'I-Stem a permis la dérivation de neurones corticaux des couches II à IV à partir d'iPSCs de deux patients TSA porteurs d'une mutation *SHANK3 de novo* et de deux individus contrôles (Boissart et al. 2013;

Darville et al. 2016). Ces individus sont les mêmes que ceux que nous avons étudié au cours de mon travail de thèse. Les neurones de ces patients présentent une diminution des branchements neuritiques visualisée à partir de technique à haut débit, de l'expression de SHANK3 au niveau post-synaptique (analysée par immunofluorescence sur microplaques) et de l'intensité et de la fréquence des oscillations calciques spontanées (mesurées sur des champs entiers de cellules). Dans cette étude des molécules ont été testées, 22 ont permis une augmentation des quantités d'ARNm *SHANK3* dans les cellules contrôles, et 6 ont été sélectionnées pour des tests plus approfondis. Trois d'entre elles induisent une augmentation de la quantité de protéines SHANK3 et du nombre de synapses colocalisant SHANK3 et PSD95. Enfin deux d'entre elles, le lithium et l'acide valproïque, augmentent le nombre de colocalisations de PSD95 et de Synapsine et donc de contacts pré- et post-synaptiques et induisent une surexpression (ARN) d'un certain nombre de gènes dont des gènes synaptiques. Ces deux molécules augmentent aussi la fréquence et l'intensité des oscillations calciques spontanées, effet qui est diminué voire éteint en présence de shRNA dirigés contre *SHANK3*, montrant ainsi que l'effet des ces molécules est fonction de la protéine SHANK3. Ces molécules ont ensuite été testées sur les neurones des patients et ont induit un faible effet sur l'arborisation neuritique, mais augmente significativement l'expression de SHANK3 aux épines dendritiques ainsi que la fréquence et l'intensité des oscillations calciques (Darville et al. 2016).

En résumé, les études sur des neurones issus d'iPSCs de patients TSA montrent une diminution de la connectivité synaptique avec un plus faible nombre de synapses et des synapses plus immatures et moins fonctionnelles. Ces résultats peuvent aussi dépendre de la résolution des approches employées et des populations cellulaires globales testées.

Une autre étude (Yi et al. 2016), par une technique de recombinaison homologue, a généré des neurones à partir de hES ayant une délétion conditionnelle (contrôlée par l'expression d'une Cre-recombinase active ou inactive) homozygote ou hétérozygote de l'exon 13 de *SHANK3*. Cette mutation permet ainsi d'éliminer la majorité des isoformes. De cette façon sont obtenus des mutants et des contrôles issus des mêmes clones d'ES. Ces neurones porteurs de la mutation présentent une diminution de la longueur et du nombre de branchements des neurites, des EPSCs et de l'amplitude des mEPSCs ainsi qu'une augmentation de la résistance des courants mesurés par la technique de patch-clamp. Cette dernière caractéristique dépend en partie des canaux ioniques. Il a été montré que les canaux K^+, Na^+ et que les récepteurs glutamatergiques ionotropiques n'avaient pas de rôle à ce niveau mais que la perte de *SHANK3* induisait sélectivement et sévèrement des défauts au niveau des courants I_h (courant activé par une hyperpolarisation). Ces courants sont médiés par les canaux HCN (« Hyperpolarization-activated cycloc nucleotide-gated channel ») et contrôlent l'excitabilité neuronale, le potentiel de membrane au repos et l'oscillation rythmique des neurones (Benarroch 2013). De plus, cette étude a montré que SHANK3 se lie directement aux protéines HCN et que la perte de *SHANK3* induisait une diminution de la quantité de protéines HCN agissant ainsi sur les courants I_h. Enfin, en inhibant les canaux I_h, une diminution de la croissance neuritique, du nombre de protusions primaires, de la densité synaptique et de branchements dendritiques est observée, corrélant avec les phénotypes observés en cas de mutations *SHANK3*. Il semblerait que les défauts fonctionnels de la synapse soient un résultat indirect d'un trouble de ces I_h causés par les mutations *SHANK3*.

Troubles	Mutation	Phénotype	Traitement	Références
TSA	*TRPC6*	↘Longueur et arborisation des neurites ↘vGlut1 ↘Densité des épines ↘Densité synaptique ↘Signalisation calcique	IGF1 ou Hyperforine	Griesi-Oliveira *et al.* 2015
	SHANK3	↘Branchements neuritiques ↘Intensité et fréquence des courants calciques	Lithium ou Acide Valproïque	Darville *et al.* 2016
Phelan-McDermid	Délétion 22q13	↘Densité synaptique ↘Fréquence et amplitude des mEPSCs ↘Courants AMPAR et NMDAR ↘AMPAR et NMDAR	IGF1	Shcheglovitov *et al. 2013*
Syndrome de Rett	*MECP2*	↘Taille du corps cellulaire ↘Densité des épines ↘Nombre synapses excitatrices ↘Fréquence et amplitude des courants synaptiques spontanés et des courants calciques	Gentamicine	Marchetto *et al.* 2010
	CDKL5	↘Densité des épines ↘vGlut1 ↗Proportion filopodes		Ricciardi *et al.* 2012
Syndrome de l'X-fragile	*FMR1*	↘Croissance neuritique ↘Expression de PSD95 ↘Fréquence et amplitude des courants calciques		Liu *et al.* 2012
Syndrome de Timothy	*CACNA1C*	↗Amplitude des courants calciques Défauts de différentiation	Roscovitine ou inhibiteurs de canaux de type L	Pasca *et al.* 2012

Table 4: Modèles iPSCs de formes de TSA.

En conclusion, le modèle des iPSCs est utile car il permet d'obtenir des centaines de clones d'iPSCs qui ont la capacité de s'auto-renouveler et qui présentent un génome identique à celui de l'individu donneur. Ces cellules vont ensuite pouvoir se différencier en un type cellulaire d'intérêt pour la maladie étudiée.

2-8-3/Tests de molécules/médicaments

Le modèle des iPSCS permet donc à la fois d'étudier à quel niveau se situe le dysfonctionnement cellulaire induisant une maladie, mais aussi permet de tester des

composés chimiques pour réverser le phénotype étudié. Plusieurs études ont permis de détecter des molécules pouvant réduire les défauts cellulaires associés à certaines maladies, par exemple IGF1 pour le syndrome de Rett (Marchetto et al. 2010) et l'isoxazole pour la maladie de Parkinson (Ryan et al. 2013).

2-8-4/Médecine régénérative

Les cellules dérivées d'iPSCs pourraient aussi permettre une thérapie cellulaire. La mise en place de contrôle de qualité permet d'ouvrir les portes à des applications cliniques. Des essais cliniques sur l'homme ont été initiés, en particulier par l'utilisation de cellules épithéliales pigmentaires issues d'iPSCs dans le but de soigner la dégénérescence de la macula.

L'avantage étant que ces cellules seraient HLA compatibles et ne nécessiteraient donc pas de traitements immunosuppresseurs. Certains points sont encore à améliorer. Tout d'abord il est difficile de différencier des cellules issues d'iPSCs à des stades plus avancés que le stade foetal. De plus, il n'est pas assuré que ces cellules survivent *in vivo,* ni qu'elles s'intègrent à l'organe cible de façon à rétablir son bon fonctionnement. Cependant certaines études ont démontré un succès à travers des modèles murins et de primates (non humains): des progéniteurs hématopoïétiques issus d'iPSCs ont permis de traiter des souris modèles atteintes d'une anémie génétique causée par un défaut au niveau du gène β-globine (Hanna et al. 2007), des neurones issus d'iPSCs ont permis de soigner des souris atteintes d'un syndrome similaire à celui de la maladie de Parkinson (Wernig et al. 2008), des cellules souches pluripotentes de rat ont été injectées chez des blastocytes de souris porteurs d'une mutation PDX1 induisant une insuffisance pancréatique et ont permis le développement d'un pancréas fonctionnel (Kobayashi et

al. 2010). En 2014, un essai clinique a été réalisé chez l'humain pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD « Age-related macular degeneration ») en utilisant des iPSCs autologues (Kamao et al. 2014).

Les troubles neuropsychiatriques pourraient être dus à différentes altérations : formation d'un complexe équilibré entre les cellules neuronales et les cellules gliales avec un ratio adéquat, migration des cellules aux bonnes localisations, formation d'une arborisation dendritique et axonale afin de permettre une communication efficace entre les cellules, et la mise en place d'une plasticité suffisante des synapses (Young-Pearse et Morrow 2016).

OBJECTIFS DE LA THESE

La protéine SHANK3 est une protéine essentielle dans la mise en place de la PSD des neurones glutamatergiques. Elle joue ainsi un rôle primordial dans la formation des épines et dans le fonctionnement neuronal. Des analyses génétiques au laboratoire ont détecté des mutations au sein du gène *SHANK3* chez des patients atteints de TSA. Ces mutations présentent une prévalence élevée en regard des autres gènes impliqués dans les TSA ainsi qu'une forte pénétrance.

Au cours de ce travail de thèse nous avons voulu étudier les impacts de mutations *SHANK3* sur un modèle de neurones glutamatergiques dérivés d'iPSCs de patients porteurs de ce type de mutation.

Notre premier objectif fut d'étudier les conséquences de ces mutations au niveau synaptique. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques des épines dendritiques (densité, morphologie).

Notre second objectif a consisté en l'analyse des effets de ces mutations sur l'activité neuronale. Pour cela, nous avons réalisé des expérimentations d'imagerie calcique et d'électrophysiologie.

RESUME

Des mutations au sein du gène *SHANK3* sont associées au développement de TSA. Elles ont été détectées chez environ 0,6% des patients atteints TSA et chez plus de 2% des patients atteints de TSA et présentant un retard mental (Leblond et al. 2014). Ces mutations présentent une forte pénétrance. Notre laboratoire a démontré que SHANK3 contribue aux TSA selon un modèle de gène causal. Des travaux réalisés à partir de modèles murins ont démontré qu'un déficit au niveau du gène *Shank3* induisait principalement des troubles des interactions ainsi que des défauts dans la formation et la fonctionnalité des épines et synapses. Ceci n'est pas étonnant puisque SHANK3 joue un rôle crucial dans l'élaboration et le maintien de la PSD. Ses multiples domaines lui permettent d'interagir directement et indirectement avec de nombreuses protéines synaptiques. Cependant, de part certaines différences entre le cerveau humain et le cerveau murin, des résultats obtenus sur des souris ne peuvent être directement corrélés avec la situation observée dans le cerveau de patients. Au cours de ce projet de thèse nous avons voulu nous affranchir de cet aspect en travaillant sur des neurones humains. Ceci nous a été permis grâce au développement de techniques permettant la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes ainsi que des protocoles de différenciation en cellules neuronales. Nous avons obtenu des fibroblastes de quatre patients présentant chacun une mutation tronquante *de novo* située au niveau de l'exon 21 de *SHANK3.* Ces fibroblastes ont ensuite été reprogrammés en iPSCs par nos collaborateurs de l'institut I-Stem puis dérivés en cellules souches neuronales (NSCs) que nous avons différenciées au sein de notre laboratoire en neurones corticaux

glutamatergiques des couches II à IV selon un protocole publié par notre équipe collaboratrice (Boissart et al. 2013)

Au cours de ce travail, plusieurs aspects nous ont intéressés. Tout d'abord, nous avons étudié les épines dendritiques de ces neurones. Pour nous permettre d'effectuer cela, nous avons développé un protocole d'analyse quantitative en 3D (Article 1).

Ce protocole nous a permis de caractériser en trois dimensions la morphologie des épines dendritiques des neurones pyramidaux obtenus selon notre méthode de différentiation, puis de comparer les neurones d'individus contrôles et de patients (Article 2, soumission prévue en 2016). Les résultats ont démontré une diminution de la densité des épines ainsi que leur volume chez les patients atteints de TSA et mutés dans le gène *SHANK3.* De façon intéressante, nous avons aussi visualisé des différences de maturation morphologique de ces épines. Ces caractéristiques ne sont pas étudiées dans la littérature.

Ceci nous a ensuite amené à nous intéresser à la fonctionnalité de ces neurones par des expérimentations de mesures d'oscillations calcique par imagerie. Pour cela nous avons élaboré une méthode d'analyse au cours de laquelle nous excluons l'activité des astrocytes et ne prenons pas en compte les amas cellulaires (Article 2, soumission prévue en 2016). Les algorithmes développés (Coll. Anne Danckaert) permettent une quantification de meilleure résolution. Nous avons ainsi pu mesurer l'activité calcique basale des neurones dérivés d'iPSCs, qui se trouve augmentée chez les patients atteints de TSA. Ces résultats sont à mettre en lien avec une proportion plus importante d'épines matures chez les patients porteurs d'une mutation tronquante au sein du gène *SHANK3.* En d'autres termes, les synapses sont moins nombreuses mais seraient plus actives en présence d'une seule copie du gène *SHANK3*. Ces résultats semblent ainsi exclure une

compensation possible par d'autres membres de la famille SHANK (SHANK1-2) aussi exprimés dans le cortex cérébral.

L'ensemble de nos résultats démontre que des mutations tronquantes de *SHANK3* induisent des perturbations de la mise en place et de la maturité des épines, ainsi que de l'activité neuronale.

Article 1 :

Three-dimensional Quantification of Dendritic Spines from Pyramidal Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells.

Gouder L, Tinevez JY, Goubran-Botros H, Benchoua A, Bourgeron T, Cloëz-Tayarani I.

Journal of Visualized Experiments : JoVE. 2015 Oct 10;(104)

Video Article

Three-dimensional Quantification of Dendritic Spines from Pyramidal Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Laura Gouder[1,2,3], Jean-Yves Tinevez[4], Hany Goubran-Botros[1,2,3], Alexandra Benchoua[5], Thomas Bourgeron[1,2,3], Isabelle Cloëz-Tayarani[1,2,3]

[1]Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur

[2]CNRS URA 2182 'Genes, synapses and cognition', Institut Pasteur

[3]Human Genetics and Cognitive Functions, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

[4]Plateforme d' Imagerie Dynamique, Imagopole, CiTech, Institut Pasteur

[5]Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, Evry

Correspondence to: Isabelle Cloëz-Tayarani at isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr

URL: http://www.jove.com/video/53197
DOI: doi:10.3791/53197

Keywords: Developmental Biology, Issue 104, Human iPSC-derived neurons, pyramidal neurons, dendritic spine maturation, spine imaging, 3D quantification, confocal microscopy

Date Published: 10/10/2015

Citation: Gouder, L., Tinevez, J.Y., Goubran-Botros, H., Benchoua, A., Bourgeron, T., Cloëz-Tayarani, I. Three-dimensional Quantification of Dendritic Spines from Pyramidal Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Vis. Exp.* (104), e53197, doi:10.3791/53197 (2015).

Abstract

Dendritic spines are small protrusions that correspond to the post-synaptic compartments of excitatory synapses in the central nervous system. They are distributed along the dendrites. Their morphology is largely dependent on neuronal activity, and they are dynamic. Dendritic spines express glutamatergic receptors (AMPA and NMDA receptors) on their surface and at the levels of postsynaptic densities. Each spine allows the neuron to control its state and local activity independently. Spine morphologies have been extensively studied in glutamatergic pyramidal cells of the brain cortex, using both *in vivo* approaches and neuronal cultures obtained from rodent tissues. Neuropathological conditions can be associated to altered spine induction and maturation, as shown in rodent cultured neurons and one-dimensional quantitative analysis [1]. The present study describes a protocol for the 3D quantitative analysis of spine morphologies using human cortical neurons derived from neural stem cells (late cortical progenitors). These cells were initially obtained from induced pluripotent stem cells. This protocol allows the analysis of spine morphologies at different culture periods, and with possible comparison between induced pluripotent stem cells obtained from control individuals with those obtained from patients with psychiatric diseases.

Video Link

The video component of this article can be found at http://www.jove.com/video/53197/

Introduction

Dendritic spines of cortical pyramidal neurons are small and thin protrusions which are distributed along the basal and apical dendrites of these neuronal subtypes in rodent, primate, and human brain. They are the sites of most excitatory synapses and display key functions in learning and cognitive processes. The detailed structures of human dendritic spines have been technically studied by electron microscopy [2]. However, such approach is time-consuming and represents heavy workload. More recently, a three-dimensional (3D) reconstruction of the morphology of dendritic spines has been reported in human brain cortex using specific software combined to large manual spine analysis[3].

Green fluorescence protein (GFP) technology coupled to immunofluorescence represents an accurate tool for spine identification and shape measurement by fluorescence microscopy. This approach can be easily applied to cultured neurons. However, no data have been reported on the analysis of spine maturation and morphology on human neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSC).

The objective of this study was to describe a protocol, which allows dendritic spine imaging from cultured human neurons *in vitro*. GFP labeling, confocal microscopy and 3D analysis with the Filament Tracer module of Imaris software were used in the present protocol. Culture steps that are necessary to obtain cortical glutamatergic neurons of layers II to IV from neural stem cells (NSC) are also briefly described here. The entire protocol for human NSC production has already been published elsewhere [4].

Protocol

1. Neuronal Culture

Note: Fibroblast reprogramming in pluripotent stem cells, commitment to the dorsal telencephalon lineage, derivation, amplification, and banking of late cortical progenitors (LCP) were described in Boissart *et al*[4]. Neuronal differentiation of LCP-like cells was also performed according to

Copyright © 2015 Journal of Visualized Experiments

Boissart *et al*[4] with slight modifications. Other procedures have been developed for direct reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells followed by their differentiation into neurons. This protocol was retained since it allows the selective production of pyramidal glutamatergic neurons.

1. Treat 6-well culture plates with glass coverslips with poly-ornithine (diluted to 1/6 in DPBS, stock concentration 0.01%) O/N, followed by three washes in DPBS. Then add laminin (stock concentration 1 mg/ml, diluted 500 times in DPBS) for at least 10 hr under the flow hood.
2. Plate and dispatch NSC at low density (50,000 cells/cm^2) in 6-well culture plates with glass coverslips in 3 ml of culture medium consisting of DMEM/F12 (500 ml), 2 vials (5 ml each) of N2 supplement, 2 vials (10 ml each) of B27 supplement, 10 ml of Pen-Streptomycin (Penicillin = 10,000 units/ml and Streptomycin = 10,000 units/ml), 1 ml of 2-mercaptoethanol (Stock solution: 50 mM) and laminin (1/500), without growth factors. CRITICAL STEP: Carry out this step carefully by adding cells with slow rotating movements in order to reduce cell clustering.
3. Remove the culture medium. Add fresh N2B27 medium containing 2 µg/ml of fresh laminin solution to keep the neuron attached on the glass coverslips and avoid clumping. Change the medium every 3 days. Keep some of the remaining medium (200 µl) before adding fresh medium in order to prevent the cell from drying. Alternatively, proceed rapidly and change the total volume (3 ml).

2. Lentiviral Transduction

Note: GFP lentiviral vectors were kindly provided by Dr. Uwe Maskos Laboratory at Institut Pasteur (Paris) and prepared according to the published protocol [5]. GFP expression is driven by the mouse phosphoglycerate kinase (PGK) promoter. For this study, viral titer was of 400 ng/µl (stock solution in PBS 1x).

1. Transduce human iPSC-derived neurons at any step of maturation by viral particles by adding 1 µl of the stock solution containing 40 ng of GFP lentiviral vector per culture well (6-well plates) and incubate for 48 hr in fresh culture medium. Note: For this protocol, the duration of incubation allows a good labeling of spine structures.

3. Immunofluorescence

Note: In order to improve the labeling of the whole spine morphology, immunofluorescence labeling was performed using an anti-GFP antibody in permeabilized conditions.

1. Remove culture medium and fix transduced cells on coverslips in 4% paraformaldehyde for 10 min at RT, then wash 3 times in 1x PBS (10 min each).
2. Immerge coverslips in PBS supplemented with 0.05% Triton (100x) and 10% horse serum for 1 hr at RT, then wash 3 times in 1x PBS.
3. Add 100 µl of 1x PBS supplemented with 4% horse serum and primary antibody (1/1,000) raised against GFP and diluted by a factor of 1,000 on each coverslip. Incubate in a dark box O/N at 4°C, then wash 3 times with 1x PBS.
4. Dilute Alexa Fluor 488-conjugated antibody (1/200) in PBS supplemented with 0.5% of Tween 20 and incubate for 1 hr at RT. Then wash 3 times in 1x PBS and mount coverslips on glass slides with mounting medium for fluorescence microscopy.

4. Dendritic Spine Imaging

1. Perform confocal Imaging through a confocal laser-scanning microscope.
2. Select healthy neurons with pyramidal morphology and a full dendritic arborization, and quantify at least 10 neurons per condition from separate experiments. Quantify 60 - 100 µm per dendrite.
3. Acquire images using a 40X oil NA = 1.3 objective and a 488 nm laser line for GFP excitation, with a typical peak power at sample level around 20 µW. Set pixel size around 80 nm to properly sample dendritic spines.
   Note: The subsequent analysis call for an image in which the noise does not compromise the proper segmentation of dendrites and spines. With the spatial sampling and power settings mentioned above, we observed that a pixel dwell-time of 3.15 µs is sufficient to collect enough photons to build such an image. For dim samples, image quality can be improved by averaging 2 to 4 scans. The acquisition of several XY tiles may be needed to cover the region of interest, which then must be stitched together before processing.
4. To sample the whole neuron volume, acquire a Z-stack, with a Z spacing ranging from 150 nm to 300 nm, yielding 20 to 30 Z slices.
   Note: The lateral spatial resolution achieved with these settings is 234 nm and the axial resolution is 591 nm. The sampling chosen here is adequate, but as the axial resolution is larger than the smallest size of the spines to be imaged, the analysis favors the spines that extend laterally from the dendrites.

5. 3D Quantification of Dendritic Spines

Note: The following sections specifically describe the use of the Imaris software for analysis. Alternative implementations exist, including NeuronStudio[15] or Metamorph[8], which can provide similar results.

Use the following key settings:

1. As a pre-processing stage, use Gaussian filtering through the image processing facilities offered by the software. Perform Gaussian filtering via the *Image Processing* > *Smoothing* > *Gaussian Filter*. Set the filter width to be equal to the pixel size in XY.
2. Perform a Semi-automatic tracing of dendrites, using the Filament Tracer module of the software.
   1. First, estimate the dendrite diameter, by using the distance tool in the *Slice* tab of the software.
   2. In the *Surpass* tab, click on the *Filaments* tool. For a better robustness, this protocol relies on semi-automated tracking; click on *Skip automatic creation*. The module interface is now showing the *Draw* tab. Here, select *AutoPath* as a method, *Dendrite* as a type, and input the estimated dendrite diameter.

Copyright © 2015 Journal of Visualized Experiments

3. Use the *Select* mode of the pointer, turning the cursor into a box. Shift-right-click on the dendrite starting point. Note: the software performs initial calculations.
4. Move the pointer along the dendrite. From the starting point (represented as a blue sphere), a yellow line representing the most likely dendrite path is shown. Shift-left-click on the dendrite endpoint.

3. Perform the automated spines segmentation. Note: The spines on the traced dendrite are to be found automatically by the module interface.
   1. In the module interface, click on the *Creation* tab. In the *Rebuild* drop-list, pick *Rebuild Dendrite Diameter* and check the *Keep data* box. Then click *Rebuild*.
   2. Set the *Threshold* so that the segmented volume corresponds to the actual dendrite volume. As an *Algorithm*, select *Shortest Distance from Distance Map.* Click the *Next* button.
   3. Determine the smallest spine head diameter and the maximal length, again by using the distance tool in the *Slice* tab of the software, then come back to the *Surpass* tab and enter the parameters. For this protocol, values around 200 - 300 nm for minimal diameter and 4 µm for maximal length are good starting points. Do not check the *Allow Branch Spines* box. Click the *Next* button.
   4. Adjust the *Seed Points Threshold* so that the blue points representing spines localize to actual spine heads. Click the *Next* button. Note: The core calculation is done now and can be lengthy.

4. Classify spines by going to the *Tools* tab of the module interface. Click on *Classify Spines*. In the prompted user interface, make sure that there are four classes, defined by their morphology as follows: Stubby: length <1 µm; Mushroom: Length (spine) >3 and Max width (head) >mean width (neck) x 2; Long thin: Mean width (head) ≥ Mean width (neck); Filopodia-like: Length ≤ 4 µm (no head).
   Note: The module interface generates four new Filament objects containing the results of the classification.
5. Export Statistical data: on any of these four object interfaces, go to the *Statistics* tab.
   Click on the Export *All Statistics to File* button.
   Note: Other statistical values can be exported for dendrites (*e.g.*, length, area, mean diameter, branch depth, branching angle, volume, *etc.*), and for spines (*e.g.,* straightness, area of attachment, length and volume of distinct spine parts, spine diameter, densities, *etc.*)

Representative Results

The present study describes a standardized protocol for spine quantification of cultured dendrites of pyramidal neurons derived from iPSC. This protocol allows the analysis of spine maturation on human neurons and its possible comparison with the maturation of spines in standard rodent neuronal cultures as well as in *in vivo* animal models.

Figure 1A represents a scheme of the different steps of culture which allow the production of cortical pyramidal neurons. Such schematic representation is provided in order to better understand the global time scaling of the production of pyramidal neurons endowed with different categories of spines. Reprogrammation steps, however, are out of the scope of this study and have been described elsewhere [4]. Healthy neurons can be kept in culture up to 65 - 70 days. **Figure 1B** show the workflow of imaging and 3D quantification of spines.

Figure 2A illustrates the culture of human neurons labeled with an anti-beta III tubulin antibody. This figure also shows the tendency of cell clustering. **Figure 2B** shows a GFP-labeled pyramidal neuron of the superficial cortical layers at 40 days post differentiation of late cortical progenitors (LCP).

Figure 2C and **Figure 3A** illustrate 3D reconstruction of segments of dendritic spines at different stages of maturation. The quantitative analysis of two selected parameters (spine densities and spine head volume) is represented in **Figure 3B**. Our results indicate that these two parameters increase over the culture period as expected.

Copyright © 2015 Journal of Visualized Experiments

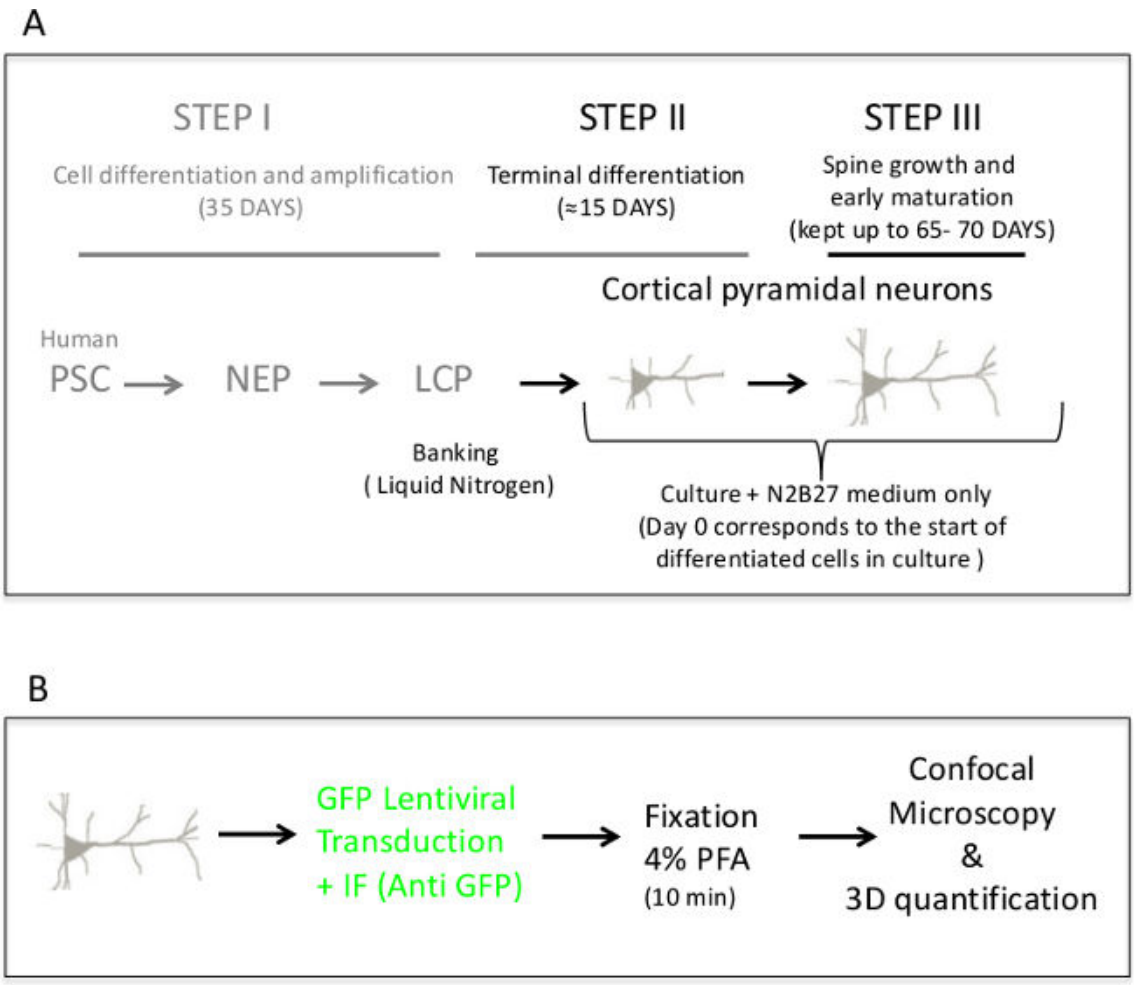


Figure 1. (A) Overview of the timescale of neuronal differentiation. This schematic representation describes the three steps of neuronal differentiation. The protocol is adapted from Boissart *et al.* [4]. In step 1, human iPSC are derived in early cortical progenitors (*i.e.*, early neuro-epithelial cells from the dorsal telencephalon) followed by transformation to late cortical progenitors (LCP). LCP are then amplified for cell banking in liquid nitrogen. In step 2, neural differentiation is achieved within two weeks. Step 3 corresponds to maintaining the neurons in culture for longer periods, in order to follow spine growing and progressive maturation. Under the culture conditions, healthy neurons can be kept up to 65 - 70 days. **(B)** Workflow of the different steps for imaging and 3D quantification of spines. (IF: immunofluorescence). Please click here to view a larger version of this figure.

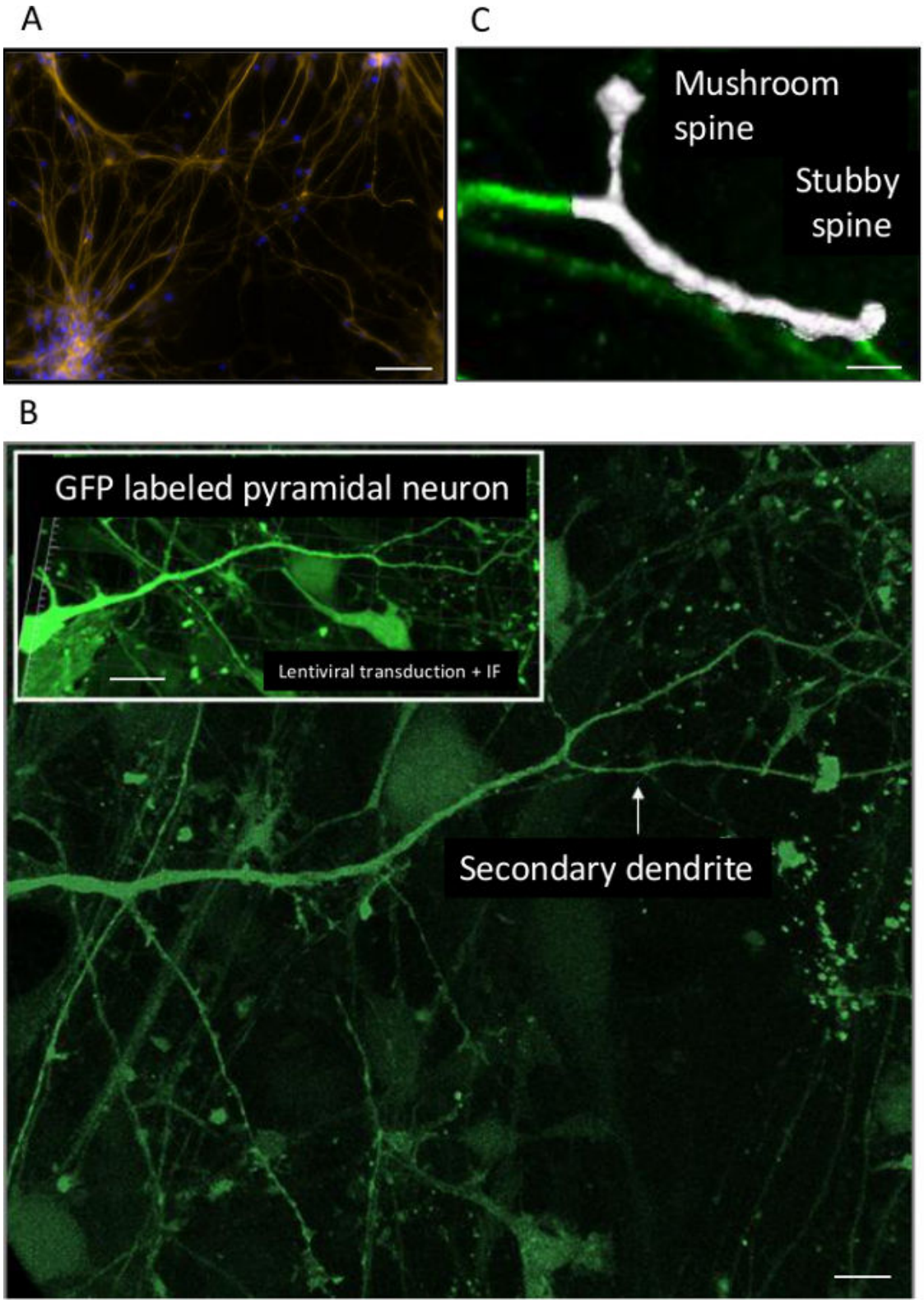


Figure 2. (A) Beta III tubulin positive cells revealed by Immunofluorescence using the same protocol as described, and a polyclonal anti-beta III tubulin antibody used at a dilution of 1/1,000. **(B)** Primary and secondary dendritic ramification of a GFP-labeled pyramidal neuron cultured 40 days post LCP stage. In the inset, the same neuron is represented at a lower magnification with apparent cell body. **(C)** 3D reconstruction of two categories of spines on a segment of a secondary dendrite. Scale bars: 250 µm **(A)**, 100 µm **(B)**, 40 µm (B inset), 1.5 µm **(C)**. Please click here to view a larger version of this figure.

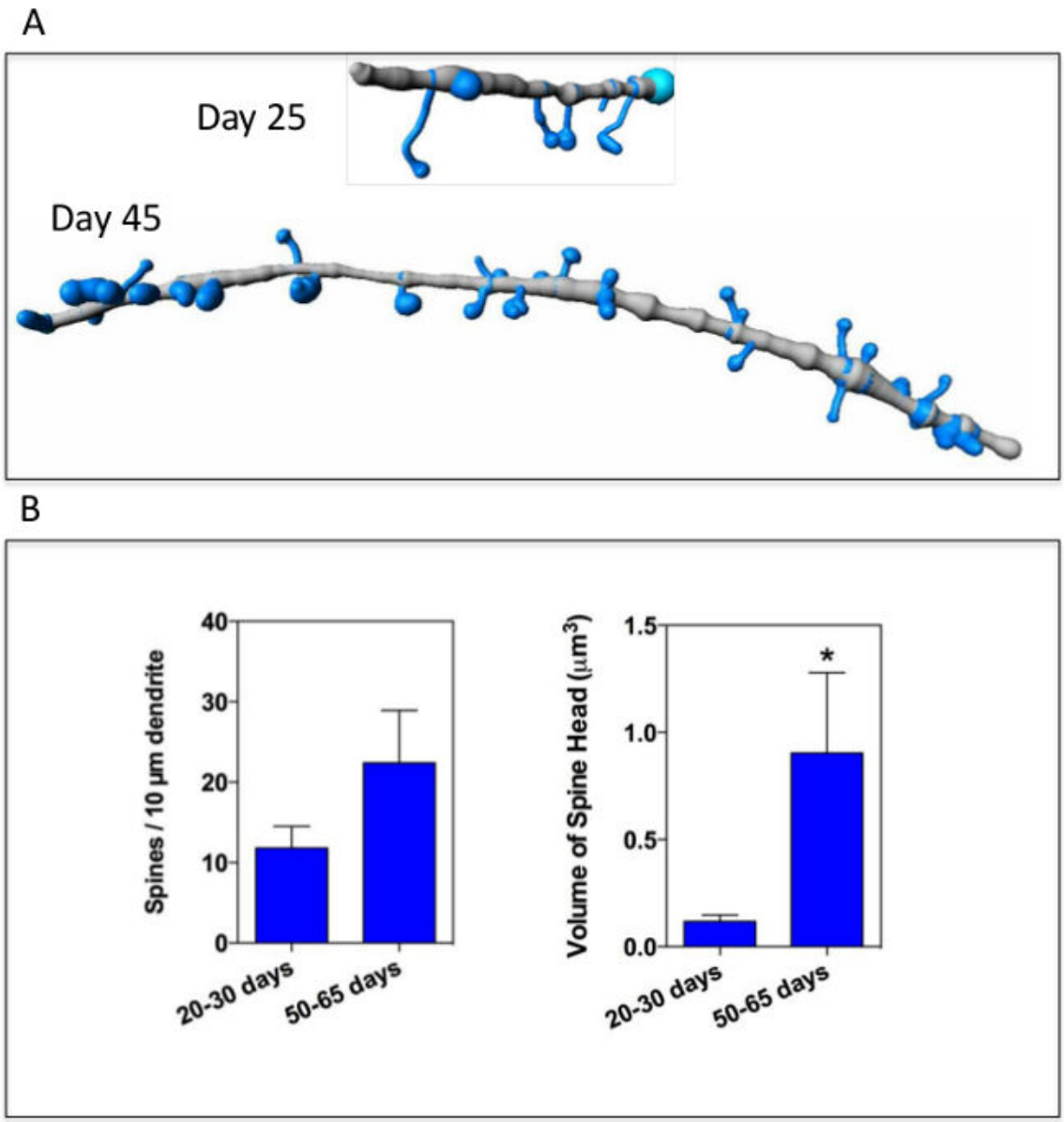


Figure 3. (A) 3D reconstruction of dendritic spines (blue color) with illustrated segments of secondary dendrites (grey color), at two different culture stages (25 and 45 days post-differentiation from LCP). **(B)** Quantitative analysis of spine densities and morphologies with two selected parameters such as spine density along dendrite and spine head volume and at two culture periods. Results are presented as mean ± SEM of at least 10 distinct neuron segments obtained from secondary dendrites imaged by confocal microscopy. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test (* $p<0.05$). Please click here to view a larger version of this figure.

Discussion

The quantification of the morphological features of pyramidal neurons relied on the software. The Filament Tracer interface was used for segmentation of neurons and spines, and the XT module was used for their analysis.

To analyze the accuracy of our technique, we first compared the measured morphologic parameters (length, area, and total spine volume when applicable), with those published using rat mature pyramidal neurons in culture [6,7] and human brain tissues [3]. Densities were comparable in all cases. No volume data were described in rat neurons (a 2D analysis was reported with the software used by the authors) whereas total spine volume was slightly reduced as compared to our data, in the study of Benavides-Piccione [3] using their own protocol for volume reconstruction on selected spines. Such differences could also be explained by the regional origin of cells and the fluorescent dye used for their labeling.

Some critical points should be underlined in our protocol, which mainly refer to threshold definitions for confocal quality of images and subsequent quantifications. The coupling of the transduction of a GFP-lentiviral vector with anti-GFP immunofluorescence ensures a good labeling and visualization of the entire spine structures. We were not able to label the full dendritic arborization by transfecting reprogrammed

Copyright © 2015 Journal of Visualized Experiments

cells with GFP vectors and by conventional protocols. Typically, 70 - 80% are transduced under our experimental conditions. Such percentage is much greater than what we observed using transfection protocols with GFP plasmids (15% of transfected neurons in our tests).

Depending on the efficiency and specificity of labeling, Gaussian filtering or deconvolution may be useful as a pre-processing stage to diminish noise. We also tested the 3D image reconstruction and quantification after deconvolution. This process was expected to be useful because, even with confocal imaging, deconvolution considerably improves image quality and limits blurring caused by diffraction. Deconvolution however, puts a major strain on the imaging step, imposing harsh spatial sampling in all three directions. With optical setup used in this protocol, the desired pixel size for deconvolution is around 40 nm, while we set for about 80 nm for the images presented here. Moving to 40 nm would quadruple the acquisition time, and lower the photon yield pixel. In addition, under the experimental conditions, no significant improvement in the segmentation results was observed as compared to the results, which may have been obtained with Gaussian filtering. The protocol therefore relies on this simpler post-processing step and relaxed the Z sampling constraints during imaging. This in turn diminished the acquisition time and sample bleaching.

The Filament Tracer module offers a fully automatic segmentation. However in this type of culture, the neurons are often dense, cross over each other, and are imaged from a strong background. This adversely affects the accuracy of automatic segmentation. The semi-automatic segmentation led to more robust results and efficient processing. This consists of a guided tracing of dendrites from the basal body of the neuron, followed by an automatic 3D segmentation of spines along selected dendrites.

Our method could be used to perform time-lapse imaging and directly record spine maturation in living neurons from primary rat cortical neurons, as described previously [8].

Human iPSC-derived neurons have drawn the attention of the scientists and there have been recent attempts to model neurodevelopmental disorders including autism spectrum disorders [9-14]. In cortical circuits, dendritic spines play a major role in the establishment of excitatory synapses, but their quantitative analysis has been poorly documented in humans with neurodevelopmental disorders. During development and throughout lifespan, the densities of spines and their morphologies are critical for connectivity of neuronal circuits. In pathologies with genetic causes, the use of iPSC-derived neurons from patient biopsies (*e.g.*, fibroblasts) allows the analysis of circuits development between neurons expressing the mutated gene(s) that could be responsible for disease states. This protocol represents a powerful approach for extensive *in vitro* analysis of spinogenesis within a population of mutated neurons and comparison of phenotypes with reprogrammed neurons from control individuals.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

This work was funded by the Institut Pasteur, the Bettencourt-Schueller foundation, Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris Diderot, Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-SAMA-0006; SynDivAutism), the Conny-Maeva Charitable Foundation, the Cognacq Jay Foundation, the Orange Foundation, and the Fondamental Foundation. L.G. is supported by an undergraduate fellowship from the Health Ministry. We acknowledge the help of BitPlane in particular Georgia Golfis, in the early stage of this work.

References

1. Durand, C., *et al.* SHANK3 mutations identified in autism led to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Molecular Psychiatry.* **17**, (1), 71-84 (2013).
2. Arenallo, J. I., Espinosa, A., Fairen, A., Yuste, R., Defelipe, J. Non-synaptic dendritic spines in neocortex.*Neuroscience.* **145**, 464-469 (2007).
3. Benavides-Piccione, R., Fernaud-Espinosa, I., Robles, V., Yuste, R., DeFelipe, J. Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cerebral Cortex.* **23**, (8), 1798-1810 (2013).
4. Boissart, C., *et al.* Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Translational Psychiatry.* **3**, 1-11 (2013).
5. Avale, M. E., *et al.* Interplay of beta 2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proceedings of National Academy of Science USA.* **105**, (41), 15991-15996 (2008).
6. Xie, Z., *et al.* Coordination of synaptic adhesion with dendritic spine remodeling by AF6 and kalirin-7.*Journal of Neuroscience.* **28**, (24), 6079-6091 (2008).
7. Srivastava, D. P., *et al.* Afadin is required for maintenance of dendritic structure and excitatory tone. *Journal of Biological Chemistry.* **287**, (43), 35964-35974 (2012).
8. Srivastava, D. P., Woolfrey, K. M., Penzes, P. Analysis of dendritic spine morphology in cultured CNS neurons. *Journal of Visualized Experiments.* (53), e2794 (2011).
9. Brennand, K. J., Gage, F. H. Modeling psychiatric disorders through reprogramming. *Disease Models and Mechanisms.* **5**, (1), 26-32 (2012).
10. Kim, S. S., Ross, P. J., Zaslavsky, K., Ellis, J. Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* **8**, 1-16 (2014).
11. Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H., Yamanaka, S. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO Journal.* **33**, (5), 409-417 (2014).
12. Stein, J. L., *et al.* Aquantitative framework to evaluate modeling of cortical development by neural stem cells. *Neuron.* **83**, 69-86 (2014).
13. Sivapatham, R., Zheng, X. Generation and characterization of patient-specific induced pluripotent stem cell for disease modeling. *Methods in Molecular Biology*. (2014).
14. Xu, X., Miller, E. C., Pozzo-Miller, L. Dendritic spine dysgenesis in Rett Syndrome. *Frontiers in Neuroanatomy.* **8**, 1-8 (2014).

Copyright © 2015 Journal of Visualized Experiments

15. Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R., Wearne, S. L. Automated Three Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic spines from Fluorescence Microscopy Images. *PLoS ONE*.**3**, (4), e1997 (2008).

Materials List for:

Three-dimensional Quantification of Dendritic Spines from Pyramidal Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Laura Gouder[1,2,3], Jean-Yves Tinevez[4], Hany Goubran-Botros[1,2,3], Alexandra Benchoua[5], Thomas Bourgeron[1,2,3], Isabelle Cloëz-Tayarani[1,2,3]

[1]Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur

[2]CNRS URA 2182 'Genes, synapses and cognition', Institut Pasteur

[3]Human Genetics and Cognitive Functions, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

[4]Plateforme d' Imagerie Dynamique, Imagopole, CiTech, Institut Pasteur

[5]Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, Evry

Correspondence to: Isabelle Cloëz-Tayarani at isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr

URL: http://www.jove.com/video/53197
DOI: doi:10.3791/53197

Materials

Name	Company	Catalog Number	Comments
D-PBS (1x), sans Calcium, Magnesium et Phenol Red	Gibco/ Life Technologies	14190169	
Poly-L-Ornithine Solution Bioreagent	Sigma Aldrich	P4957	
Mouse laminin	Dutscher Dominique	354232	
N_2 Supplement	Gibco/ Life Technologies	17502048	
B-27 Supplement w/o Vitamin A (50x)	Gibco/ Life Technologies	12587010	
DMEM/NUT.MIX F-12 W/GLUT-I	Gibco/ Life Technologies	31331028	
Neurobasal Med SFM	Gibco/ Life Technologies	21103049	
2-mercaptoethanol	Gibco/ Life Technologies	31350-010	
Penicillin-Steptomycin	Gibco/ Life Technologies	15140-122	
GFP Rabbit Serum Polyclonal Antibody	Gibco/ Life Technologies	A-6455	
Horse serum	Gibco/ Life Technologies	16050130	
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit	Gibco/ Life Technologies	A11034	
Polyclonal Anti-betaIII tubulin Antibody	Millipore	AB9354	
Coverglass 13 mm	VWR	631-0150	
Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI	Gibco/ Life Technologies	P36931	
Tween(R) 20 Bioextra, Viscous Liquid	Sigma Aldrich Chimie	P7949	
Triton X-100	Sigma Aldrich Chimie	X100-100ML	
Human Fibroblasts	Coriell Cell Line Biorepository	GM 4603 and GM 1869	Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA
Confocal laser scanning microscope	Zeiss (Germany)	LSM 700	
Imaris Software	Bitplane AG, Zurich	6.4.0 version	Filament Tracer and Imaris XT modules are necessary
Huygens Software	Huygens software, SVI, Netherlands	Pro version	Optional (for deconvolution testing)

Copyright © 2015 Journal of Visualized Experiments

Article 2 (en préparation, soumission prévue en 2016) :

Altered spinogenesis in human iPSC-derived cortical neurons in three autistic patients with *de novo* truncating *SHANK3* mutations.

Gouder L, Goubran-Botros H, Vitrac A, Dankaert A, Tinevez JY, André-Leroux G, Atanasova E, Lemière N, Delorme R, Benchoua A, Bourgeron T, Cloëz-Tayarani I.

Genes and Development (Manuscript in preparation)

RESEARCH COMMUNICATIONS

Altered spinogenesis in human iPSC-derived cortical neurons in three autistic patients with *de novo* truncating *SHANK3* mutations

Laura Gouder [1,2,3], Hany Goubran-Botros [1,2,3], Aline Vitrac [1,2,3], Anne Dankaert [4], Jean-Yves Tinevez [4], Gwenaëlle André-Leroux [5], Ekaterina Atanasova [1,2,3], Nathalie Lemière [1,2,3], Richard Delorme [1,6,], Alexandra Benchoua [7], Thomas Bourgeron[1,2,3] and Isabelle Cloëz-Tayarani [1,2 ,3]

[1]Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, Paris, France

[2]CNRS URA 2182 « Genes, synapses and Cognition », Institut Pasteur, Paris, France

[3]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Human Genetics and Cognitive Functions, Paris, France

[4] Imagopole, Citech, Institut Pasteur, Paris, France

[5]INRA, Unité MaIAGE, UR1404, Jouy-en-Josas, France

[6]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, Paris, France

[7] CECS, I-STEM, AFM, 91030 Evry Cedex, France

Corresponding author : Isabelle Cloëz-Tayarani, PhD

Email : isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr

Abstract

D*e novo SHANK3* mutations, initially identified in the laboratory, occur in up to 2 % of patients with ASD and intellectual disability. Induced pluripotent stem cells from patients with heterozygous *de novo* truncating mutations in *SHANK3 gene* and control individuals were derived into pyramidal cortical neurons. In two ASD pyramidal cells (frameshift stop mutations), dendritic spines presented variable maturation stages with higher proportions of stubby and muschroom spines as compared to control neurons. These data are in agreement with our findings showing a higher number of spikes from calcium recordings. We also observed a significant decrease in spine densities and volumes in all the ASD pyramidal neurons. This underlines the complexity of spine plasticity in iPSC-derived neurons derived from patients with ASD.

Key words

SHANK3, Human induced pluripotent stem cells, Autism spectrum disorder, dendritic spines, calcium imaging.

The PDZ domain-containing protein SHANK family proteins (SHANK1-3) are important cytoskeletal scaffold proteins with identified functions in neuronal synaptic morphology and signaling. These proteins are located at postsynaptic densities (PSD) of excitatory neurons in different brain areas (Jiang and Ehlers, 2013*).* SHANK3 shares a similar protein domain structure but presents different regional expression and subcellular localization than its homologs SHANK1-2. As these last two proteins, SHANK3 recruits a large number of synaptic intracellular interactors such as the protein Homer as well as several neurotransmitter receptors including the α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA), the metabotropic glutamate (mGlu) and the *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) glutamate receptors. Recent genetic studies strongly indicate the association of mutations in *SHANK* family genes with autism spectrum disorder (ASD) and consider *SHANK3* as a causative gene for ASD.

ASD are a group of neurodevelopmental disorders characterized by persistent deficits in social communications and interactions, and by restricted, repetitive patterns of behavior, as well as the lack interests or activities. Intellectual disability and ASD frequently co-occur. The complex impairments observed in patients with ASD are thought to be caused to a some extent by genetic factors. The large genetic screening of *SHANK3* mutations which has been conducted in our laboratory combined with data from the litterature clearly indicate the occurrence of *SHANK3* mutations in at least 0.6% of patients with ASD. In ASD patients with intellectual disability, mutations in *SHANK3* are even more frequent and appear in more than 1 out of 50 patients (Leblond et al, 2014). *SHANK3* mutations are clearly genetically associated with developmental synaptopathies.

In accordance with the genetic findings, Sugiyama et al (2005) have shown that each single synapse may contain around 300 SHANK family proteins (SHANK1-3), which

correspond to around 5% of the total number of synaptic proteins. A defect in the expression of one SHANK member within the family is therefore expected to cause significant synaptic deficiencies. This assumption is supported by the fact that the overexpression of SHANK3 in cultured aspiny cerebellar neurons leads to the development and maturation of functional spines expressing NMDA, AMPA and metabotropic glutamatergic receptors (Roussignol et al, 2005). SHANK3 participates in the morphological changes in dendritic spines during synaptogenegis and synaptic remodeling (Durand et al, 2012). The expression of SHANK3 with deletions in selective domains in mouse neurons in culture indicate that each protein domain displays a distinct role in dendritic spine development (Roussignol et al, 2005). By contrast, disruptions in SHANK3 gene in mice have been shown to alter synaptic functions and autistic-like behaviors including social interaction deficits and repetitive behaviors (Wang et al, 2011 ; Bozdagi et al, 2010 ; Peça et al, 2011 ; Yang et al, 2012). In a recent study, Mei et al (2016) have generated a novel conditional knock-in mouse model in which the re-expression of the SHANK3 gene increases spine densities and neuronal functioning in the striatum. In this model, the social interaction deficits and the repetitive grooming behavior were specifically reversed. However, other behavioral deficits such as motor coordination and anxiety remain unchanged. This suggests that the role of SHANK3 protein in the regulation of synaptic plasticity is complex.

In this study, we used the recent technology of human induced pluripotent stem cells (iPSC) obtained from the fibroblasts of selected patients with ASD. Human iPSCs were then reprogrammed into human cortical neurons to examine the effects of haploinsufficiency of *SHANK3.* We focused our study *on spine* morphogenesis, synaptic development and functional activity through calcium imaging. We selected four patients

with heterozygous truncated *de novo* SHANK3 mutations who had been initially genotyped in our laboratory (Leblond et al, 2014).

Results and discussion

We used the human iPSC-based model to analyze the effects of heterozygous truncated *de novo* mutations in *SHANK3* gene found in four patients with ASD, and presenting intellectual disabilities (Fig. 1A). Their clinical symptoms are summarized in Table S1, and fully described in Leblond et al (2014). The location of the selected mutations into the structure of the full-length SHANK3 protein in a proline-rich domain is shown in Fig. 1B. The four mutations lead to truncated proteins either by inducing a stop codon directly (E809X and Q1243X) or indirectly via a frameshift in *SHANK3* gene (G1271Afs*15 and L1142Vfs*153) and this may lead to the expression of truncated SHANK3 proteins as described previously (Cochoy et al, 2015). For clarity, the six ankyrin (ANK) domains are presented in their 3D structure to illustrate precisely their numbers and complete juxtaposition (Fig.1C). Indeed, some contradictory results have been published regarding the topological characteristics of the ANK domains (Schuetz et al, 2004 ; Mameza et al, 2013). Although predicted benign, coding-sequence variants within the ANK domains have been identified in patients with ASD (Leblond et al, 2014) and they have been assumed to favor head spine enlargement during spinogenesis (Roussignol et al, 2005). Other SHANK3 domains such as SH3, PDZ and SAM are also complex structures (Fig. 1D) that are involved in the interaction of SHANK3 proteins with its intracellular partners (Mameza et al, 2013).

Fibroblast reprogramming in pluripotent stem cells, commitment to the dorsal

telecephalon lineage, derivation, amplication and banking of late cortical progenitors (LCP) were described in Boissart et al (2013) using fibroblasts from patients with E809X and Q1243X mutations. Patient G1271Afs*15 was published otherwise (Darville et al, 2016). The characterization of iPSC-derived from the fibroblast of patient L1142Vfs*153 is presented in Table S4. The same protocol was used for iPSC production as reported in Boissard et al (2013). In addition to the the iPSC cells from ASD patients, cells from control individuals, namely 1869, 4603 and PB12 were also included in the present study. LCP were then differentiated into cortical neurons of the superficial layers II-IV which correspond to the cortical upper layers as confirmed previously by Cux 1, Cux2 and Brn2 immunolabeling (Boissart et al, 2013). Fig. 2A represents a scheme of the different steps of culture which allow the production of a significant percentage of mature neurons. This figure shows the consecutive appearance of the pre- and postsynaptic components with a significant percentage of mature neurons obtained at 40-45 days post neural stem cells (NSC) differentiation. The selective neuronal marker MAP2 staining was used to follow neurite outgrowth (Fig. 2B and Fig. S1). We checked for the absence of any significant variability in the growth of neurites between different culture samples using a method we published previously published (Mercati et al, 2011 ; Mercati et al, 2016) (Fig. 2B, left panel). Presynaptic and postsynaptic components were respectively determined by synapsin and PSD95 immunoflorescence staining (Fig. 2C). iPSC were predominantly derived into glutamatergic neurons as illustated by VGlut immunoflorescence staining (Fig. 2D). In accordance with Boissart et al (2013), these neurons accounted for 70-80 % of total cells whereas inhibitory GABAergic neurons accounted for about 15% (data not shown). Colocalisation of SHANK and the excitatory marker PSD95 was first detectable at 30 days after NSC differentiation (Fig. 2C, right panel). Specific SHANK3 immunostaining was evidenced by using a selective antibody

(kindly provided by Dr. Tobias Boeckers) directed against residues 330-468 of the protein. Pyramidal glutamatergic cells were strongly labeled both at the dendrite levels but also within their cell bodies (Figure 2C, middle panel). The intracellular labeling may correspond to immature forms of SHANK3. A strong intracellular SHANK3 labeling was also described in Darville et al (2016). We transduced neuronal cultures with a lentivirus (kindly provided by G. Lepousez) containing a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) promoter. This promoter drives the expression of the yellow fluorescent protein (YFP) selectively in mature neurons *vs.* glia and is predicted selective for pyramidal excitatory neurons *vs.* inhibitory interneurons (Osten et al, 2006). Fig. 2D (righ panel) illustrates the expression of the YFP protein into the iPSC-derived cortical neurons from three control individuals and from one patient. Our data clearly indicate a predominent presence of glutamatergic cells in the culture, independently of the cellular phenotypes (CTRs *vs.* ASD). We attempted to keep the iPSC-derived neurons in culture for longer periods than those reported by Boissart et al (2013). We observed that neuronal cells could be kept in culture for about 70 days after NSC differentiation. However, they were not always at a full cellular viability. By contrast, at 40-45 days post NSC, all cells were viable. The time slot of 40-45 days appears convenient to study dendritic spine maturation while excluding any cellular death. At this stage of maturation, we could also detect the presence of astrocytes accounting about 5-10 % of total cells in control and ASD cultures (Fig. S1). Astrocytes are known for their role in promoting the maturation of NSC (Song et al, 2002). They influence the local environment of iPSC-derived neurons, their maturation and also promote synaptogenesis (Slezak and Pfrieger, 2003).

In brain cortical circuits, dendritic spines play an important role in the

establisment of excitatory synapses. However, their quantitative morphological analysis has been poorly documented in iPSC-derived neurons from patients with ASD. Such aspect is important since spines morphology determines their synaptic strength and plasticity (Aranello et al, 2007). We therefore analyzed spinogenesis in iPSC-derived pyramidal glutamatergic cells. We used our published method for the 3D quantification of GFP-labeled dendritic spines (Gouder et al, 2015) to analyze the primary dendrites of neurons obtained from 3 patients (E809X, Q1243X and G1271Afs*15) and from 3 control individuals (PB12, 1869 and 4603). Our data show a significant decrease of nearly 50% in spine densities in all the 3 patients as compared to the 3 control individuals. The total volume as well as the head volume of spines were also decreased to a same extent (Fig. 3A). The spine length was not significantly modify in most patient cases. It should be noted that a small decrease was observed between the control PB12 and patients E809X and G1271Afs*15. The spine ground diameter, as well as the surface of spine attachment to the dendrite were slightly decreased in some cases but a lesser extent than effects on spine densities and volumes. Spine straighness remained constant between the ASD patients and the control individuals (Fig. 3A). Our data are in agreement with those reported by Durand et al (2012). Using transfected primary hippocampal neurons overexpressing SHANK3, these authors have demonstrated by a 2D approach that a *SHANK3* ^{STOP} mutation reduces selectively the density of spines along dendrites, the percentage of spine length >1 µm, while spine width remained unchanged. Using Rett syndrome as an ASD genetic model, Marchetto et al (2010) have also reported that neurons derived from Rett hiPSCs had reduced spine densities and fewer synapses.

Spine dynamics are determined according to the stage of neuronal development.

Filopodia represent mobile extending and retracting structures which may develop to form fully functional functional spines. Mature dendritic spines are less than 3 um in length with a head connected to the dendrite by a thin neck (< 0.5 um in diameter) (Peters et al, 1970). Excitatory synapses belong to the head part where the PSD is located. We analyzed the spine distribution in iPSC-derived neurons. Our data indicate that all spine categories (filopodia, long thin, stubby and mushroom) were represented in pyramidal neurons from both control individuals and patients. Nevertheless, some discrepancies were observed in their relative proportions. Filopodia were present at highest densities in the three control individuals (PB12 1869 and 4603) and in two patients (E809X and Q1243X). Filopodia were also present in patient G1271Afs*15 but at significant lower levels (Fig 3B). In their whole, these data indicate that spine maturation is not fully achieved. Nevertheless, the distribution of spine categories in the patient G1271Afs*15 was different as stubby and muschroom spines, altogether, were present in higher proportions than in other individuals (CTR and ASD) (Fig. 3C). Spine apparatus with the presence of PSD areas have been observed in stubby and headed spine categories by electron microscopy with a positive correlation between PSD complexity and head volumes (Aranello et al, 2007). Our data indicate a more pronounced spine maturation in patient G1271Afs*15. In ASD mouse models, a significant upregulation in the dynamics of PSD95 positive spines has been reported previously (Isshiki et al, 2014). Altered dynamics of maturation of spines from excitatory neurons during development may underlie the cortical dysfunctions found in ASD by modifying the intracortical projections of excitatory neurons. The same quantitative approach has been recently used to measure spine densities and spine head volumes in mouse cortical pyramidal cells (Peng et al, 2016). In our model, we found lower densities but slighly higher spine head volumes than those observed by these

authors. In the study of Bidinosti et al (2016) using rat cortical neurons, spine densities were in the same range of order as those from our study. Moreover, these authors found that inactivating *SHANK3* led to a similar reduction in spine densities. Using human iPSC cell model, Wen et al (2014) have found higher amounts of actin proteins in human iPSC cells derived from a patient with schizophrenia with a frameshift mutation in his genome within the DISC1 gene, known for co-segregating with major psychiatric disorders (Sachs et al, 2005). ASD and schizophrenia share similarities in their diagnostic criteria, and both disorders display synaptic dysregulations. Elevated actin levels may be related to a more developed cytoskeleton within dendritic spines and may represent an index of higher maturation at 40-45 days post NSC differentiation. These observations are in line with our data with patient G1271Afs*15 showing a more rapid maturation and therefore the possibilty of a higher level of organization for the actin cytoskeleton within the spine head.

We examined the presence of any eventual correlation between spine morphology and neuron functional activities. Spine mophology contributes to synaptic transmission (Matsuzaki et al, 2001) and to Ca^{2+} diffusion from the spine head to the parent dendrite (Nogochi et al, 2005). Calcium imaging of spontaneous neuroanl activity was performed at 40-45 days post NSC. According to the protocol described in Materials and Methods, our method allows both an optical recording of waves of calcium fluxes within a restricted number of live cells per recorded field and the precise analysis of wave duration. The background signals were determined using non-differentiated cells and found negligible. Non neuronal as well as clustered cells were excluded from all measurements. Our data show an increased number of spikes in neurons from the three ASD patients who present truncated mutations, as compared to controls (Fig 4A and

Supplemental movies). Higher proportions of long spikes were measured in ASD neurons (Fig 4 B, C). Our data from control values, are consistent with previous reports using conventional recordings (Darville et al, 2016). These authors, however, observed a large heterogeneity in the number of spikes per minute between the two control individuals (namely PB12 and 1869). Such heterogeneity may result from an heterogeneous number of cells analyzed at lower magnifications integrating cell clusters. Spine morphology and motility may modify spine functions and calcium oscillations (Majewska et al, 2000 ; Oertner and Matus, 2005). The fact that higher proportions of mature spines were observed in patients with ASD, and more specifically in patient G1271Afs*15 indicates the occurrence of higher calcium activities within cells from this patient. Our observations confirm the complexity of spine plasticity in iPSC-derived neurons from patients with ASD, both at morphological and functional levels.

Materials and Methods

Production of human pluripotent Stem cells and their derivation into cortical neurons of layer II to IV.

This protocol has been already published previously (Boissard et al, 2013). Briefly, four iPSC lines were used in this study. Cells were derived from 4 autistic patients with *de novo* SHANK3 mutations. The clinical characteristics have been published in Leblond et al (2014) and are summarized in Table S1. Fibroblasts reprogramming was performed using the four genes coding the human factors *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc*, and *KLF4* cloned in

Sendai viruses (Invitrogen). Induced PSC lines were characterized according to Boissart et al (2013).

Commitment of pluripotent stem cells (PSC) to the neural lineage and derivation of stable cortical neural stem cells (NSC) was also described previously (Boissart, 2012; Boissart, 2013). Briefly, PSC were detached from the feeder layer, and neural commitment was induced using the BMP inhibitor Noggin (500 ng/ml, Peprotech, London, UK) and the Nodal inhibitor SB431542 (20µM, Tocris Biosciences, Ellisville, Missouri, USA). Ten days after, neural rosettes containing neuro-epithelial cells were manually collected and plated in poly-ornithin/laminin treated culture dishes in N2B27 medium containing Epidermal Growth Factor (EGF, 10ng/ml), FGF-2 (10ng/ml) and Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF, 20ng/ml). At confluence, the cells were passed using trypsin first as small multi-cellular clumps at a ratio of 1:3, then as a single cell suspension with a density of 50,000 cells/cm^2. Mass amplification was performed until passage 8 to 10 and cells were frozen in a mixture containing 10% DMSO and 90% fetal calf serum (Invitrogen) before storage in liquid nitrogen. The Rock-inhibitor Y27632 was used during the thawing period to enhance cell recovery. For terminal differentiation into post-mitotic neurons, cortical NSC were dissociated and plated in N2B27 without growth factors at low density (50,000 cells/cm^2). For the control iPSC lines (GM4603 and GM1869, fibroblasts were obtained from the Coriell Biorepository (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA). The control line PB12 was reprogramed from peripheral blood mononuclear cells obtained from an anonymous blood donor at the French Blood Donor Organization.

Lentiviral transduction and primary dendritic spine imaging

The use of PGK-GFP-lentivirus and 3D spine imaging has been fully described in Gouder et al (2015). The same experimental conditions were used for the pAAV-CaMKIIa-hChR2-EYFP-WPRE lentivirus without subsequent immunofluorescence against YFP.

Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described in Gouder et al (2015). The list of primary and secondary antibodies with their respective dilutions is presented in Table S2.

Calcium Imaging

-Experimental design

Calcium imaging recordings were performed on cell cultured in glass-35mm micro-dishes (Ibidi GmbH, Germany). Briefly, cells were rinsed twice with culture medium (Gouder et al, 2015). Signals from non-neuronal cells (e.g. astrocytes) were excluded by incubating in culture medium complemented with 1 µM sulforhodamine 101, (a selective calcium channel marker in astrocytes) for 20 minutes at 37°C. This step was followed by incubation with 0.2% pluronic acid (F-127) and 4 µM Fluo4-AM for 30 minutes at room temperature. Manipulations of the two fluorescent dyes were performed in the dark. Excess dyes were removed by washing the cells with culture medium. Using spinning disk confocal system (UltraVIEW VOX, Perkin Elmer, Germany) and an EM-CCD camera (ImagEM X2, Hamamatsu, Japan), calcium transients were recorded in single dendrites. Images were selected to include mostly pyramidal glutamatergic neurons and to exclude cell clusters and astrocytes. Sporadic astrocytes dit not provide calcium occillations in similar time-scales. Confocal recordings were performed continuously for 5 minutes per field, at a rate of one image per second, which

is sufficient to detect calcium onset and offset. Each 100 x 100 µm field was binned in 20 x 20 squares. Calcium intensities were followed overtime per square. Cell soma was spread over several squares within the grid, and each square was often crossed by a single neuron or dendrite. Square intensities were analyzed and automatically processed from confocal recordings using a custom Image J macro.

-Imaging parameters

A 488 nm laser was used to excite the Fluo-4 dye. The incident light power was kept low, around 0.3 mW/cm^2. To avoid photocytotoxic effects, exposures were set up to 200 ms. Images were acquired for 5 minutes with one frame per second (301 frames in total). A single Z-plane was used for each time-point. Camera gain and sensitivity were set up to 1 and 50, respectively. The camera acquisition scheme was set up to "Moderate Speed/quality".

-Products

Fluo 4-AM was from Molecular Probes Technologies (catalog # F14217). Pluronic Acid F-127 was from company (catalog #P6866). Sulforhodamine 101 from from Sigma (catalog #S7635).

Other information on Materials and Methods is described in the supplementary materials and figure legends (Fig. S3 and Table S3, are detailed directly on each Figure and each Table).

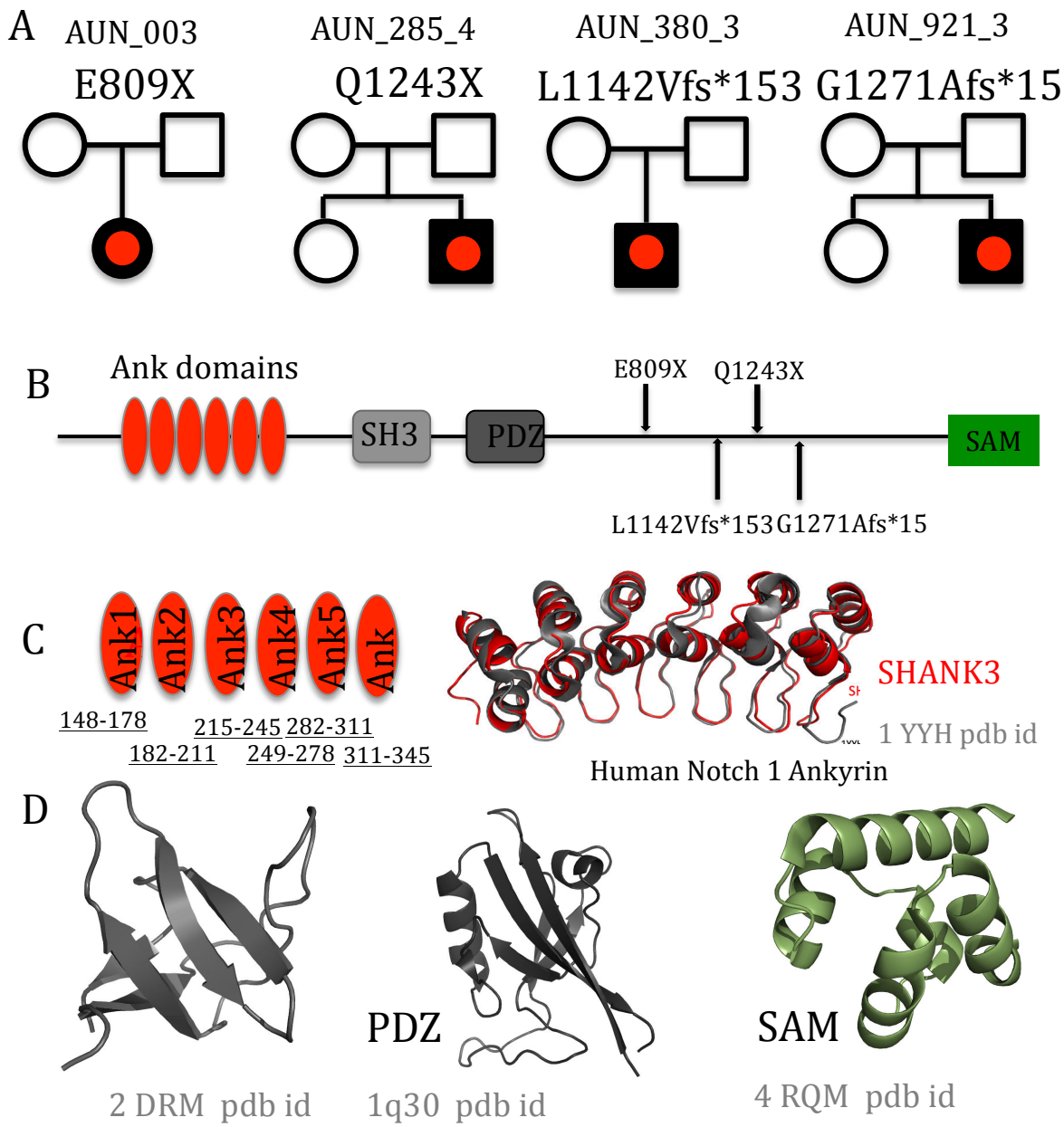


Figure 1, Gouder et al.

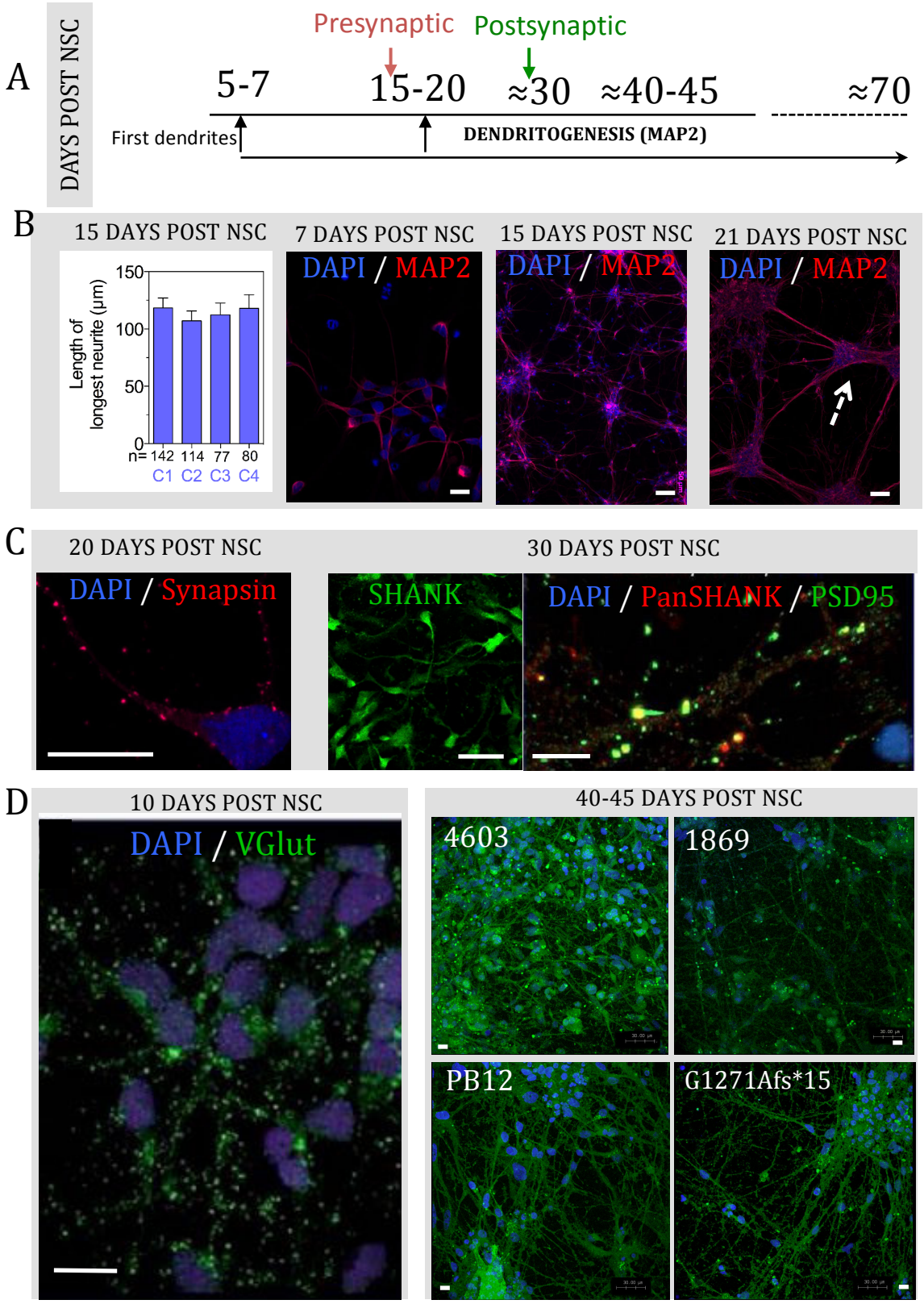


Figure 2, Gouder et al.

A

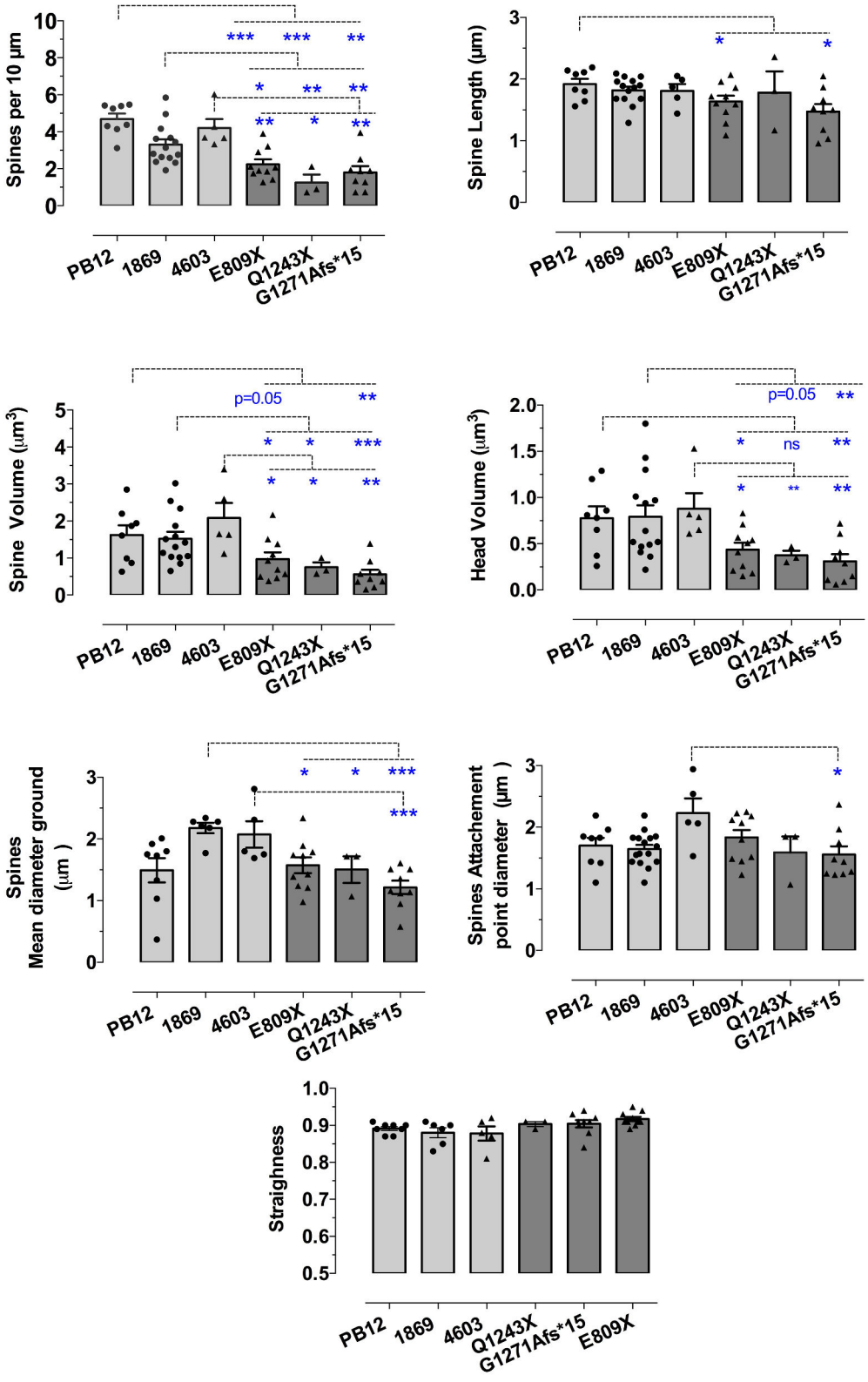
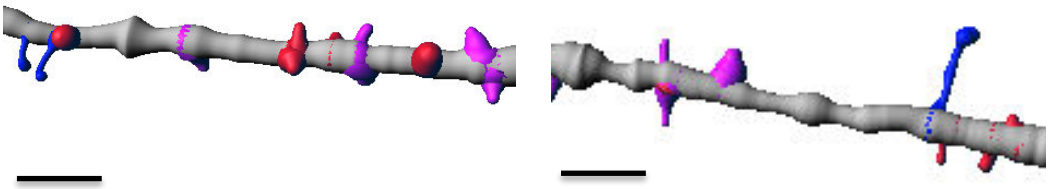
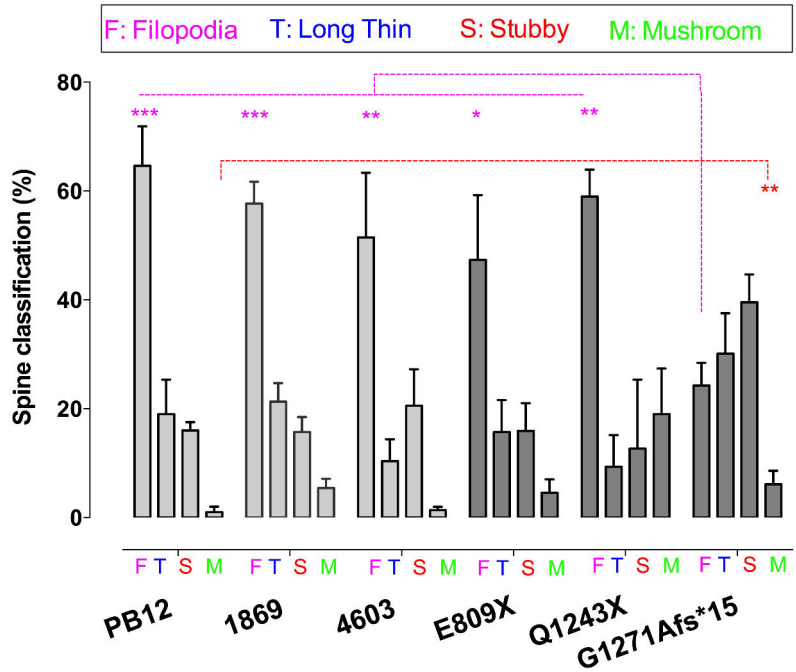


Figure 3, Gouder et al.

B



C



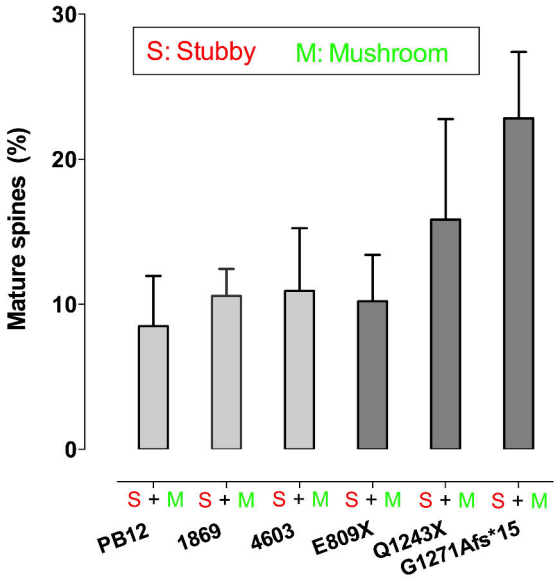


Figure 3 Cont., Gouder et al.

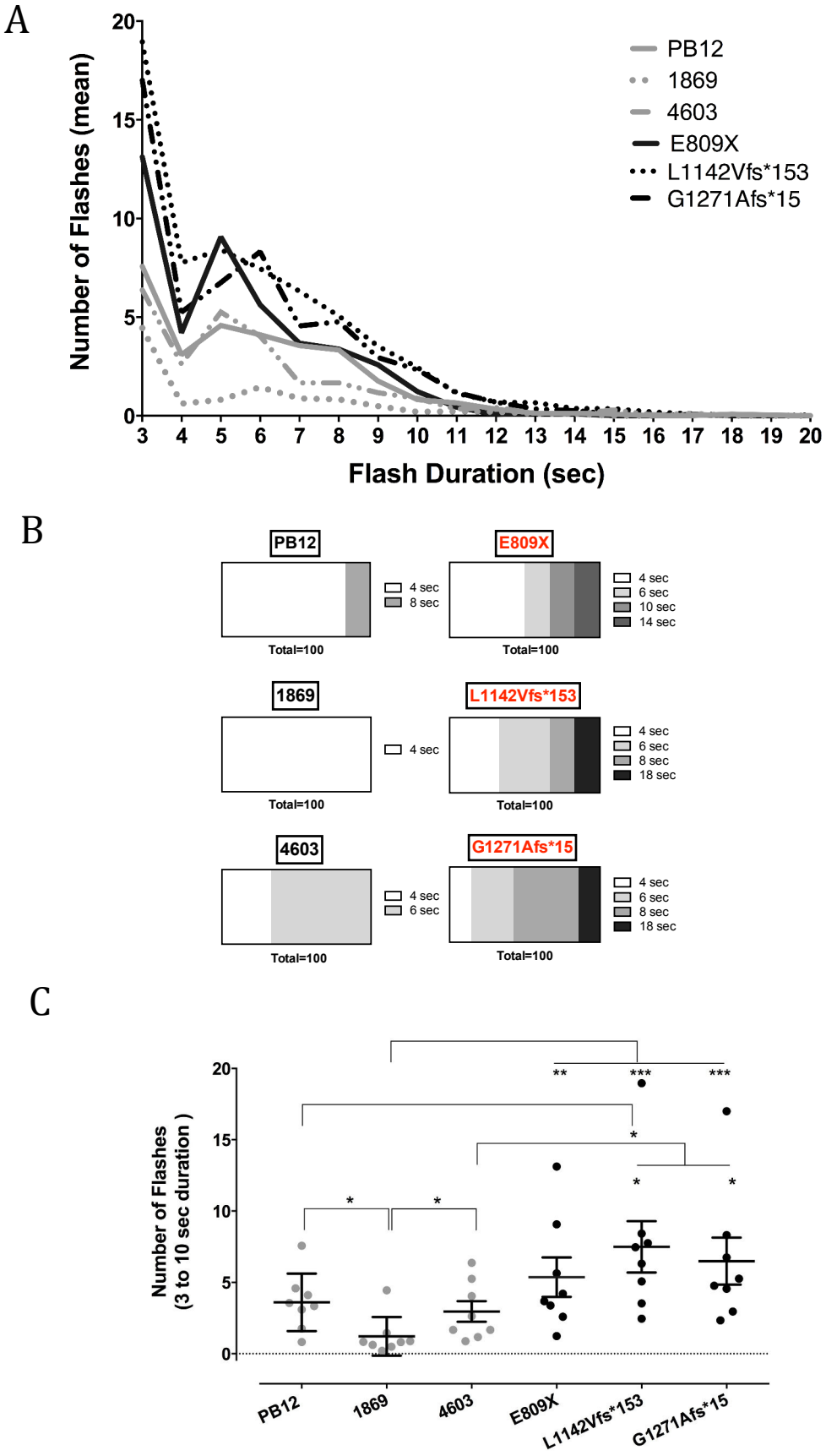
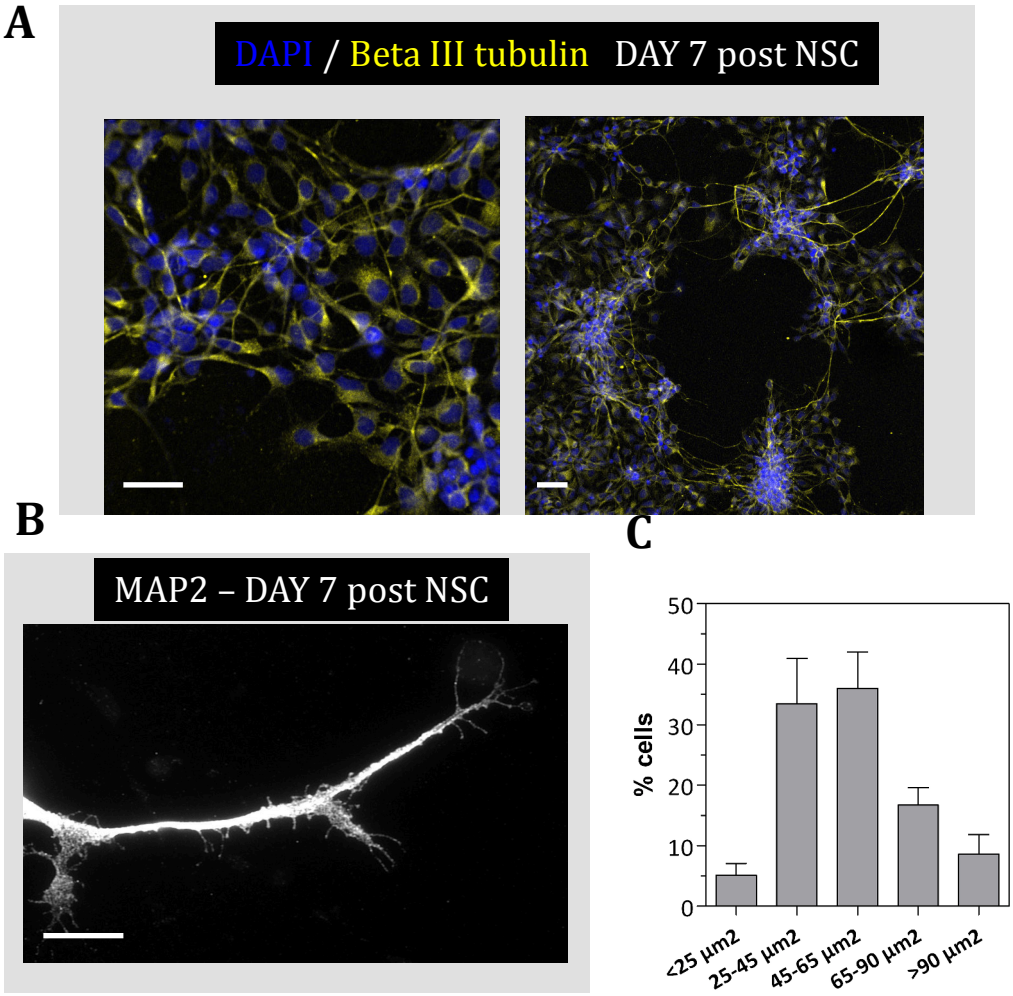
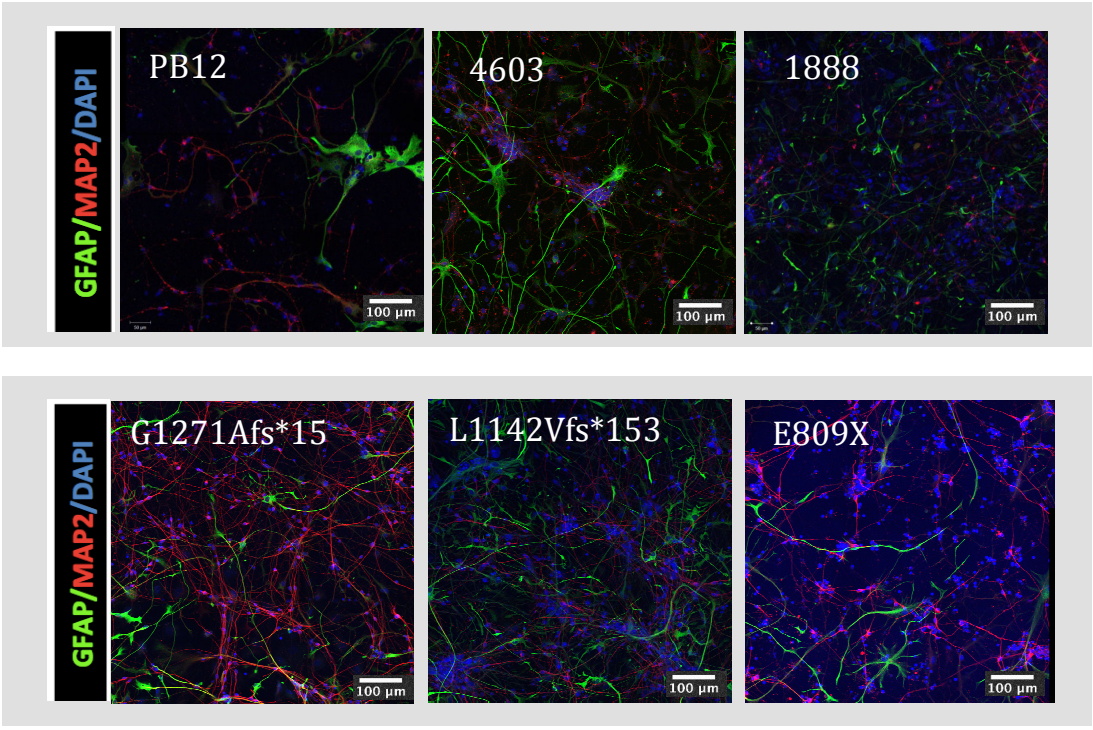


Figure 4, Gouder et al.

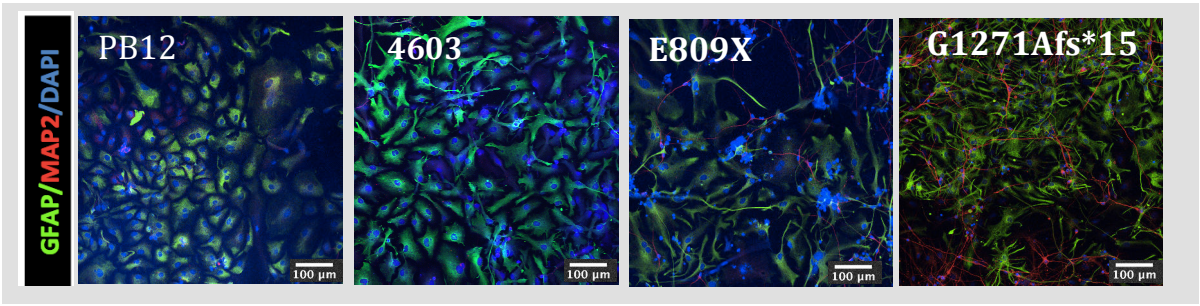


Supplemental Figure 1, Gouder et al.

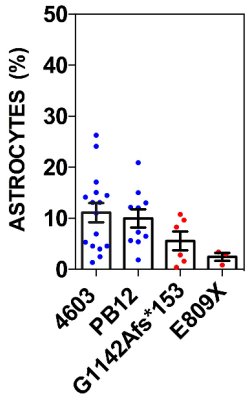
A



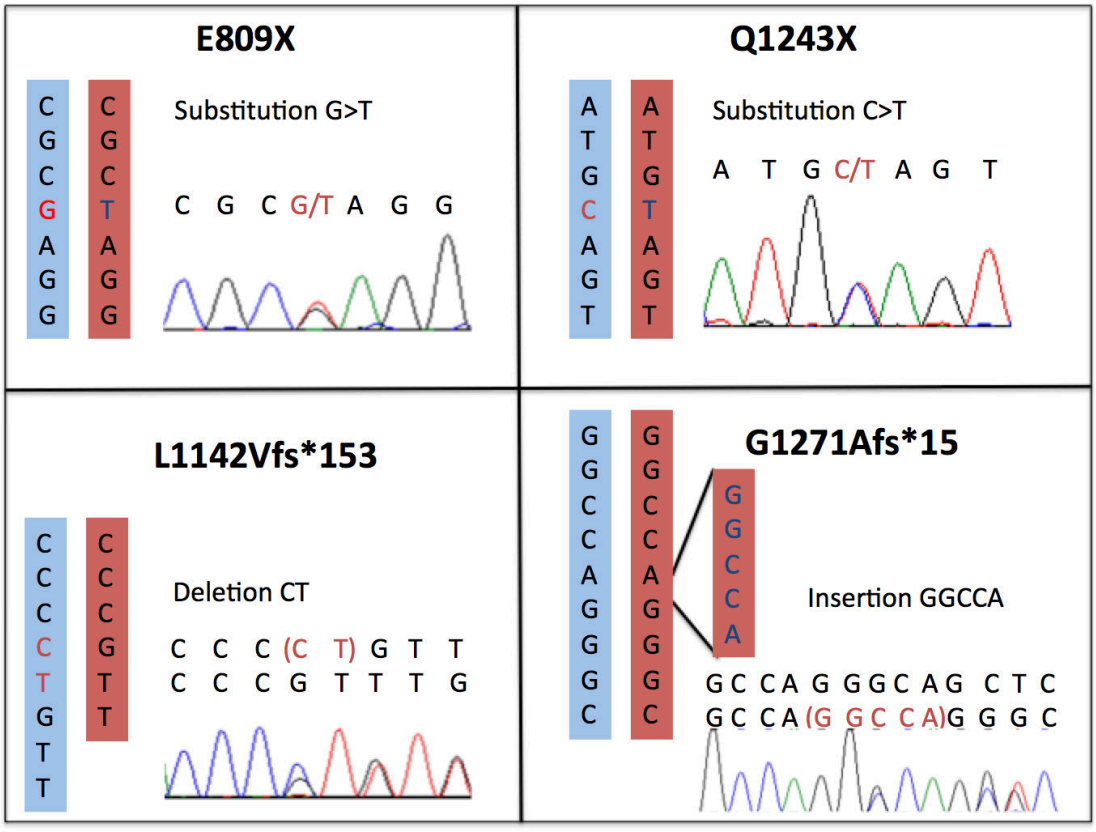
B



C



Supplemental Figure 2, Gouder et al.



Supplemental Figure 3, Gouder et al.

Mutation	E809X	Q1243X	L1142Vfs*153	G1271Afs*15
	G>T	C>T	del CT	ins GGCCA
Chromosomal position	g.51158686	g.51159988	g.51159685-51159687	g.51160070-51160071
Deleterious	Yes	Yes	Yes	Yes
Origin	*De novo*	*De novo*	*De novo*	*De novo*
Exon	21	21	21	21
Protein Region	Proline-rich	Proline-rich	Proline-rich	Proline-rich
Sex	F	M	M	M
Intellectual disability	Moderate	Severe	Severe	Severe
Regression	Early		Early	
Verbal	Yes	No	No	
Dismophic signs	Yes	Yes	Yes	
Hypotonia	Yes	Yes		
Epilepsy	No	No	GTCS (AAO:10 years)	No

Supplemental Table 1, Gouder et al.

ANTIBODY	*HOST*	*REFERENCE*	*SUPPLIER*	*DILUTION*
Primary Antibodies				
synapsine	*Rabbit*	*ab1543*	*Millipore*	*1/1000*
VGlut	*Rabbit*	*135303*	*Synaptic System*	*1/1000*
SHANK3	*Mouse*		*Tobias Boeckers*	*1/500*
BetaIII tubulin	*Chicken*	*ab9354*	*Millipore*	*1/1000*
Pan SHANK	*Mouse*	*MABN24*	*Millipore*	*1/500*
GFAP	*Rabbit*	*ab7260*	*Abcam*	*1/1000*
MAP2	*Mouse*	*MAB 3418*	*Millipore*	*1/200*
Gephyrin	*Mouse*	*147011*	*Synaptic System*	*1/500*
PSD95	*Rabbit*	*ab18258*	*Abcam*	*1/1000*
Secondary Antibodies				
Anti mouse Alexa 488	*Chicken*	*A21200*	*Invitrogen*	*1/200*
Anti mouse Alexa 594	*Goat*	*A11005*	*Invitrogen*	*1/200*
Anti rabbit Alexa 488	*Rabbit*	*A11034*	*Invitrogen*	*1/200*
Anti chicken Alexa 546	*Goat*	*A11040*	*Invitrogen*	*1/200*

Supplemental Table 2, Gouder et al.

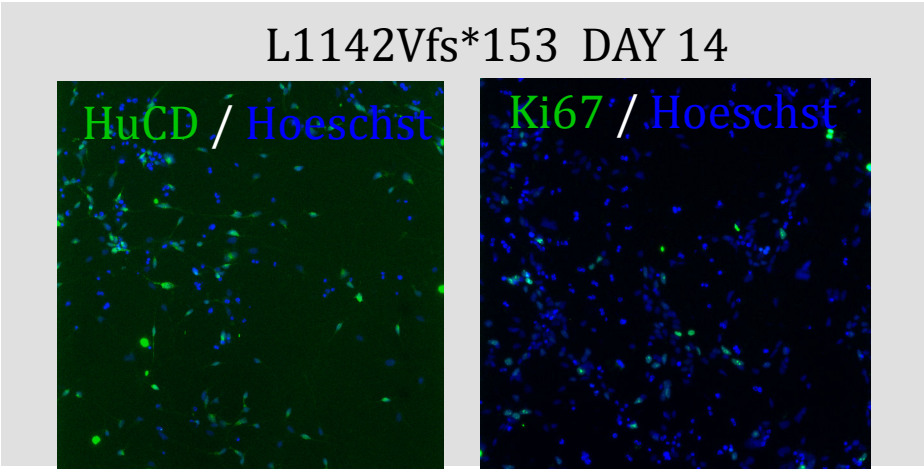
	Forwad		reverse	Size
21-AF	TGTAAAACGACGGCCAGTTTGTGTCCGGACGGTGGCTTCC	21-AR	GGATAACAATTTCACACAGGACGGAGCGAAGAGGCTGGCGCTGAA	634
21-AF'	TGTAAAACGACGGCCAGTagacatcgcagacgcagact			
21-BF	TGTAAAACGACGGCCAGTGCGCTCCATGATCATCCTGCA	21-BR	GGATAACAATTTCACACAGGTTTGCCGGTGAGTGGGTGGA	634
21-CF	TGTAAAACGACGGCCAGTGCGGATCTGCCATCCCTACAGC	21-CR	GGATAACAATTTCACACAGGCACAGCCGCTGACTGCATGG	618
21-DF	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTGGCCTCATCGTTGTGCACGCCA	21-DR	GGATAACAATTTCACACAGGTTGGGAGGCACTGGTGGCTTCTCGA	626
21_EF	TGTAAAACGACGGCCAGTAGGCTGACACACGCAGCTCC	21_ER	GGATAACAATTTCACACAGGAGGCCAAGCAAGACCGGATTCAG	698

Legend to Supplemental Table 3:
Nucleotide sequence of primers used for PCR and Sanger sequencing. Five sets of primers were used to cover the whole sequence of exon 21. Primers were linked to an adaptor sequence (M13 sequence (red characters). Three sets of primers (duos B, C and D) were used for genomic DNA and cDNA amplification. Set A and E were not used for cDNA since AF and ER were located in intronic regions Sequencing was performed using M13 sequences as primers.

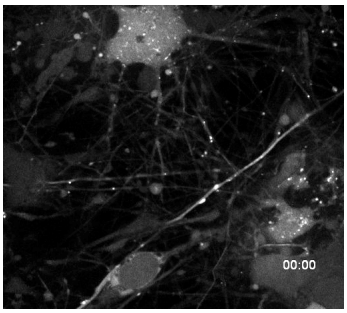
Quality control and NSC validation							
		Ki67			HuCD		
		Day7	Day14	Day 21	Day7	Day14	Day21
1869	CTR	27,86	16,6	1,17	50,59	54,49	72
4603	CTR	36,36	12,26	1,94	40,3	45,59	63,4
3814	CTR	27,86	40,21	5,86	10,78	34,09	62,8
E809X	SHANK3	45,77	35,97	4,74	30,98	51,62	76,6
Q1243X	SHANK3	23,67	1,14	1,91	37,98	59,65	72,5
G1271Afs*15	SHANK3	16,685	36,485	ND	9,735	61,495	ND
L1142Vfsf*153	SHANK3	17,5	7,78	ND	34,6	69,3	ND

Mean							
		Ki67			HuCD		
Cell Line		day7	day14	day 21	day7	day14	day21
1869	CTR	4,62	1,82	0,73	4,98	9,1	5,3
4603	CTR	3,43	5,06	2,16	2,86	4,01	4,3
3814	CTR	4,55	0,37	1,68	3,72	5,89	9,8
E809X	SHANK3	3,12	1,29	1,92	2,18	0,57	7,1
Q1243X	SHANK3	4,84	0,08	1,02	2,63	6,9	6,4
G1271Afs*15	SHANK3	4	6	ND	7	46	ND
L1142Vfs*153	SHANK3	0,24	1,23	ND	0,56	5,3	ND

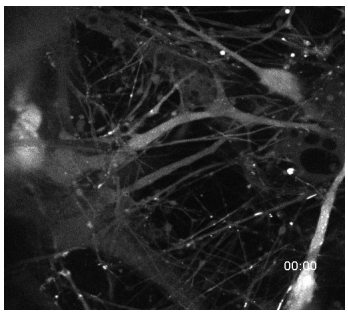
SD



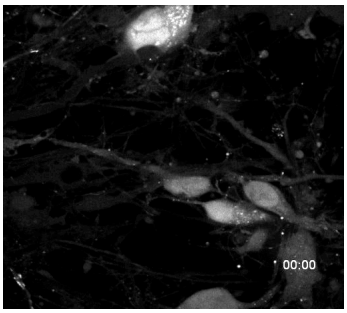
Supplemental Table 4 , Gouder et al.



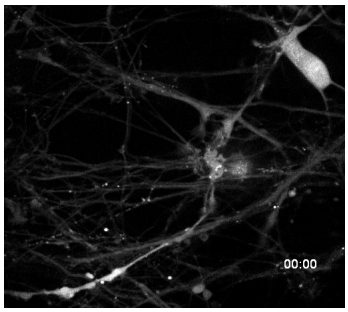
4603



PB12



G1271Afs*15



L1142Vfs*153

Supplemental Movies 1-4, Gouder et al.

Legends to Figures

Figure 1 :

Patients with heterozygous truncated de novo mutations located in SHANK3 structure.

A. Pedigrees of the families carrying de novo truncating SHANK3 mutations. The four patients probands carry de novo truncating mutations in SHANK3 gene (2 « STOP » and 2 « frameshift » mutations leading to a STOP codon). B. Schematic representation of the multidomain SHANK3 protein with the location of the four mutated aminoacids. Conserved domains are indicated by filled rectangles. The mutations are located within the Proline-rich structure of SHANK3, between the PDZ and the SAM domains, and within exon 21 of SHANK3 gene. C. Left panel shows the precise location of the six ankyrin (ANK) domains within the SHANK protein aminoacid structure. Right panel shows the juxtaposed ANK domains which have been modeled according to a method reported previously (Mercati et al. 2011; Mercati et al. 2016) and by using RQM pdb id as a 3D template.

D. Illustration of the 3D structures of the SH3, PDZ and SAM domains. In C. and D. All FASTA sequences were retrieved from the UnitProtKB server at (http//www.uniprot.org/uniprot/Q9BYBO#structure).

Figure 2 :

Pre- and post-synaptic proteins in human iPSC cell-derived neurons in culture.

A. Schematic representation of the maturation of iPSC-derived neurons at different time periods. B. Right panel : Immunofluorescence staining of human iPSC cells-derived neurons by MAP2 at different intervals of time post NSC differentiation. The target shows neurite elongation and established connectivity between cell clusters. Left panel :

Quantification of the longest neurite as an index of neurite outgrowth within different cultures after MAP2 labeling and using the Acapella software. The numbers of neurons included in the analysis are indicated in the graph. Data are mean ± SEM. C. Immunoflurescence staining using presynaptic (synapsin) and postsynaptic (PSP95, SHANK3 and PanSHANK) markers. No staining was detectable before the indicated days post NSC differentiation. Data are from at least two control individuals. The anti-SHANK3 antibody was kindly provided by T. Boeckers and directed against amino acid residues 330-468 in SHANK3 protrein. The right panel illustrates the colocalisation of SHANK proteins and PSD95 (yellow dots). D. Left panel : Specific staining of glutamatergic neurons by the VGlut marker at 10 days post NSC differentiation. Right panel : Labeling of control and ASD mature neurons at 40-45 days post NSC differentiation using the pAAV-CaMKIIa-hChR2-EYFP-WPRE lentivirus. Scale bars = 10 μm.

Figure 3 :

Quantitative analysis of the morphological parameters of primary dendritic spines between control and ASD neurons. A. Spine morphological parameters were quantified using the Imaris sofware and according to the protocol reported by Gouder et al. (2015). B. GFP- labeling of spine segments with a corresponding 3D reconstruction. Scale bar = 4μm. Dendrite segments (grey color) are endowed with four categories of spines: Filopodia (pink color), Thin (blue), Stubby (pink) and Muschroom (green). Numbers of neurons are directly indicated in the graph Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. Data are mean ± SEM. $p<0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$. C. Upper graph : Quantitative classification of each spine categories between 3 control and 3 ASD neurons. The same color code was used. Bottom graph : Expression of

the percentage of mature spines by combining stubby and muschroom spines. The highest amount of mature spines was found in neurons from patient with the frameshift mutation G1271Afs*15.

Figure 4 :

Basal calcium oscillations in iPSC-derived neurons

Basal cytosolic calcium activity in iPSC-derived neurons was detected using the fluorescent Fluo-4-AM calcium sensor. Live cell imaging was performed using spinning disk confocal microscopy. A. Representative curves of the duration of flashes (X values) as a function of their numbers (Y values) within the control and ASD cultures. The values are the mean of data obtained from separate culture dishes (n=4-8). B. Diagrams showing the relative proportions of different calcium flashes ranging from 4 to 18 seconds in duration within the control and ASD cultures. The proportions of long flashes appear higher in ASD as compared to control cultures. C. Histogram representing the number of flashes between cultures from control individuals and ASD patients. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. Data are represented as mean ± SD. * $p<0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$. The proportions of flashes ranging from 3 to 10 sec appear higher in ASD as compared to control cultures.

Supplemental Figure 1 :

A. Immunofluorescence staining of human control iPSC cells-derived neurons by beta III tubulin at 7 days post NSC differentiation which shows the neuronal cells with their tendency to form clusters. B. Immunofluorescence staining of a single dendrite using the MAP2 marker showing the occurrence of dendritic growth cones at early stages of culture. C. Histogram presents diverse cell categories according to nuclei areas obtained

from 4 separate cultures. This indicates the presence of distinct cell types. Measurements were performed using the Acapella software. Data are mean +/- SEM. from at least two control individuals. Scale bars = 10 μm.

Supplemental Figure 2 :

Occurrence of astrocytes in cultures from iPSC-derived neurons.

Immunofluorescence GFAP staining of cultures from iPSC-derived neurons showing either dispersed (panel A) or clustered (panel B) astrocytes. C. Quantification of the percentages of astrocytes within the whole cultures from 2 control individuals and 2 patients with SHANK3 mutations. Data are from at least two different cultures. A total number of 670 to 2851 cells were counted per field without clusters. Data are mean +/- SEM. Statistical analysis was performed using the Anova Kuskall-Wallis test (p= 0.0498).

Supplemental Figure 3:

Genomic and cDNA sequencing.

For genomic DNA sequencing, cells were lyzed in lysis buffer (50 mM Tris, pH = 8.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) with proteinase K. DNA was extracted using phenol-chloroform isoamylalcool (P2069, Sigma) and isopropanol (ref. 59309-1L, Sigma).

For cDNA sequencing, RNA was extracted using the miRNA Micro Kit (QIAGEN) and reverse transcription was performed using the SuperScript ® VILO cDNA Synthesis Kit (ref. 11754-250, Invitrogen).

The region encompassing the mutation was amplified by PCR using 5 or 4 sets of primers for the genomic DNA and cDNA, respectively (see Table S3) and the Kapa2G polymerase (KAPA 2G Robust HotStart PCR Kits, ref. KK5517, Clinisciences). Controls were performed in the absence of reverse transcriptase for cDNA amplification.

PCR products were run on agarose gels and purified using phosphatase (FastAP, ref. EF0651, ThermoScientific) and exonuclease enzymes (Exonuclease I, EN0581, ThermoScientific).

Sequencing were performed with the BigDye®TerminatorV3.1 cycle sequencing Kit (ref. 4337455, ThermoFisher) using M13 sequences as primers. A final purification step was performed using the bigDyeXTerminator®Purrification Kit (4376484, ThermoFisher). Sequences were sent to EUROFINS.

Supplemental Table S4 :

Late cortical progenitors (LCP) terminal differentiation using high-throuput screening in 384-well plates as described in Boissart et al (2013). Values from the table correspond to the automated quantification of the kinetics of neural proliferation (Ki-67 marker) and neuronal differentiation (HuCD marker) at different days after cell plating. Representative pictures captured by the Arrayscan microscope are presented for the cells from patient L1142Vfs*153 which was not included in Boissart et al (2013) and Darville et al (2016).

Acknowledgements

The authors are thankful to the Clinical Investigation Center of Robert Debré hospital for assistance with patient recruitment, sampling and fibroblast preparations. The funding for L.G.'s PhD was provided by the French Ministry of Education. Other fundings for this study were provided by grants from the French National Research Agency ANR (ANR-13-SAMA-0006; SynDivAutism), the Bettencourt-Schueller Foundation, the Cognacq Jay Foundation, and the Fondamental Foundation. We are grateful to Pascal Roux for sharing his expertise in spectral confocal microscopy.

References

Arenallo JI, Benavides-Piccione R, DeFelipe J and Yuste R. 2007. Ultrastructure of dendritic spines : correlation between synaptic and spine morphologies. Fontiers in Neurosci **1:** 131-143.

Binidosti M, Botta P, Krütter S, Proenca CC, Stoehr N, Berhard M, Fruh I, Mueller M, Bonenfant D, Voshol H et al. 2016. CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency. Science **351:** 1199-1203.

Boissart C, Nissan X, Giraud-Triboult K, Peschanski M, Benchoua A. miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. 2012. *Development* **139:** 1247-1257.

Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, , Julita E, Delorme R, , Bourgeron T, Peschanski M, Benchoua A. 2013. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry* **3:** e294.

Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang *X*, Dickstein DL, Takahashi N, Kajiwara Y, Yang M, Katz AM, Scattoni ML *et al*. 2010. Haploinsufficiency of the autism-associated *Shank3* gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol. Autism* 1**:** 1-15.

Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, Buxbaum JD, Boeckers TM, Schmeisser MJ. 2015. Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Mol. Autism* **6 :** 1–13.

Darville H, Poulet A, Rodet-Amsellem F, Chatrousse L, Pernelle J, Boissart C, Héron D, Nava C, Perrier A, Jarrige M, Cogé F, Millan MJ, Bourgeron T, Peschanski M, Delorme R, Benchoua A. 2016. Huan pluripotent stem cell-derived cortical neurons for high throughput medication screening in autism : a proof of concept study in SHANK3 haploinsufficiency syndrome. EBiomedecine (in press).

Durand CM *et al.* SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. 2012. *Mol. Psychiatry* **17 :** 71–84.

Gouder L, Tinevez JY, Goubran-Botros H, Benchoua A, Bourgeron T, Cloëz-Tayarani I. 2015. Three-dimensional quantification of dendritic spines from pyramidal neurons derived from human induced pluripotent stem cells. e53197. 1-8.

Isshiki M, Tanaka S, Kuriu T, Tachbi K, Takumi T, Okabe S, 2014. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. Nat. Communications **5:** 4742-4756.

Hulbert SW and Jiang Y. 2016. Monogenic Mouse Models of Autism Spectrum Disorders: Common Mechanisms and Missing Links. 2016. *Neuroscience*. **3:** 3-23.

Leblond CS *et al*. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. 2014. PLoS genetics; **10:** e1004580.

Majewska A, Tashiro A, Yuste R. Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility. 2000. *J. Neurosci*. **20 :** 8262-8268.

Mameza, M. G., Dvoretskova, E., Bamann, M., Honck, H.-H., Guler, T., Boeckers, T. M., Schoen, M., Verpelli, C., Sala, C., Barsukov, I., Dityatev, A., Kreienkamp, H.-J. SHANK3 gene mutations associated with autism facilitate ligand binding to the Shank3 ankyrin repeat region. J. Biol. Chem. 288: 26697-26708, 2013.

Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. 2010. A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells*. Cell* **143 :** 527-539.

Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai *H. 2001.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neurosci.* **4 :** 1086-1092.

Mei Y, Monteiro P, Zhou Y, Kim JA, Gao X, Fu Z, Feng G. 2016. Adult restoration of *Shank3* expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature* **530 :** 481–484.

Mercati O, Danckaert A, Bellinzoni M, Gouder L, Cloëz-Tayarani I. 2011. Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites. **2 :** 324-334.

Mercati O *et al.* CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders. 1–9 (2016). doi:10.1038/mp.2016.61 [Epub ahead of print]

Nogochi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2005. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca2+ signaling in dendrites. Neuron 46 : 609-622.

Oertner T G, Matus A. 2005. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. Cell Calcium 37 : 477-482.

Osten P, Dittgen T, Licznerski P. 2006. Lentivirus-based genetic manipulations in neurons in vivo. In : Kittler JT, Moss SJ, editors. The Dynamic Synapse : Molecular Methods in ionotropic receptor biology. Boca Raton (FL) : CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 13. Fontiers in Neuroscience.

Peça, J. *et al*. 2011. *Shank3* mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472 : 437–442.

Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex : The perikaryon, dendrites and spines. Am J. Anat. **127:** 321-355.

Peng Y, lu Z, Li G, Piechowicz M, Anderson M, Uddin Y, Qiu S. 2016. The autism-associated MET receptor tyrosine kinase engages early neuroanl growth mechanism and controls glutamatergic circuits development in the forebrain. Mol. Psychiatry **21 :** 925-935.

Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, Bockaert J, Fagni L. 2005. Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J Neurosci*. **25:** 3560-3575.

Sachs NA *et al.* 2005. A frameshift mutation in Disrupted in schizophrenia 1 in an American family with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Mol.* Psychiatry **10 :** 758-764.

Schuetz G, Rosario M, Grimm J, Boeckers T M, Gundelfinger E D, Birchmeier W. 2004. The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells. *J Cell Biol* **167:** 945-952.

Slezak M and Pfrieger FW. 2003. New roles for astrocytes : regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci. **26:** 531-535.*

Song, H., Stevens, C. F. & Gage, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. 39–44 (2002).

Sugiyama Y, Kawabata I, Sobue K, Okabe S. 2005. Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. Nat Methods **2:** 677-684.

Wen Z, Ngguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, Kim N-S, Yoon K-J, Shin J, Zhang C, et al. 2014. Synaptic dysregulation in a human iPSC cell model of mental disorders. *Nature* 515: 414-418.

Wang X. *et al*. 2011. Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of *Shank3*. *Hum Mol Genet* 20**:** 3093–3108.

Yang, M. *et al*. 2012. Reduced excitatory neurotransmission and mild autism-relevant phenotypes in adolescent *Shank3* null mutant mice. *J Neurosci* 32**:** 6525–6541.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La différenciation de neurones humains à partir d'iPSCs permet de s'affranchir des limitations associées aux modèles animaux dont le développement cérébral diffère significativement (cinétique de maturation, programme morphogénétique). De plus, des modèles murins hétérozygotes sont rarement élaborés alors que les mutations observées chez les patients se présentent majoritairement à l'état hétérozygote, comme c'est le cas pour les mutations au sein du gène *SHANK3* dans notre étude. Le modèle iPSCs permet de nombreuses applications comme illustrées sur la figure 22. Nous avons focalisé notre étude sur des analyses *in vitro.* Il est à noter que le modèle iPSCs présente lui aussi certains inconvénients. En avoir connaissance permet d'adapter précisément chaque protocole de manière à les limiter pour une meilleure reproductibilité des données. Il est aussi important de se rapprocher des conditions *in vivo*.

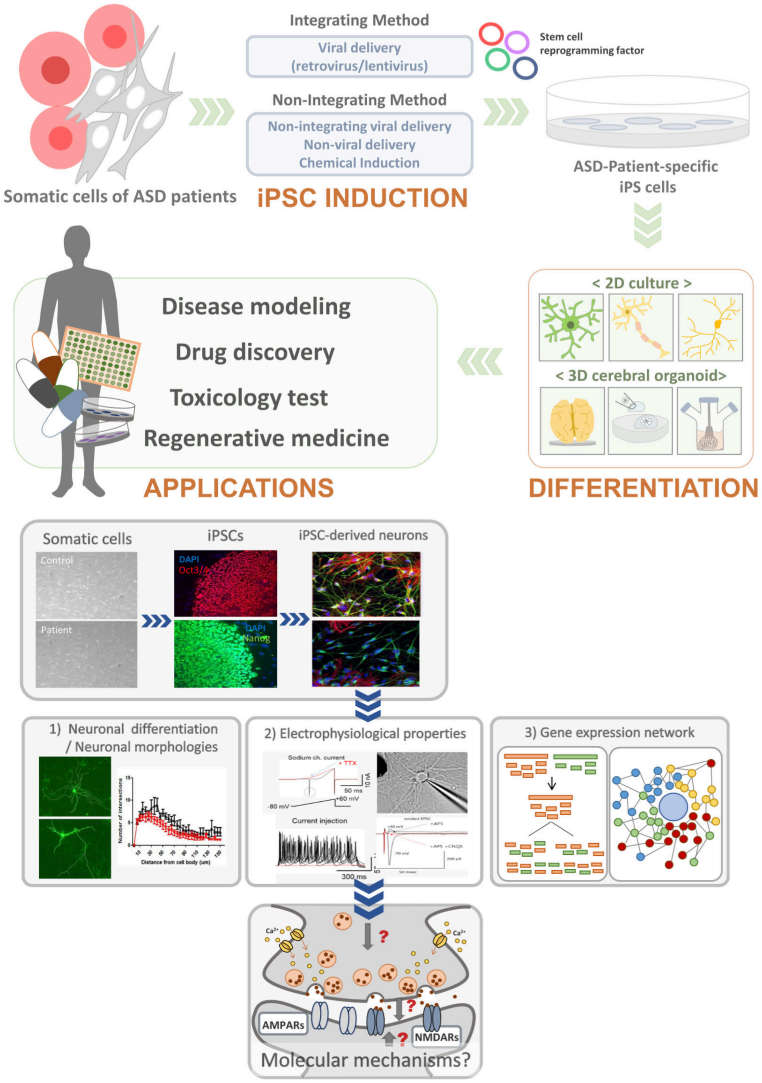


Figure 22: Les différentes possibilities et applications des neurons derives d'iPSCs. Figure issue de Lim et al. 2015.

Intérêts de cultures multi-types cellulaires

Le protocole utilisé dans notre étude donne accès à plusieurs types cellulaires dont les proportions relatives correspondent à celles observées dans le cortex cérébral chez l'homme. Le type cellulaire majoritaire correspond aux neurones glutamatergiques corticaux des couches II à IV. Une différenciation en neurones GABAergiques et en astrocytes est également observée. Les neurones pyramidaux glutamatergiques

excitateurs représentent environ 80% des neurones corticaux, comme observé dans le cortex chez l 'homme (prédominants dans les couches II/III et V/VI). L'expression de SHANK3 dans le cortex et en particulier au sein des synapses excitatrices nous a conduit à focaliser nos études sur ce type cellulaire majoritaire, d'une part pour la mise au point de la quantification en 3 dimensions de la morphologie des épines et d'autre part pour la réalisation des études morphologiques et fonctionnelles à partir d'individus contrôles et patients TSA. A noter qu'il existe des neurones excitateurs non pyramidaux (couches I, II et IV) à axones courts (Markram et al. 2004). Pour nos études morphologiques, nous avons focalisé nos approches sur les neurones pyramidaux des couches II à IV identifiées à l'aide marqueurs (Boissart et al. 2013).

Dans le cerveau chez l'homme, les autres neurones corticaux sont des interneurones GABAERgiques (environ 20%), généralement inhibiteurs. Ces cellules projettent sur les neurones pyramidaux. Il existe des neurones inhibiteurs GABAergiques bipolaires (Markram et al, 2004). Dans nos cultures, nous avons pu mettre en évidence des neurones GABAergiques par immunofluorescence dont des neurones bipolaires. Une connectivité neuronale peut s'établir dans notre système expérimental de façon assez similaire à celle observée *in vivo*. Ce n'est pas toujours une situation retrouvée dans la littérature lorsqu'un seul type cellulaire neuronal est différencié et mis en culture. Cette connectivité est visible à partir des acquisitions en microscopie réalisées dans nos études. Le stade « 40 jours post-NSC » permet d'avoir un arbre dendritique suffisamment étendu, des projections axonales et une visualisation aisée des cellules pyramidales. La mise en place des compartiments pré- et postsynaptiques au sein des cultures est en accord avec nos données électrophysiologiques en cours (cf. ultérieurement). L'existence d'une connectivité fonctionnelle est nécessaire au

développement et à la morphologie des épines dendritiques, influencée par l'activité neuronale.

Enfin, la présence d'astrocytes illustrée précédemment, sous-tend le développement des neurones. Le rôle trophique de ces cellules au sein de cultures de neurones dérivés d'iPSCs a été largement établi dans la littérature (Müller et Seifert 1982; Odawara et al. 2014). Une culture de neurones dérivés d'iPSCs en présence d'astrocytes augmente la maturation morphologique (complexité dendritique) et fonctionnelle (expression des canaux ioniques et récepteurs) des neurones par rapport à des conditions de culture sur laminine simple (Tang et al. 2013). De même, la fréquence et l'amplitude des courants synaptiques se voient améliorées. Les astrocytes présents au voisinage des synapses possèdent de multiples fonctions et participent activement à la restauration de l'homéostasie cérébrale. Ils interviennent dans la régulation de la transmission nerveuse en contrôlant les équilibres ioniques et les taux extraneuronaux de neurotransmetteurs. Ils possèdent de nombreux canaux et pompes K^+-Na^+ ATPases dépendantes et leur présence est à prendre en compte dans les mesures d'activités ioniques. Le protocole développé pour nos approches en imagerie calcique a permis de considérer ces aspects (article 2) et d'exclure les flux calciques non neuronaux. Il est à noter que les astrocytes contrôlent aussi les concentrations en glutamate et en GABA libérés par les neurones et métabolisent ces neuromédiateurs (Pannasch et al. 2011; Schell et al. 1995).

Caractérisation des épines dendritiques de neurones de patients et d'individus contrôles.

Des anomalies dans les densités et la morphologie des épines dendritiques reflètent des altérations d'activité neuronale et sont à l'origine de troubles du développement cérébral. Notre étude a porté sur l'analyse de neurones issus de patients porteurs de mutations *SHANK3* dont le rôle primordial dans le développement des épines a été précédemment évoqué notamment sur neurones de rongeurs transfectés.

Nous avons initié nos travaux par l'étude de la cinétique de maturation des neurones reprogrammés en culture à partir de 7 jours post-différenciation des cellules souches neuronales jusqu'à 70 jours et ceci, principalement par des marquages en immunofluorescence. Les études fonctionnelles ont été réalisées à 40-45 jours de différenciation. En effet, ce stade permet la visualisation d'épines dendritiques de diverses catégories, y compris d'épines matures. Il exclut aussi le risque d'apoptose neuronale occasionnellement observée à des stades plus tardifs tels que 70 jours.

Nos résultats démontrent une diminution des densités d'épines dendritiques (dendrites primaires) chez les patients avec TSA et porteurs de mutations *SHANK3* par rapport aux individus non atteints. Ces résultats corrèlent avec les résultats d'études sur tissus *post-mortem*, modèles murins et iPSCs (cf. introduction). Ils confirment le rôle crucial de SHANK3 dans la formation des épines. Une mutation délétère à l'état hétérozygote suffit à induire une perturbation au niveau de la morphologie et du stade de maturation des épines. Nous observons aussi une diminution du volume total et du volume de la tête des épines, ceci peut s'expliquer par une déstabilisation de l'échafaudage de la PSD causée par un défaut d'ancrage de SHANK3. En effet, la taille de la tête de l'épine est fortement corrélée à la taille de la PSD et au recrutement de filaments d'actine et de récepteurs. L'absence partielle de protéines SHANK3 au niveau de la PSD va modifier le recrutement

et le positionnement d'autres protéines synaptiques et altérer la morphologie et l'activité des synapses excitatrices des neurones pyramidaux.

Une classification des différents types d'épines a fourni des indications intéressantes. Il est à noter qu'une telle approche jusqu'à présent n'a pas été reportée dans la littérature dans le cadre de désordres neuropsychiatriques, y compris les TSA. Nos résultats indiquent une prédominance de filopodes chez les contrôles et deux patients (E809X et Q1243X). On retrouve aussi la présence de filopodes chez le troisième patient G1271Afs*15 mais dans une proportion plus faible. Dans les conditions expérimentales retenues, la maturation des épines n'est pas complètement achevée.

Nous avons aussi détecté une différence de distribution des différentes catégories d'épines chez le patient G1271Afs*15 par rapport aux contrôles et aux deux autres patients. En effet, celui-ci présente de plus grandes densités de « mushroom » et « stubby », démontrant un profil de maturation plus avancé. Ce résultat dénote aussi une variabilité au sein des patients, exposant que des mutations toutes tronquantes mais positionnées différemment sur la structure du gène peuvent légèrement diverger dans leurs effets.

Analyse fonctionnelle des neurones dérivés d'iPSCs de patients et d'individus contrôles

Des anomalies morphologiques des épines dendritiques modifient l'activité neuronale. Nous avons analysé sélectivement l'activité des neurones en culture par une mesure des oscillations calciques spontanées par une approche d'imagerie calcique. Notre approche diffère de celles utilisées dans la littérature, généralement effectuées sur des champs larges mesurant une activité globale de ce fait incluant beaucoup de cellules, souvent en

amas et à faible résolution optique (Darville et al. 2016). Pour notre analyse et en collaboration avec Jean-Yves Tinevez et Anne Danckeart (Imagopole, Institut Pasteur), nous avons développé une approche à plus forte résolution (technique d'analyse à l'échelle du dendrite) permettant d'étudier les oscillations calciques sur un nombre limité de cellules, principalement pyramidales, en excluant les amas cellulaires et les astrocytes et en détectant les signaux par dendrites. Enfin, notre approche algorithmique innovante permet de catégoriser les oscillations calciques en fonction non seulement de leur intensité et de leur nombre mais aussi de leur durée (de 4 à 18 secondes).

Les données obtenues démontrent une augmentation de la fréquence de flux calciques chez les patients TSA par rapport aux contrôles, ainsi qu'une augmentation de la proportion des pics calciques courts (majoritaires). Ces données reflètent un niveau d'activité calcique plus élevé chez les patients suggérant une maturation des épines plus élévée. En effet, nous observons par exemple que les neurones issus du patient G1271Afs*15 présentant une proportion plus importante d'épines matures, présentent parallèlement des oscillations de flux calciques plus élevées. Il est important de noter que nos données sur la fréquence des oscillations spontanées de flux calciques diffèrent de celles d'autres études. Une des raisons est très probablement d'ordre méthodologique et relève des aspects évoqués au préalable.

En parallèle des mesures d'activités calciques, des travaux de la littérature ont montré des déficits de courants électriques au niveau de cellules de patients TSA : diminution de la fréquence et de l'amplitude de ces courants (cf. Introduction).

Au cours des travaux de ma thèse, des mesures électrophysiologiques, en collaboration avec l'équipe de David DiGregorio, ont été initiées par « patch-clamp ». Nous avons pu observé des potentiels d'action en réponse à un courant injecté. Sur 15 cellules

enregistrées et issues de cultures différentes, 11 présentaient un courant et 5 des pics répétitifs (figure 23). Les cultures que nous obtenons contiennent donc des cellules matures (confirmé par un marquage avec CaMKII) qui émettent des potentiels d'action. Cependant, nous avons pu remarqué la présence de neurones inactifs. Pour la suite de l'étude en électrophysiologie, nous envisageons de nous affranchir de la présence de cellules encore immatures, en repérant et enregistrant sélectivement les cellules matures par une infection préalable avec le lentivirus CamKII.

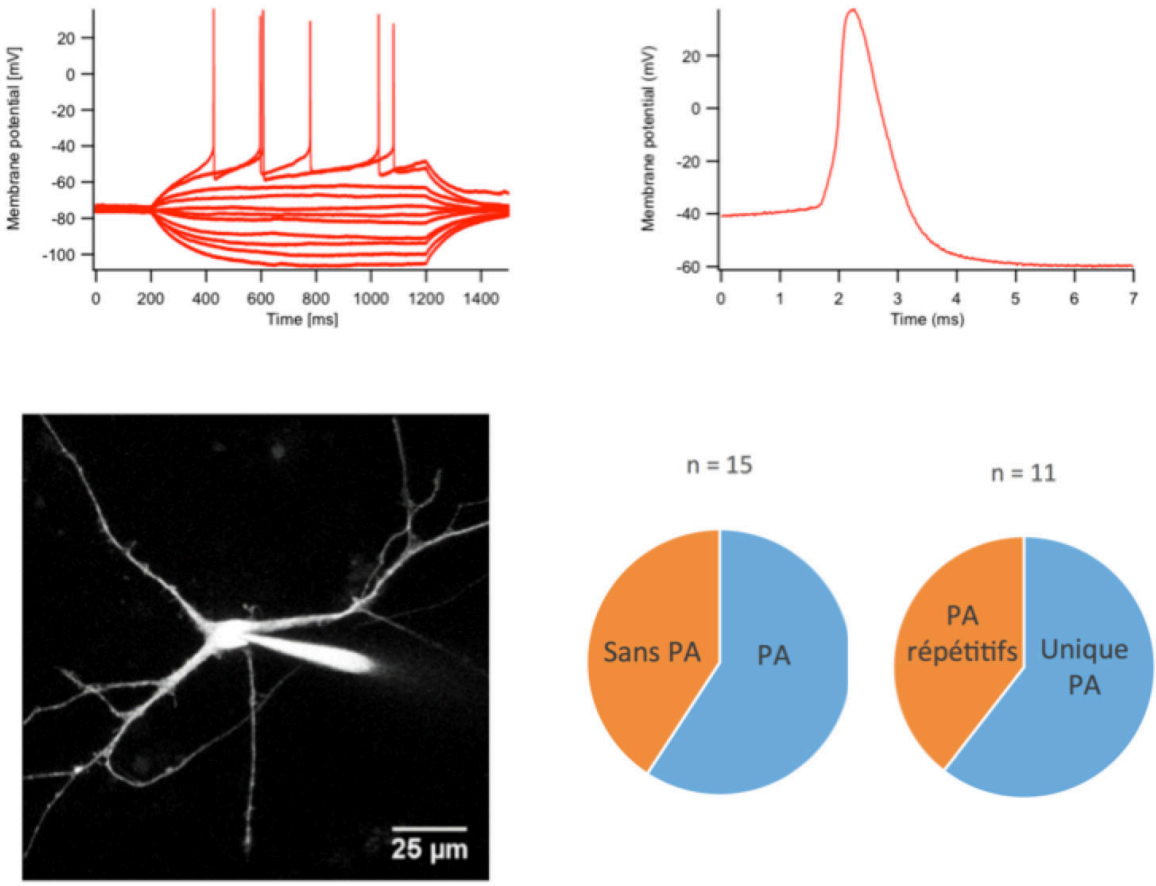


Figure 23 : Données électrophysiologiques. Mesure de « patch-clamp » montrant l'existence de flux ioniques au sein de neurones matures.

Expression de la protéine SHANK3 et de ses partenaires synaptiques

Nous avons analysé l'expression de la protéine SHANK3 et de ses partenaires principaux : PSD95, Homer et GluR1 par la technique de Western-Blot. Trois cultures indépendantes par individu ont été analysées. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les divers lysats totaux issus de cultures « contrôles » et « TSA ». Cette même analyse devrait être poursuivie sur des fractions enrichies en PSD pour éviter tout effet de dilution ou par des approches de protéomique.

L'expression de la protéine SHANK3 a été étudiée par la même approche à l'aide de divers anticorps : commerciaux, et provenant du laboratoire du Prof. Tobias Boeckers. La présence de nombreuses isoformes pour la protéine SHANK3, de plus encore inconnues chez l'homme, a rendu cette étude très complexe par l'approche de Western blot. Les analyses par immunofluorescence ont montré une expression diffuse de SHANK3 dans les neurones, en accord avec le rôle non synaptique de SHANK3. Une autre approche a été l'analyse de l'expression d'ARN codant pour SHANK3. La présence des mutations retrouvées chez les patients au niveau de l'ADN a été confirmée dans les neurones reprogrammés par séquençage de l'ARN de l'exon 21 de *SHANK3* (après traitement à la DNAse). Nous avons pu révélé la présence à la fois de la forme sauvage, ainsi que de la forme mutée dans les neurones des patients TSA, démontrant que la présence de ces mutations n'induisait pas l'élimination de l'ARN muté. Ceci est un point intéressant car les phénotypes peuvent être causés soit par l'expression d'une forme tronquée qui perturberait la mise en place de la PSD par absence de certains domaines, soit par une haplo-insuffisance par élimination de la forme tronquée. Une étude par PCR quantitative pour comparaison précise de l'expression de *SHANK3* chez les divers individus est en cours d'analyse.

Isoformes et implication des domaines de la protéine SHANK3

Les mutations tronquantes identifiées chez les patients TSA sont probablement d'autant plus délétères qu'elles affectent un grand nombre d'isoformes de SHANK3 (Figure 24). En effet, on observe que les formes principalement décrites dans la littérature sont toutes potentiellement affectées, à l'exception de l'isoforme Shank3b. Les profils d'expression et les rôles cellulaires de ces isoformes ne sont pas connus. Il est envisageable que chaque isoforme puisse avoir une fonction précise dans l'organisation de la PSD et l'élaboration des épines. De même, il est possible que chaque isoforme présente une expression différentielle à la fois au cours du temps et selon la région et/ou le type cellulaire neuronal ou autre. Des altérations de la présence et de la stœchiométrie de ces isoformes pourraient perturber le fonctionnement des synapses.

Ce point étant crucial, nous avons recherché à analyser la présence d'isoforme par la technique de Western blot au sein des neurones humains en culture à différents stades de développement. Au préalable, nous avons démontré par la technique de Western blot l'existence d'isoformes dans le cerveau chez l'homme et chez le rongeur et reproduit les données de la littérature. Nous avons voulu comparer cette expression à celle des neurones humains en culture. Nous nous sommes heurtés à des variations de taille et de nombre de signaux entre divers anticorps commerciaux disponibles avec toutefois des similitudes avec les signaux obtenus à partir d'extraits de cerveaux humains et de rongeurs (données non présentées).

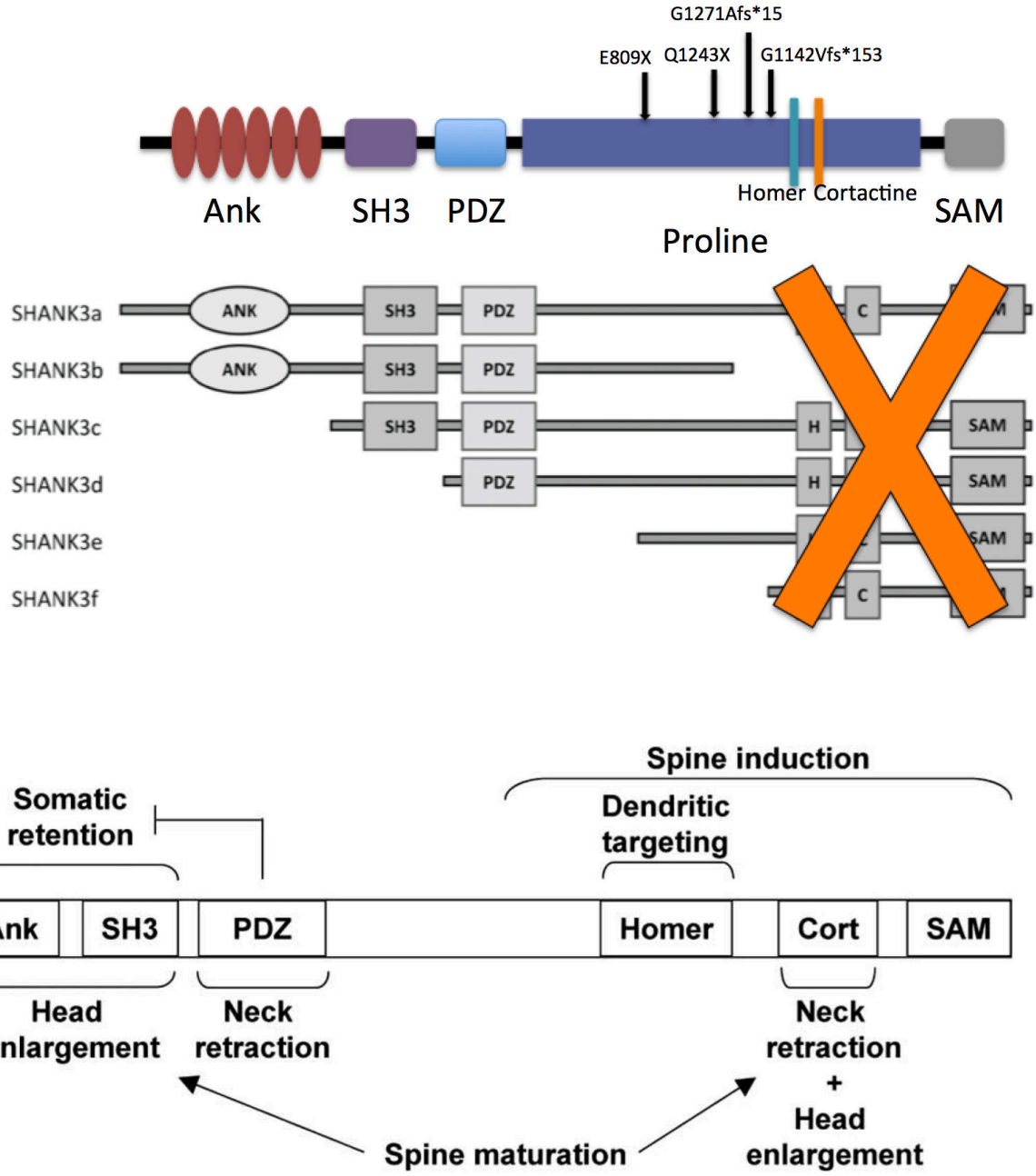


Figure 24 : Impacts des mutations sur les isoformes et rôles de la protéine SHANK3. En haut : Perte d'isoformes en cas de mutation *SHANK3* au sein de l'exon 21. Figure modifiée à partir de Uchinon 2015. En bas : Prédictions du rôle des domaines de SHANK3. La perte de chacun des domaines induit probablement des effets différents. Figure issue de Roussignol et al. 2005.

Dans notre étude, la mutation tronquante au niveau de l'exon 21 va entrainer une perte des sites de liaison à Homer (se fixe en position 1307-1316 de SHANK3 (Tu et al. 1999)),

homodimérisations, et donc affecter la liaison indirecte de la forme mutée de SHANK3 aux mGluRs et à l'actine et ainsi déstabiliser l'organisation de la PSD. Des mutations tronquantes n'affectant que le domaine SAM auraient probablement un plus faible effet délétère et entrainerait des phénotypes différents.

Tests Pharmacologiques

Le modèle de neurones dérivés d'iPSCs permet d'analyser directement l'effet de composés pharmacologiques à différentes concentrations sur les cultures *in vitro* et d'étudier les potentialités de ces composés à modifier les phénotypes cellulaires observés liés à la pathologie.

Il n'y a pas à ce jour de traitement connu pour les symptômes majeurs des troubles autistiques tels que les troubles d'interaction sociale et de la communication. L'hétérogénéité du syndrome autistique complique aussi la découverte de traitements efficaces. Les traitements actuellement prescrits traitent principalement des co-morbidités associées aux TSA. Les recherches se sont beaucoup orientées vers les molécules à propriétés antidépressives et les antipsychotiques. Ainsi l''irritabilité et les épisodes épileptiques ont pu être traités pharmacologiquement.

Les études sur modèles murins et iPSCs ont permis de tester des molécules dans le but de réverser certains phénotypes comportementaux et cellulaires. La combinaison de tests sur ces deux modèles est nécessaire.

Parmi les multiples études pharmacologiques réalisées sur des modèles TSA, les effets lithium ont été assez largement étudiés. Le lithium est un régulateur d'humeur qui est prescrit principalement en cas de troubles bipolaires (Liu et Smith 2014). Des essais cliniques ont été effectués chez des patients atteints du FXS et ont révélé une

amélioration du phénotype (Al-Semaan et al 1999; Berry-Kravis et al. 2008). Cette molécule a aussi été testée sur des modèles murins du FXS et a induit une amélioration de phénotypes comportementaux (hyperactivité, troubles d'interaction sociale, anxiété) mais aussi sur les défauts de morphologie des épines dendritiques, sur la dérégulation de la voie de la synthèse protéique et des LTD (Liu et al. 2011; Liu et al. 2012; Mines et al. 2010, 3; Choi et al. 2011).

Une étude modélisant une duplication de *SHANK3* (retrouvée chez des patients atteints de TSA) sur modèle murin a démontré que la surexpression de ce gène entrainait un déséquilibre de la balance E/I en faveur de l'excitation (convulsions, EEG (Electroencéphalogrammes) anormaux montrant une hyperexcitabilité, une diminution de la fréquence des $GABA_A$-mIPSCs, et une augmentation des ESPCs spontanés) (Han et al. 2013). Des tests de molécules ont été effectués. Le lithium, ne donne aucun effet favorable, tandis que le valproate (sel de l'acide valproïque) permet d'améliorer certains comportements des souris et réduit les défauts observés sur les EEG. Ces résultats corrèlent avec le fait que le valproate augmente la neurotransmission GABAergique et que le lithium favorise l'excitabilité (Han et al. 2013). De plus, l'acide valproïque est administré pour le traitement des convulsions et de l'épilepsie. Il est aussi intéressant de rappeler que certaines études suggèrent un rôle de l'acide valproïque dans le développement des TSA (cf Introduction) (Christensen et al. 2013).

Nos collaborateurs d'I-Stem ont réalisé un criblage à haut débit de 202 molécules à propriétés diverses et testées sur les neurones issus d'iPSCs des patients porteurs des mutations *SHANK3* de notre étude. L'objectif principal de ce travail préliminaire (une seule concentration testée) était d'identifier une ou des molécule(s) capable(s) de restaurer les taux d'ARN de *SHANK3* diminués dans les neurones issus d'iPSCs (Darville et al. 2016). Parmi elles, 2 molécules se sont distinguées en induisant une tendance à

une augmentation des densités de protéines SHANK3 au niveau des synapses et de l'activité calcique : l'acide valproïque et le lithium.

Un traitement au lithium a été prescrit à la patiente G1271Afs*15 et a démontré une amélioration de son comportement social et après 30 mois de traitement, les résultats de cette patiente aux tests SRS et ADOS se sont améliorés. Cependant, une émergence de TDAH a été observée (Darville et al. 2016). Ceci peut être du à une dose trop forte induisant une augmentation élevée de l'expression de *SHANK3.* En effet, les TDAH se rapprochent des symptômes observés chez les deux patients porteurs d'une duplication de *SHANK3* et modélisés chez la souris (Han et al. 2013). Une autre étude a montré un effet positif d'un traitement au lithium chez deux patients atteints de TSA et porteurs d'une mutation induisant un codon stop au niveau de l'exon 21 de *SHANK3.* Le lithium a eu un effet bénéfique sur la régression, la catatonie et les troubles du comportement observés chez ces patients (Serret et al. 2015).

D'autres études effectuées sur des modèles iPSCs ont permet de révéler un effet positif de certaines molécules tel que l'IGF1 pour le syndrome de Phelan-McDermid (Shcheglovitov et al. 2013, 1) ou la gentamicine pour le Syndrome de Rett (Marchetto et al. 2010) (cf Introduction).

D'autres travaux se penchent actuellement sur le traitement des symptômes principaux des TSA. Les résultats à ce jour ne sont pas suffisamment concluant mais permettent tout de même des avancées. Parmi les essais cliniques effectués, un certain nombre d'équipes s'est intéressé aux effets de l'ocytocine et sur son usage potentiel pour un traitement des troubles sociaux. En effet, plusieurs études ont montré des effets d'amélioration des troubles sociaux caractérisés par une augmentation des interactions sociales et des contacts par le regard (« eye-contact ») mais aussi des comportements répétitifs (Andari et al. 2010; Auyeung et al. 2015; Guastella et al. 2010; Hollander et al.

2003). Cependant, d'autres travaux ne parviennent pas aux mêmes conclusions (Althaus et al. 2015; Guastella et al. 2015; Munesue et al. 2016). Les différences peuvent provenir des durées de traitements, des doses et des cohortes de patients traitées. Ces données permettent toutefois d'ouvrir certaines pistes de traitement par l'ocytocine. Il est aussi important de noter que la voie métabolique de l'ocytocine pourrait être altérée dans le développement des TSA, notamment par l'observation de concentrations plasmatiques réduites chez les patients (Modahl et al. 1998; Andari et al. 2010).

D'autres études s'intéressent aux molécules impactant sur la balance E/I. Parmi elles, des essais cliniques ont montré que des agonistes des récepteurs $GABA_B$ (ex : Arbaclofène) ont un effet sur l'irritabilité ainsi que sur les interactions sociales (Erickson et al. 2014; Frye 2014). En parallèle, des essais cliniques ont été réalisés avec des antagonistes des récepteurs glutamatergiques qui ont donné des résultats positifs sur les comportements stéréotypés, l'anxiété, les troubles du langage et l'hyperactivité (Jacquemont et al. 2011; Berry-Kravis et al. 2009). Un contrôle de l'équilibre E/I semble un axe de recherche thérapeutique prometteur. Cependant, la balance E/I est patient-dépendante et doit être finement contrôlée au risque d'une surcompensation de cet équilibre.

Les avancées pharmacologiques sont primordiales, et demandent la considération de toutes formes d'études. Le modèle iPSCs permet d'offrir le moyen de tester un panel de molécules de façon plus immédiate pouvant améliorer les symptômes des patients atteints de TSA. En regard des autres études, les neurones dérivés d'iPSCs pourraient permettre de tester les effets des molécules présentées ci-dessus afin de visualiser si elles permettent de réverser des phénotypes cellulaires.

Choix précis des conditions expérimentales

Au sein de ce projet nous avons limité les risques d'hétérogénétité de croissance, de densité et de maturation en étudiant d'une part des patients présentant le même phénotype clinique (tous sont des patients atteints de TSA sévèrement atteints avec un retard mental) et le même type de mutation (toutes sont des mutations *de novo* au sein de l'exon 21 de *SHANK3).*

Cet aspect est d'autant plus crucial, que même lorsque les cellules proviennent d'individus avec des génotypes et phénotypes similaires, certaines de leurs caractéristiques phénotypiques peuvent varier. C'est ce que l'on observe au sein de nos cellules lors de l'analyse de la morphologie des épines, avec cette distribution présentant des divergences au niveau des types de protusions entre le patient Q1271Afs*15 et les deux autres patients. Cette hétérogénéité au sein de patients aux caractérisques cliniques communes est à prendre en considération, et pourrait être associée à des différences de contexte génétique et épigénétiques/environnementales.

Un autre aspect important a été de fixer un stade de différenciation adapté. En effet, l'expression des protéines synaptiques varie au cours des stades de maturation des neurones et peut directement influencer la synaptogénèse. Les études morphologiques et fonctionnelles ont été réalisées à un même stade de différenciation et sur plusieurs cultures. Par rapport aux paramètres étudiés, nous n'avons pas observé de différence significative de maturation des épines d'une part entre différentes cultures ($n \geq 2$) et d'autre part entre individus de même génotype au sein d'une même culture. Il est à noter que les analyses morphologiques ont été effectuées à partir de cultures présentant des densités équivalentes de cellules. En effet, la densité du réseau neuronal pourrait influencer finement les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des neurones.

Nous avons pour objectif de compléter nos analyses en augmentant le nombre de neurones par paramètre étudié. Enfin, un stade de maturation intermédiaire tel que celui retenu permet de mettre plus facilement en évidence des différences de morphologies dendritiques.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons obtenu des neurones corticaux glutamatergiques fonctionnels. Nous avons ainsi pu caractériser et analyser des différences entre des neurones issus de patients TSA, porteur d'une mutation *SHANK3*, et des individus sains. Nous avons détecté des variations au niveau de la densité et de la morphologie des épines, ainsi qu'au niveau de l'activité calcique. Ceci permet de montrer qu'une mutation de ce gène à l'état hétérozygote entraîne des altérations de synaptogénèse et de maturation qui se reflètent ensuite dans la fonctionnalité neuronale. Notre étude confirme des études précédentes montrant que la synaptogénèse et d'autres fonctions liées à la signalisation cellulaire et moléculaire au sein de cellules neuronales adultes sont étroitement liées, peuvent intervenir dans la connectivité neuronale. D'autres études ont démontré une coordination transcriptionnelle entre la synaptogénèse et la signalisation par neurotransmetteurs, et que ceci peut être influencé par l'activité neuronale (Kratsios et al. 2015; Greer et Greenberg 2008). Nous n'avons pas testé l'existence d'une action coordonnée sur des évènements transcriptionels mais cette hypothèse serait à tester. Dans, cette optique, il

serait important d'étudier d'autres interacteurs synaptiques de SHANK3 au niveau transcriptionnel et protéique.

Perspectives directes

Tout d'abord, dans le cadre de notre étude, la poursuite des analyses électrophysiologiques est une priorité pour compléter nos données sur l'activité fonctionnelle des neurones dérivés d'iPSCs (coll ; Dr David DiGregorio).

Ensuite, une des perspectives consiste en des greffes des neurones au sein du cortex de souris au stade néonatal. Cette approche va permettre d'étudier la connectivité des neurones en cas de mutation *SHANK3*, mais aussi leur survie dans des conditions *in vivo,* leur migration, leur maturation et leur projections corticales et régionales ainsi que leur fonctionnalité. Ce travail sera effectué en collaboration avec le laboratoire du Dr Uwe Maskos qui a récemment effectué avec succès des greffes de neurones humains au sein de cortex de souris. Il a été montré que des tissus corticaux embryonnaires de souris greffés au sein du cortex ont la capacité de se développer. Ces neurones mettent en place des projections et développent un profil de neurones corticaux matures (Ballout et al. 2016). Des études précédentes ont consisté en la greffe de neurones corticaux dérivés de mESCs et hESCs au sein de cortex de souris (Espuny-Camacho et al. 2013; Michelsen et al. 2015). Ces études ont montré que les neurones greffés s'intègrent correctement dans les circuits neuronaux chez la souris et sont fonctionnels. L'étude du devenir de cellules dérivées *in vivo* et de leur connectivité avec les cellules avoisinantes offre la possibilité très intéressante de modéliser des maladies neuronales dans lesquelles des défauts de connectivité ont été proposés. Ce projet est de ce fait particulièrement intéressant au regard des hypothèses émises sur les défauts de connectivité chez les

patients atteints de TSA (cf Introduction). De plus, cette approche permettra d'étudier des potentiels effets de molécules pharmacologiques, capables de franchir la barrière hémato-encéphalique (comme attendu pour un traitement chez l'homme). Elle permettra également d'analyser *in vivo* la balance E/I, qui semble être perturbée chez les patients TSA, et en particulier chez les patients porteurs de mutations SHANK3.

En plus de permettre l'étude *in vivo* de cellules dérivées d'iPSCs, la greffe ouvre une porte avec l'espoir d'une médecine régénérative. Cet aspect ne fait pas partie de nos perspectives à court terme, mais est un point important à considérer pour le futur. En effet, l'une des applications attendues du modèle iPSCs est la possibilité de faire avancer la médecine régénérative, par transplantation de cellules ne présentant pas la mutation dans le but de réduire les conséquences des cellules mutées du patient et de réverser, ou au moins réduire, le phénotype. Les avancées dans le développement de protocoles au sein desquels certains aspects négatifs ont été supprimés (par exemple élimination les risques oncogènes) permettent d'envisager et de progresser dans cette application. Il est important de choisir un protocole adéquat pour une éventuelle transplantation (pas de vecteurs intégratifs, un milieu de culture « xeno-free », c'est-à-dire ne contenant pas de composants provenant d'une autre espèce) et de s'assurer de la survie et de l'intégration de ces neurones *in vivo*. Les études sur modèles murins effectuées en amont sont donc indispensables pour le développement des ces espoirs thérapeutiques.

Plusieurs études s'intéressant à la maladie de Parkinson (PM) ont permis d'importantes avancées. Tout d'abord, il a été montré que des allo-greffes de cellules fœtales au sein de cerveau de patients atteints de PM pouvaient survivre jusque 18 ans (Hallett et al. 2014; Kefalopoulou et al. 2014; Mendez et al. 2008). Une étude particulièrement intéressante (Hallett et al. 2015) a effectué une transplantation autologue de neurones dopaminergiques issus d'iPSCs au sein de cerveaux de trois primates non-humains. Il a

été observé que la transplantation induisait chez un de ces animaux une amélioration du fonctionnement et de l'activité motrice. Cependant, ces résultats ne sont pas observés chez les deux autres animaux, ce qui pourrait être expliqué par un faible taux de survie des cellules transplantées chez ces deux primates. Cette étude montre donc que la transplantation de neurones peut réverser un phénotype mais que les taux de réussite varient selon les cas. Ces expérimentations sont très lourdes et éthiquement difficiles à multiplier avec ce type de modèle. Les travaux effectués sur la maladie de Parkinson montrent toutefois des résultats très encourageants sur l'usage de cellules pluripotentes. Ils démontrent également la nécessité de prendre en compte un certain nombres de facteurs et que les transplantations ne peuvent être des traitements de routine (Gaillard et Jaber 2011).

En ce qui concerne les TSA causés par une mutation de *SHANK3*, l'étude de Mei et al. exposée en introduction a démontré qu'une restauration de ce gène permettait de reverser des phénotypes sur le modèle murin (Mei et al. 2016). Ceci montre une possibilité de régénération par greffe de neurones ne présentant pas la mutation. Des expérimentations de greffes sur modèle animal invalidé pour le gène *SHANK3* de neurones corticaux issus d'iPSCs d'individus sains permettraient d'étudier cet aspect.

<u>Perspectives à long terme</u>

Contrôles et suppression/insertion de mutations

En parallèle, nous pourrions obtenir d'autres lignées de contrôles :

- De plusieurs individus sains issus de la famille du patient étudié. Ces membres de la même famille ne présenteront pas un « background » génétique et

épigénétique strictement identique à celui du patient, mais présenteront tout de même des similitudes prononcées.

- Des contrôles isogéniques par la technique Crispr/Cas9 réparation de la mutation au sein des cellules du patient même. Ce serait des contrôles idéaux permettant la comparaison de cellules quasiment identiques et ne différant que par la présence ou l'absence de la mutation. Ces techniques sont basées sur le fait que des cassures double brin de l'ADN vont induire l'activité du système endogène de réparation de l'ADN. En ciblant les positions de ces cassures, il est donc possible d'induire les modifications génétiques voulues.

Cultures en 3D

Les cellules dérivées d'iPSCs permettent de se rapprocher d'une représentation assez similaire des cellules des patients. Cependant la croissance en 2D ne correspond pas à la situation *in vivo* étant donné qu'au sein des organismes les organes et cellules se développent en 3D. Lors de cultures en 2D, les contacts entre cellules, les forces mécaniques et les orientations des cellules sont limitées. Les interactions et migrations cellulaires sont importantes dans le développement de tissus, et particulièrement dans le développement cortical. Ceci peut avoir des conséquences sur la différentiation et la fonctionnalité des cellules. Des protocoles de culture 3D ont permis le développement de structures appelées « organoïdes » qui reproduisent la formation des organes (Huch et Koo 2015). Ces organoïdes présentent une diversité de types cellulaires, ce qui est plus représentatif du développement humain.

Une très récente étude (Mariani et al. 2015) a permis l'obtention d'organoïdes à partir d'iPSCs de membres de quatre familles présentant un membre atteint de TSA. Ces organoïdes présentent des couches organisées contenant des cellules gliales radiaires,

des progéniteurs intermédiaires et des neurones. En comparant les cellules des patients et des membres non atteints de leurs familles, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la différentiation neuronale et la formation de synapses est observée. Et en effet, les cellules des patients présentent une diminution de la durée du cycle cellulaire ainsi qu'une augmentation du nombre de neurites et de synapses, et plus précisément du nombre de synapses inhibitrices (GABA).

Dérivation en autres types neuronaux

De même, il serait intéressant de dériver et étudier des neurones issus de patients porteurs de mutations au sein des autres gènes de la famille SHANK. Un autre aspect qui serait pertinent d'étudier consisterait en l'étude de neurones glutamatergiques d'autres régions du cerveau, en effet SHANK3 est exprimé dans différentes régions au sein desquelles son expression (et celle des isoformes peut varier). Des études ont démontré que des altérations du cortex étaient détectées chez les patients atteints de TSA (Casanova et al. 2002; Casanova et al. 2010; Buxhoeveden et al. 2006) mais aussi d'autres régions telles que le cervelet (Wang et al. 2014; Courchesne et al., 1994) et l'amygdale (Schumann et al. 2004). Enfin, nous nous sommes intéressés à des neurones glutamatergiques prenant en compte l'expression de SHANK3 au sein de ces neurones, cependant il serait aussi pertinant d'étudier la balance E/I et donc l'activité électrophysiologique de neurones GABAergiques. Les neurones GABAergiques jouent un rôle important au cours de la maturation des neurones. Ils sont inhibiteurs chez l'adulte mais excitateurs au cours du développement embryonnaire humain. Des patients

porteurs de mutations au sein d'autres gènes peuvent être étudiés pour cela, telles que des mutations au niveau des neuroligines qui sont exprimées à la fois dans les neurones glutamatergiques et GABAergiques. Des études ont démontré un rôle des NLGN dans le recrutement de récepteurs $GABA_A$ et qu'un défaut au niveau de ces protéines induisaient une diminution l'activité GABAergique. Ces protéines jouent donc un rôle sur la balance excitation/inhibition (Tu et al. 2015; Poulopoulos et al. 2009; Varoqueaux et al. 2006).

L'ensemble des études et des informations traitant des TSA expose une grande complexité de ces troubles, tant par les facteurs pouvant causer leur développement, que par les voies moléculaires impliquées, les phénotypes observés et les traitements possibles. Afin de comprendre au mieux ces troubles, il est donc nécessaire de les étudier en combinant une globalité d'approches, à travers plusieurs modèles d'études ainsi que divers types d'analyses. Les TSA sont complexes et méritent un regard à la fois large et précis pour les décoder.

« No two people with autism are the same: its precise form or expression is different in every case. Moreover, there may be a most intricate (and potentially creative) interaction between the autistic traits and the other qualities of the individual. So, while a single glance may suffice for clinical diag- nosis, if we hope to understand the autistic individual, nothing less than a total biography will do. »

REFERENCES

Akum, B. F., Chen, M., Gunderson, S. I., Riefler, G. M., Scerri-Hansen, M. M., & Firestein, B. L. (2004). Cypin regulates dendrite patterning in hippocampal neurons by promoting microtubule assembly. *Nature Neuroscience*, *7*(2), 145-152. http://doi.org/10.1038/nn1179

Alarcón, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., … Geschwind, D. H. (2008). Linkage, Association, and Gene-Expression Analyses Identify CNTNAP2 as an Autism-Susceptibility Gene. *The American Journal of Human Genetics*, *82*(1), 150-159. http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.005

Al-Semaan, Y., Malla, A. K., & Lazosky, A. (1999). Schizoaffective disorder in a fragile-X carrier. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, *33*(3), 436-440.

Althaus, M., Groen, Y., Wijers, A. A., Noltes, H., Tucha, O., & Hoekstra, P. J. (2015). Oxytocin enhances orienting to social information in a selective group of high-functioning male adults with autism spectrum disorder. *Neuropsychologia*, *79*, 53-69. http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2015.10.025

American Psychiatric Association. (1980). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd edition (DSM-III). *American Psychiatric Association*.

American Psychiatric Association. (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV). *American Psychiatric Association*.

American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic an Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition (DSM-V). *American Psychiatric Association*.

Ananiev, G., Williams, E. C., Li, H., & Chang, Q. (2011). Isogenic Pairs of Wild Type and Mutant Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Lines from Rett Syndrome Patients as In Vitro Disease Model. *PLoS ONE*, *6*(9), e25255. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025255

Andari, E., Duhamel, J.-R., Zalla, T., Herbrecht, E., Leboyer, M., & Sirigu, A. (2010). Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(9), 4389-4394. http://doi.org/10.1073/pnas.0910249107

Aoto, J., Martinelli, D. C., Malenka, R. C., Tabuchi, K., & Südhof, T. C. (2013). Presynaptic Neurexin-3 Alternative Splicing trans-Synaptically Controls Postsynaptic AMPA Receptor Trafficking. *Cell*, *154*(1), 75-88. http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.060

Armstrong, D., Dunn, J. K., Antalffy, B., & Trivedi, R. (1995). Selective Dendritic

Alterations in the Cortex of Rett Syndrome. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *54*(2), 195-201. http://doi.org/10.1097/00005072-199503000-00006

Auyeung, B., Lombardo, M. V., Heinrichs, M., Chakrabarti, B., Sule, A., Deakin, J. B., … Baron-Cohen, S. (2015). Oxytocin increases eye contact during a real-time, naturalistic social interaction in males with and without autism. *Translational Psychiatry*, *5*(2), e507. http://doi.org/10.1038/tp.2014.146

Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuszda, E., & Rutter, E. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med.*, *25(1):63-77*.

Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. (2015). Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(7), a021758. http://doi.org/10.1101/cshperspect.a021758

Baird, G., Simonoff, E., Pickles, A., Chandler, S., Loucas, T., Meldrum, D., & Charman, T. (2006). Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). *The Lancet*, *368*(9531), 210-215. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69041-7

Baker, E. K., & Richdale, A. L. (2015). Sleep Patterns in Adults with a Diagnosis of High-Functioning Autism Spectrum Disorder. *SLEEP*, *38*(11), 1765-1774. http://doi.org/10.5665/sleep.5160

Ballout, N., Frappé, I., Péron, S., Jaber, M., Zibara, K., & Gaillard, A. (2016). Development and Maturation of Embryonic Cortical Neurons Grafted into the Damaged Adult Motor Cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, *10*. http://doi.org/10.3389/fncir.2016.00055

Barger, B. D., Campbell, J. M., & McDonough, J. D. (2013). Prevalence and Onset of Regression within Autism Spectrum Disorders: A Meta-analytic Review. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *43*(4), 817-828. http://doi.org/10.1007/s10803-012-1621-x

Barnby, G., Abbott, A., Sykes, N., Morris, A., Weeks, D. E., Mott, R., … Monaco, A. P. (2005). Candidate-Gene Screening and Association Analysis at the Autism-Susceptibility Locus on Chromosome 16p: Evidence of Association at GRIN2A and ABAT. *The American Journal of Human Genetics*, *76*(6), 950-966. http://doi.org/10.1086/430454

Baron-Cohen, S., & Wheelwright, S. (2004a). The empathy quotient: an investigation of adults with Asperger syndrome or high functioning autism, and normal sex differences. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *34(2):163-75*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/15162935

Baron-Cohen, S., & Wheelwright, S. (2004b). The empathy quotient: an investigation of adults with Asperger syndrome or high functionning autism, and normal sex differences. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *34(2):163-75*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7265736f6c7665722e656273636f686f73742e636f6d$$/openurl?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:15162935

Baron-Cohen, S., Wheelwright, S., Skinner, R., Martin, J., & Clubley, E. (2001). The autism-spectrum quotient (AQ): evidence from Asperger syndrome/high-funstionning autism, males and females, scientists and mathematicians. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *31(1):5-17*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7265736f6c7665722e656273636f686f73742e636f6d$$/openurl?sid=Entrez%3aPubMed&id=pmid%3a11439754&site=ftf-live

Belichenko, P., Oldfors, A., Hagberg, B., & Dahlström, A. (1994). Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport.*, *21;5(12):1509-13*.

Belichenko, P. V., Wright, E. E., Belichenko, N. P., Masliah, E., Li, H. H., Mobley, W. C., & Francke, U. (2009). Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of rett syndrome: Evidence for disruption of neuronal networks. *The Journal of Comparative Neurology*, *514*(3), 240-258. http://doi.org/10.1002/cne.22009

Bell, M., Hirst, M., Nakahori, Y., MacKinnon, R., Roche, A., Flint, T., … et al. (1991). Physical mapping across the fragile X: Hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell*, *64(4):861-6*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e736369656e6365469726563742e636f6d$$/science/article/pii/009286749190514Y

Belmonte, M. K., Allen, G., Beckel-Mitchener, A., Boulanger, L., Carper, R., & Webb, S. (2004). Autism and Abnormal Development of Brain Connectivity. *Journal of Neuroscience*, *24*(42), 9228-9231. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3340-04.2004

Benarroch, E. E. (2013). HCN channels: Function and clinical implications. *Neurology*, *80*(3), 304-310. http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827dec42

Benavides-Piccione, R., Fernaud-Espinosa, I., Robles, V., Yuste, R., & DeFelipe, J. (2013). Age-Based Comparison of Human Dendritic Spine Structure Using Complete Three-Dimensional Reconstructions. *Cerebral Cortex*, *23*(8), 1798-1810. http://doi.org/10.1093/cercor/bhs154

Ben-David, E., & Shifman, S. (2012). Networks of Neuronal Genes Affected by Common and Rare Variants in Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genetics*, *8*(3), e1002556. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002556

Ben-David, E., & Shifman, S. (2013). Combined analysis of exome sequencing points toward a major role for transcription regulation during brain development in autism. *Molecular Psychiatry*, *18*(10), 1054-1056. http://doi.org/10.1038/mp.2012.148

Benthani, F., Tran, P., Currey, N., Ng, I., Giry-Laterriere, M., Carey, L., … Pangon, L. (2015). Proteogenomic Analysis Identifies a Novel Human SHANK3 Isoform. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(5), 11522-11530. http://doi.org/10.3390/ijms160511522

Beri, S., Tonna, N., Menozzi, G., Bonaglia, M. C., Sala, C., & Giorda, R. (2007). DNA methylation regulates tissue-specific expression of Shank3. *Journal of Neurochemistry*, *101*(5), 1380-1391. http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04539.x

Berkel, S., Marshall, C. R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., … Rappold, G. A. (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature Genetics*, *42*(6), 489-491. http://doi.org/10.1038/ng.589

Berridge, M., Lipp, P., & Bootman, M. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1(1):11-21*.

Berry-Kravis, E., Hessl, D., Coffey, S., Hervey, C., Schneider, A., Yuhas, J., … Hagerman, R. (2009). A pilot open label, single dose trial of fenobam in adults with fragile X

syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *46*(4), 266-271. http://doi.org/10.1136/jmg.2008.063701

Berry-Kravis, E., Sumis, A., Hervey, C., Nelson, M., Porges, S. W., Weng, N., … Greenough, W. T. (2008). Open-Label Treatment Trial of Lithium to Target the Underlying Defect in Fragile X Syndrome: *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, *29*(4), 293-302. http://doi.org/10.1097/DBP.0b013e31817dc447

Bertone, A., Mottron, L., Jelenic, P., & Faubert, J. (2005). Enhanced and diminished visuo-spatial information processing in autism depends on stimulus complexity. *Brain*, *128*(10), 2430-2441. http://doi.org/10.1093/brain/awh561

Bhakar, A. L., Dölen, G., & Bear, M. F. (2012). The Pathophysiology of Fragile X (and What It Teaches Us about Synapses). *Annual Review of Neuroscience*, *35*(1), 417-443. http://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153138

Blatt, G. J., & Fatemi, S. H. (2011). Alterations in GABAergic Biomarkers in the Autism Brain: Research Findings and Clinical Implications. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, *294*(10), 1646-1652. http://doi.org/10.1002/ar.21252

Blau, H. M., Chiu, C.-P., & Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, *32*(4), 1171-1180. http://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90300-8

Blundell, J., Blaiss, C. A., Etherton, M. R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., … Powell, C. M. (2010). Neuroligin-1 Deletion Results in Impaired Spatial Memory and Increased Repetitive Behavior. *Journal of Neuroscience*, *30*(6), 2115-2129. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4517-09.2010

Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., … Meissner, A. (2011). Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell*, *144*(3), 439-452. http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.032

Bockers, T. M., Mameza, M. G., Kreutz, M. R., Bockmann, J., Weise, C., Buck, F., … Kreienkamp, H.-J. (2001). Synaptic Scaffolding Proteins in Rat Brain: ANKYRIN REPEATS OF THE MULTIDOMAIN Shank PROTEIN FAMILY INTERACT WITH THE CYTOSKELETAL PROTEIN -FODRIN. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(43), 40104-40112. http://doi.org/10.1074/jbc.M102454200

Böckers, T. M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E. D., Kreutz, M.

R., … Kreienkamp, H.-J. (2004). Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3′ untranslated region of Shank1 mRNA. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *26*(1), 182-190. http://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.01.009

Boeckers, T. M., Bockmann, J., Kreutz, M. R., & Gundelfinger, E. D. (2002). ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease: Role of ProSAP/Shank in PSD organization. *Journal of Neurochemistry*, *81*(5), 903-910. http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00931.x

Boeckers, T. M., Liedtke, T., Spilker, C., Dresbach, T., Bockmann, J., Kreutz, M. R., & Gundelfinger, E. D. (2005). C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3. *Journal of Neurochemistry*, *92*(3), 519-524. http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02910.x

Boeckers, T. M., Winter, C., Smalla, K.-H., Kreutz, M. R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., … Gundelfinger, E. D. (1999). Proline-Rich Synapse-Associated Proteins ProSAP1 and ProSAP2 Interact with Synaptic Proteins of the SAPAP/GKAP Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *264*(1), 247-252. http://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1489

Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., Delorme, R., … Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Translational Psychiatry*, *3*(8), e294. http://doi.org/10.1038/tp.2013.71

Bonaglia, M. C., Giorda, R., Borgatti, R., Felisari, G., Gagliardi, C., Selicorni, A., & Zuffardi, O. (2001). Disruption of the ProSAP2 Gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) Is Associated with the 22q13.3 Deletion Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, *69*(2), 261-268. http://doi.org/10.1086/321293

Bonaglia, M. C., Giorda, R., Mani, E., Aceti, G., Anderlid, B.-M., Baroncini, A., … Zuffardi, O. (2006). Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *43*(10), 822-828. http://doi.org/10.1136/jmg.2005.038604

Bonati, M. T., Russo, S., Finelli, P., Valsecchi, M. R., Cogliati, F., Cavalleri, F., … Larizza, L.

(2007). Evaluation of autism traits in Angelman syndrome: a resource to unfold autism genes. *Neurogenetics*, *8*(3), 169-178. http://doi.org/10.1007/s10048-007-0086-0

Bourgeois, J.-P. (2008). Synaptogenèses normales, pathologiques et amendables dans le cortex cérébral. *PSN*, *6*(3), 124-136. http://doi.org/10.1007/s11836-008-0065-z

Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(9), 551-563. http://doi.org/10.1038/nrn3992

Bourgeron, T. (2016). Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *Comptes Rendus Biologies*, *339*(7-8), 300-307. http://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.05.004

Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D. L., Takahashi, N., … Buxbaum, J. D. (2010). Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular Autism*, *1*(1), 15. http://doi.org/10.1186/2040-2392-1-15

Brennand, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., … Gage, F. H. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, *473*(7346), 221-225. http://doi.org/10.1038/nature09915

Bringas, M. E., Carvajal-Flores, F. N., López-Ramírez, T. A., Atzori, M., & Flores, G. (2013). Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. *Neuroscience*, *241*, 170-187. http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.030

Brugha, T. S., McManus, S., Bankart, J., Scott, F., Purdon, S., Smith, J., … Meltzer, H. (2011). Epidemiology of Autism Spectrum Disorders in Adults in the Community in England. *Archives of General Psychiatry*, *68*(5), 459. http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.38

Buganim, Y., Faddah, D. A., Cheng, A. W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., … Jaenisch, R. (2012). Single-Cell Expression Analyses during Cellular Reprogramming Reveal an Early Stochastic and a Late Hierarchic Phase. *Cell*, *150*(6), 1209-1222. http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.023

Bukelis, I., Porter, F. D., Zimmerman, A. W., & Tierney, E. (2007). Smith-Lemli-Opitz Syndrome and Autism Spectrum Disorder. *American Journal of Psychiatry*,

164(11), 1655-1661. http://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.07020315

Buxhoeveden, D. P., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Schenker, N., Switzer, R., & Courchesne, E. (2006). Reduced minicolumns in the frontal cortex of patients with autism. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *32*(5), 483-491. http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00745.x

Carbonetto, S. (2014). A blueprint for research on Shankopathies: A view from research on autism spectrum disorder: A Blueprint for Research on Shank3 and Autism. *Developmental Neurobiology*, *74*(2), 85-112. http://doi.org/10.1002/dneu.22150

Carper, R. A., & Courchesne, E. (2005). Localized enlargement of the frontal cortex in early autism. *Biological Psychiatry*, *57*(2), 126-133. http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.005

Casanova, M., Buxhoeveden, D., & Brown, C. (2002). Clinical and macroscopic correlates of minicolumnar pathology in autism. *Journal of Child Neurology*, *17(9):692-5*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/12503647

Casanova, M., Buxhoeveden, D., Switala, A., & Roy, E. (2002). Minicolumnar pathology in autism. Consulté 18 septembre 2016, à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/11839843

Casanova, M. F., El-Baz, A., Vanbogaert, E., Narahari, P., & Switala, A. (2010). A Topographic Study of Minicolumnar Core Width by Lamina Comparison between Autistic Subjects and Controls: Possible Minicolumnar Disruption due to an Anatomical Element In-Common to Multiple Laminae. *Brain Pathology*, *20*(2), 451-458. http://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00319.x

Casanova, M. F., van Kooten, I. A. J., Switala, A. E., van Engeland, H., Heinsen, H., Steinbusch, H. W. M., … Schmitz, C. (2006). Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathologica*, *112*(3), 287-303. http://doi.org/10.1007/s00401-006-0085-5

Center for Disease Control and Prevention. (2012). Trends in the Prevalence of Developmental Disabilities in US Children, 1997-2008. *Available on the CDC website*.

Center for Disease Control and Prevention. (2015). Estimated Prevalence of Autism and

Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey. *Available on the CDC website*.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries.* Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-68747470733a2f2f7777772e6364632e676f76$$/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6302a1.htm

Chanda, S., Ang, C. E., Davila, J., Pak, C., Mall, M., Lee, Q. Y., … Wernig, M. (2014). Generation of Induced Neuronal Cells by the Single Reprogramming Factor ASCL1. *Stem Cell Reports*, *3*(2), 282-296. http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.020

Charych, E. I., Akum, B. F., Goldberg, J. S., Jornsten, R. J., Rongo, C., Zheng, J. Q., & Firestein, B. L. (2006). Activity-Independent Regulation of Dendrite Patterning by Postsynaptic Density Protein PSD-95. *Journal of Neuroscience*, *26*(40), 10164-10176. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2379-06.2006

Chaste, P., & Leboyer, M. (2012). Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *14*(3), 281.

Chazeau, A., & Giannone, G. (2016). Organization and dynamics of the actin cytoskeleton during dendritic spine morphological remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(16), 3053-3073. http://doi.org/10.1007/s00018-016-2214-1

Chen, H. M., DeLong, C. J., Bame, M., Rajapakse, I., Herron, T. J., McInnis, M. G., & O'Shea, K. S. (2014). Transcripts involved in calcium signaling and telencephalic neuronal fate are altered in induced pluripotent stem cells from bipolar disorder patients. *Translational Psychiatry*, *4*(3), e375. http://doi.org/10.1038/tp.2014.12

Chen, J. A., Peñagarikano, O., Belgard, T. G., Swarup, V., & Geschwind, D. H. (2015). The Emerging Picture of Autism Spectrum Disorder: Genetics and Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *10*(1), 111-144. http://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040405

Chen, J., Lin, M., Foxe, J. J., Pedrosa, E., Hrabovsky, A., Carroll, R., … Lachman, H. M. (2013). Transcriptome Comparison of Human Neurons Generated Using Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Dental Pulp and Skin Fibroblasts. *PLoS ONE*,

8(10), e75682. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0075682

Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., … Nicoll, R. A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*, *408*(6815), 936-943. http://doi.org/10.1038/35050030

Chen, M., Lucas, K., Akum, B., Balasingam, G., Stawicki, T., Provost, J., & et al. (2005). A Novel Role for Snapin in Dendrite Patterning: Interaction with Cypin. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(11), 5103-5114. http://doi.org/10.1091/mbc.E05-02-0165

Chen, S., Zhong, X., Jiang, L., Zheng, X., Xiong, Y., Ma, S., … Chen, Q. (2016). Maternal autoimmune diseases and the risk of autism spectrum disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis. *Behavioural Brain Research*, *296*, 61-69. http://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.035

Cheung, A. Y. L., Horvath, L. M., Grafodatskaya, D., Pasceri, P., Weksberg, R., Hotta, A., … Ellis, J. (2011). Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics*, *20*(11), 2103-2115. http://doi.org/10.1093/hmg/ddr093

Chien, Y.-L., Wu, Y.-Y., Chen, C.-H., Gau, S. S.-F., Huang, Y.-S., Chien, W.-H., … Chao, Y.-L. (2012). Association of HLA-DRB1 alleles and neuropsychological function in autism: *Psychiatric Genetics*, *22*(1), 46-49. http://doi.org/10.1097/YPG.0b013e32834915ae

Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., … Lowry, W. E. (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*, *5*(1), 111-123. http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.008

Ching, T.-T., Maunakea, A. K., Jun, P., Hong, C., Zardo, G., Pinkel, D., … Costello, J. F. (2005). Epigenome analyses using BAC microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3. *Nature Genetics*, *37*(6), 645-651. http://doi.org/10.1038/ng1563

Ch'ng, C., Kwok, W., Rogic, S., & Pavlidis, P. (2015). Meta-Analysis of Gene Expression in Autism Spectrum Disorder: Meta-analysis of gene expression in ASD. *Autism Research*, *8*(5), 593-608. http://doi.org/10.1002/aur.1475

Choi, C. H., Schoenfeld, B. P., Bell, A. J., Hinchey, P., Kollaros, M., Gertner, M. J., … McBride, S. M. J. (2011). Pharmacological reversal of synaptic plasticity deficits in the

mouse model of fragile X syndrome by group II mGluR antagonist or lithium treatment. *Brain Research*, *1380*, 106-119. http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.032

Christensen, J., Grønborg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*, *309*(16), 1696. http://doi.org/10.1001/jama.2013.2270

Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mullowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., … Barres, B. A. (2005). Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell*, *120*(3), 421-433. http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020

Chung, W.-S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(9), a020370. http://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370

Cochoy, D. M., Kolevzon, A., Kajiwara, Y., Schoen, M., Pascual-Lucas, M., Lurie, S., … Schmeisser, M. J. (2015). Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Molecular Autism*, *6*(1). http://doi.org/10.1186/s13229-015-0020-5

Coghlan, S., Horder, J., Inkster, B., Mendez, M. A., Murphy, D. G., & Nutt, D. J. (2012). GABA system dysfunction in autism and related disorders: From synapse to symptoms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*(9), 2044-2055. http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.005

Cohen, S., Conduit, R., Lockley, S. W., Rajaratnam, S. M., & Cornish, K. M. (2014). The relationship between sleep and behavior in autism spectrum disorder (ASD): a review. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *6*(1), 44. http://doi.org/10.1186/1866-1955-6-44

Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S. R., Woodhouse, E., … Bolton, P. (2015). Heritability of Autism Spectrum Disorder in a UK Population-Based Twin Sample. *JAMA Psychiatry*, *72*(5), 415. http://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.3028

Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: Maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of the United States of America, *94*(10), 5401.

Cooper, G. M., Coe, B. P., Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Vu, T. H., Baker, C., … Eichler, E. E. (2011). A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics*, *43*(9), 838-846. http://doi.org/10.1038/ng.909

Cotney, J., Muhle, R. A., Sanders, S. J., Liu, L., Willsey, A. J., Niu, W., … Noonan, J. P. (2015). The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nature Communications*, *6*, 6404. http://doi.org/10.1038/ncomms7404

Cottrell, C. E., Bir, N., Varga, E., Alvarez, C. E., Bouyain, S., Zernzach, R., … Herman, G. E. (2011). Contactin 4 as an autism susceptibility locus. *Autism Research*, *4*(3), 189-199. http://doi.org/10.1002/aur.184

Courchesne, E. (2002). Abnormal early brain development in autism. *Molecular Psychiatry*, *7*(s2), S21-S23. http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001169

Courchesne, E., Campbell, K., & Solso, S. (2011). Brain growth across the life span in autism: Age-specific changes in anatomical pathology. *Brain Research*, *1380*, 138-145. http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.101

Courchesne, E., Karns, C., Davis, H., Ziccardi, R., Carper, R., Tigue, Z., … et al. (2001). Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/?term=Unusual+brain+growth+patterns+in+early+life+in+patients+with+autistic+disorder%3A+an+MRI+study

Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., … Pierce, K. (2011). Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children With Autism. *JAMA*, *306*(18), 2001. http://doi.org/10.1001/jama.2011.1638

Courchesne, E., Saitoh, O., Yeung-Courchesne, R., Press, G., Lincoln, A., Haas, R., & Schreibman, L. (1994). Abnormality of cerebellar vermian lobules VI and VII in patients with infantile autism: identification of hypoplastic and hyperplastic subgroups with MR imaging. *American journal of roentgenology*, *162(1):123-30*.

Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., & Eggan, K. (2005). Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science*, *309*(5739), 1369-1373. http://doi.org/10.1126/science.1116447

Croen, L. A., Zerbo, O., Qian, Y., Massolo, M. L., Rich, S., Sidney, S., & Kripke, C. (2015). The health status of adults on the autism spectrum. *Autism*, *19*(7), 814-823. http://doi.org/10.1177/1362361315577517

Curatolo, P., Porfirio, M. C., Manzi, B., & Seri, S. (2004). Autism in tuberous sclerosis. *European Journal of Paediatric Neurology*, *8*(6), 327-332. http://doi.org/10.1016/j.ejpn.2004.08.005

Dahlhaus, R., Hines, R. M., Eadie, B. D., Kannangara, T. S., Hines, D. J., Brown, C. E., … El-Husseini, A. (2009). Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus. *Hippocampus*, *20*(2), 305-322. http://doi.org/10.1002/hipo.20630

Dallérac, G., & Rouach, N. (2016). Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. *Progress in Neurobiology*. http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.003

Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., … Darnell, R. B. (2011). FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. *Cell*, *146*(2), 247-261. http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.013

Darville, H., Poulet, A., Rodet-Amsellem, F., Chatrousse, L., Pernelle, J., Boissart, C., … Benchoua, A. (2016). Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome. *EBioMedicine*, *9*, 293-305. http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.032

David, L., & Polo, J. M. (2014). Phases of reprogramming. *Stem Cell Research*, *12*(3), 754-761. http://doi.org/10.1016/j.scr.2014.03.007

Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, *51*(6), 987-1000. http://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X

de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J. L., & Geschwind, D. H. (2016). Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature Medicine*, *22*(4), 345-361. http://doi.org/10.1038/nm.4071

De Vos, J., Bouckenheimer, J., Sansac, C., Lemaître, J.-M., & Assou, S. (2016). Human induced pluripotent stem cells: A disruptive innovation. *Current Research in*

Translational Medicine, *64*(2), 91-96. http://doi.org/10.1016/j.retram.2016.04.001

Denayer, A., Van Esch, H., de Ravel, T., Frijns, J.-P., Van Buggenhout, G., Vogels, A., … Swillen, A. (2012). Neuropsychopathology in 7 Patients with the 22q13 Deletion Syndrome: Presence of Bipolar Disorder and Progressive Loss of Skills. *Molecular Syndromology*. http://doi.org/10.1159/000339119

DeStefano, F., Price, C. S., & Weintraub, E. S. (2013). Increasing Exposure to Antibody-Stimulating Proteins and Polysaccharides in Vaccines Is Not Associated with Risk of Autism. *The Journal of Pediatrics*, *163*(2), 561-567. http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.02.001

Devlin, B., & Scherer, S. W. (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Genetics & Development*, *22*(3), 229-237. http://doi.org/10.1016/j.gde.2012.03.002

Dinan, T. G., Stilling, R. M., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2015). Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. *Journal of Psychiatric Research*, *63*, 1-9. http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.02.021

Doers, M. E., Musser, M. T., Nichol, R., Berndt, E. R., Baker, M., Gomez, T. M., … Bhattacharyya, A. (2014). iPSC-Derived Forebrain Neurons from FXS Individuals Show Defects in Initial Neurite Outgrowth. *Stem Cells and Development*, *23*(15), 1777-1787. http://doi.org/10.1089/scd.2014.0030

Du, Y., Weed, S. A., Xiong, W.-C., Marshall, T. D., & Parsons, J. T. (1998). Identification of a Novel Cortactin SH3 Domain-Binding Protein and Its Localization to Growth Cones of Cultured Neurons. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(10), 5838.

Duffney, L. J., Wei, J., Cheng, J., Liu, W., Smith, K. R., Kittler, J. T., & Yan, Z. (2013). Shank3 Deficiency Induces NMDA Receptor Hypofunction via an Actin-Dependent Mechanism. *Journal of Neuroscience*, *33*(40), 15767-15778. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1175-13.2013

Duffney, L. J., Zhong, P., Wei, J., Matas, E., Cheng, J., Qin, L., … Yan, Z. (2015). Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Reports*, *11*(9), 1400-1413. http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.064

Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., … Bourgeron, T. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genetics*,

39(1), 25. http://doi.org/10.1038/ng1933

Durand, C. M., Perroy, J., Loll, F., Perrais, D., Fagni, L., Bourgeron, T., … Sans, N. (2012). SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Molecular Psychiatry*, *17*(1), 71-84. http://doi.org/10.1038/mp.2011.57

Ecker, C., Andrews, D., Dell'Acqua, F., Daly, E., Murphy, C., Catani, M., … Murphy, D. G. M. (2016). Relationship Between Cortical Gyrification, White Matter Connectivity, and Autism Spectrum Disorder. *Cerebral Cortex*, *26*(7), 3297-3309. http://doi.org/10.1093/cercor/bhw098

Egli, D., Chen, A. E., Saphier, G., Ichida, J., Fitzgerald, C., Go, K. J., … Eggan, K. (2011). Reprogramming within hours following nuclear transfer into mouse but not human zygotes. *Nature Communications*, *2*, 488. http://doi.org/10.1038/ncomms1503

Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience*, *6*(3), 231-242. http://doi.org/10.1038/nn1013

Eisenberg, L., & Kanner, L. (1956). Childhood schizophrenia: Symposium, 1955: 6. Early infantile autism, 1943–55. *American Journal of Orthopsychiatry*, *26*(3), 556-566. http://doi.org/10.1111/j.1939-0025.1956.tb06202.x

El Achkar, C. M., & Spence, S. J. (2015). Clinical characteristics of children and young adults with co-occurring autism spectrum disorder and epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, *47*, 183-190. http://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.12.022

El-Husseini, A. E.-D., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A., & Bredt, D. S. (2000). PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. *Science*, *290*(5495), 1364-1368. http://doi.org/10.1126/science.290.5495.1364

Engert, F., & Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, *399(6731):66-70*.

Erickson, C. A., Veenstra-Vanderweele, J. M., Melmed, R. D., McCracken, J. T., Ginsberg, L. D., Sikich, L., … King, B. H. (2014). STX209 (Arbaclofen) for Autism Spectrum Disorders: An 8-Week Open-Label Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *44*(4), 958-964. http://doi.org/10.1007/s10803-013-1963-z

Espuny-Camacho, I., Michelsen, K. A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., … Vanderhaeghen, P. (2013). Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent

Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron*, *77*(3), 440-456. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.011

Ethell, I. M., & Pasquale, E. B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in Neurobiology*, *75*(3), 161-205. http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.003

Etherton, M. R., Tabuchi, K., Sharma, M., Ko, J., & Südhof, T. C. (2011). An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus: Autism-associated neuroligin mutation. *The EMBO Journal*, *30*(14), 2908-2919. http://doi.org/10.1038/emboj.2011.182

Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154-156. http://doi.org/10.1038/292154a0

Feinberg, J. I., Bakulski, K. M., Jaffe, A. E., Tryggvadottir, R., Brown, S. C., Goldman, L. R., … Feinberg, A. P. (2015). Paternal sperm DNA methylation associated with early signs of autism risk in an autism-enriched cohort. *International Journal of Epidemiology*, *44*(4), 1199-1210. http://doi.org/10.1093/ije/dyv028

Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., … Sommer, S. S. (2006). High frequency of neurexin 1β signal peptide structural variants in patients with autism. *Neuroscience Letters*, *409*(1), 10-13. http://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.017

Fields, R. D. (2002). New Insights into Neuron-Glia Communication. *Science*, *298*(5593), 556-562. http://doi.org/10.1126/science.298.5593.556

Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., Brinkhaus, H., & Matus, A. (2000). Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature Neuroscience*, *3(9):887-94*.

Foa, L., Rajan, I., Haas, K., Wu, G., Brakeman, P., Worley, P., & Cline, H. (2001). The scaffold protein, Homer1b/c, regulates axon pathfinding in the central nervous system in vivo. *Nature Neuroscience*, *4(5):499-506*.

Folstein, S., & Rutter, M. (1977a). Genetic influences and infantile autism. *Nature*, *265*(5596), 726-728. http://doi.org/10.1038/265726a0

Folstein, S., & Rutter, M. (1977b). INFANTILE AUTISM: A GENETIC STUDY OF 21 TWIN PAIRS. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *18*(4), 297-321.

http://doi.org/10.1111/j.1469-7610.1977.tb00443.x

Fombonne, E. (2005). Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *Journal of clinical psychiatry*, *66 Suppl 10:3-8*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/16401144

Fombonne, E. (2009). Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders. *Pediatric Research*, *65*(6), 591-598. http://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203

Frazier, T. W., & Hardan, A. Y. (2009). A Meta-Analysis of the Corpus Callosum in Autism. *Biological Psychiatry*, *66*(10), 935-941. http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.07.022

Freitag, C. M., Staal, W., Klauck, S. M., Duketis, E., & Waltes, R. (2010). Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *European Child & Adolescent Psychiatry*, *19*(3), 169-178. http://doi.org/10.1007/s00787-009-0076-x

Friedman, H. V., Bresler, T., Garner, C. C., & Ziv, N. E. (2000). Assembly of New Individual Excitatory Synapses. *Neuron*, *27*(1), 57-69. http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00009-X

Frye, R. (2014). Clinical potential, safety, and tolerability of arbaclofen in the treatment of autism spectrum disorder. *Drug, Healthcare and Patient Safety*, 69. http://doi.org/10.2147/DHPS.S39595

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, *85*(8), 348-362. http://doi.org/10.2183/pjab.85.348

Gaillard, A., & Jaber, M. (2011). Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, *34*(3), 124-133. http://doi.org/10.1016/j.tins.2011.01.003

Gardener, H., Spiegelman, D., & Buka, S. L. (2009). Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry*, *195*(1), 7-14. http://doi.org/10.1192/bjp.bp.108.051672

Gardener, H., Spiegelman, D., & Buka, S. L. (2011). Perinatal and Neonatal Risk Factors for Autism: A Comprehensive Meta-analysis. *PEDIATRICS*, *128*(2), 344-355. http://doi.org/10.1542/peds.2010-1036

Garg, S., Lehtonen, A., Huson, S. M., Emsley, R., Trump, D., Evans, D. G., & Green, J. (2013). Autism and other psychiatric comorbidity in neurofibromatosis type 1: evidence from a population-based study: Autism and Other Psychiatric Comorbidity in NF1. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *55*(2), 139-145. http://doi.org/10.1111/dmcn.12043

Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., … Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, *46*(8), 881-885. http://doi.org/10.1038/ng.3039

Gauthier, J., Champagne, N., Lafrenière, R. G., Xiong, L., Spiegelman, D., Brustein, E., … the S2D Team. (2010). De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein *SHANK3* in patients ascertained for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(17), 7863-7868. http://doi.org/10.1073/pnas.0906232107

Gauthier, J., Siddiqui, T. J., Huashan, P., Yokomaku, D., Hamdan, F. F., Champagne, N., … Rouleau, G. A. (2011). Truncating mutations in NRXN2 and NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Human Genetics*, *130*(4), 563-573. http://doi.org/10.1007/s00439-011-0975-z

Gauthier, J., Spiegelman, D., Piton, A., Lafrenière, R. G., Laurent, S., St-Onge, J., … Rouleau, G. A. (2009). Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *150B*(3), 421-424. http://doi.org/10.1002/ajmg.b.30822

Geschwind, D. H., & State, M. W. (2015). Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine. *The Lancet Neurology*, *14*(11), 1109-1120. http://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00044-7

Ghosh, Z., Wilson, K. D., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T., & Wu, J. C. (2010). Persistent Donor Cell Gene Expression among Human Induced Pluripotent Stem Cells Contributes to Differences with Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, *5*(2), e8975. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008975

Gilman, S. R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., & Vitkup, D. (2011). Rare De Novo Variants Associated with Autism Implicate a Large Functional Network of Genes Involved in Formation and Function of Synapses. *Neuron*, *70*(5), 898-907. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.021

Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Coe, B. P., Parikh, S., Friedman, N., Goldstein, A., … Eichler, E.

E. (2012). Phenotypic Heterogeneity of Genomic Disorders and Rare Copy-Number Variants. *New England Journal of Medicine*, *367*(14), 1321-1331. http://doi.org/10.1056/NEJMoa1200395

Glasson, E. J., Bower, C., Petterson, B., de Klerk, N., Chaney, G., & Hallmayer, J. F. (2004). Perinatal Factors and the Development of Autism: A Population Study. *Archives of General Psychiatry*, *61*(6), 618. http://doi.org/10.1001/archpsyc.61.6.618

Goldani, A. A. S., Downs, S. R., Widjaja, F., Lawton, B., & Hendren, R. L. (2014). Biomarkers in Autism. *Frontiers in Psychiatry*, *5*. http://doi.org/10.3389/fpsyt.2014.00100

Goldson, E. (2016). Advances in Autism—2016. *Advances in Pediatrics*, *63*(1), 333-355. http://doi.org/10.1016/j.yapd.2016.04.014

Gray, E. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of Anatomy*, *93:420-33*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/?term=Gray+1959+(axo-somatic%E2%80%A6)

Greer, P. L., & Greenberg, M. E. (2008). From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function. *Neuron*, *59*(6), 846-860. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.002

Gregg, J. P., Lit, L., Baron, C. A., Hertz-Picciotto, I., Walker, W., Davis, R. A., … Sharp, F. R. (2008). Gene expression changes in children with autism. *Genomics*, *91*(1), 22-29. http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.09.003

Gregory, S. G., Connelly, J. J., Towers, A. J., Johnson, J., Biscocho, D., Markunas, C. A., … Pericak-Vance, M. A. (2009). Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Medicine*, *7*(1). http://doi.org/10.1186/1741-7015-7-62

Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, *73*(5), 862-885. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011

Griesi-Oliveira, K., Acab, A., Gupta, A. R., Sunaga, D. Y., Chailangkarn, T., Nicol, X., … Muotri, A. R. (2015). Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Molecular Psychiatry*, *20*(11), 1350-1365. http://doi.org/10.1038/mp.2014.141

Guastella, A. J., Einfeld, S. L., Gray, K. M., Rinehart, N. J., Tonge, B. J., Lambert, T. J., & Hickie, I. B. (2010). Intranasal Oxytocin Improves Emotion Recognition for Youth

with Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*, *67*(7), 692-694. http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.020

Guastella, A. J., Gray, K. M., Rinehart, N. J., Alvares, G. A., Tonge, B. J., Hickie, I. B., … Einfeld, S. L. (2015). The effects of a course of intranasal oxytocin on social behaviors in youth diagnosed with autism spectrum disorders: a randomized controlled trial. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *56*(4), 444-452. http://doi.org/10.1111/jcpp.12305

Guenther, M. G., Frampton, G. M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2010). Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *7*(2), 249-257. http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.015

Guilmatre, A., Dubourg, C., Mosca, A.-L., Legallic, S., Goldenberg, A., Drouin-Garraud, V., … Campion, D. (2009). Recurrent Rearrangements in Synaptic and Neurodevelopmental Genes and Shared Biologic Pathways in Schizophrenia, Autism, and Mental Retardation. *Archives of General Psychiatry*, *66*(9), 947. http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.80

Guilmatre, A., Huguet, G., Delorme, R., & Bourgeron, T. (2014). The emerging role of *SHANK* genes in neuropsychiatric disorders: SHANK Genes in Neuropsychiatric Disorders. *Developmental Neurobiology*, *74*(2), 113-122. http://doi.org/10.1002/dneu.22128

Guinchat, V., Thorsen, P., Laurent, C., Cans, C., Bodeau, N., & Cohen, D. (2012). Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism: Risk factors for autism. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, *91*(3), 287-300. http://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01325.x

Gupta, S., Ellis, S. E., Ashar, F. N., Moes, A., Bader, J. S., Zhan, J., … Arking, D. E. (2014). Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nature Communications*, *5*, 5748. http://doi.org/10.1038/ncomms6748

Gurdon, J. B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development*, *10*(4), 622-640.

Gustafsson, L. (1997). Inadequate cortical feature maps: A neural circuit theory of autism. *Biological Psychiatry*, *42*(12), 1138-1147. http://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00141-8

Hagberg, B. (1995). Rett syndrome: clinical peculiarities and biological mysteries. *Acta Paediatrica*, *84*(9), 971-976. http://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1995.tb13809.x

Hallett, P. J., Cooper, O., Sadi, D., Robertson, H., Mendez, I., & Isacson, O. (2014). Long-Term Health of Dopaminergic Neuron Transplants in Parkinson's Disease Patients. *Cell Reports*, *7*(6), 1755-1761. http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.027

Hallett, P. J., Deleidi, M., Astradsson, A., Smith, G. A., Cooper, O., Osborn, T. M., … Isacson, O. (2015). Successful Function of Autologous iPSC-Derived Dopamine Neurons following Transplantation in a Non-Human Primate Model of Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*, *16*(3), 269-274. http://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.018

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., … et al. (2011). Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. *Archives of General Psychiatry*, *68*(11), 1095. http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76

Han, K., Holder Jr, J. L., Schaaf, C. P., Lu, H., Chen, H., Kang, H., … Zoghbi, H. Y. (2013). SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature*, *503*(7474), 72-77. http://doi.org/10.1038/nature12630

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creyghton, M. P., … Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, *462*(7273), 595-601. http://doi.org/10.1038/nature08592

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J. P., … Jaenisch, R. (2007). Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science*, *318*(5858), 1920-1923. http://doi.org/10.1126/science.1152092

Hansen, S. N., Schendel, D. E., & Parner, E. T. (2015). Explaining the Increase in the Prevalence of Autism Spectrum Disorders: The Proportion Attributable to Changes in Reporting Practices. *JAMA Pediatrics*, *169*(1), 56. http://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.1893

Hawkins, K., Joy, S., & McKay, T. (2014). Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming. *World Journal of Stem Cells*, *6*(5), 620.

http://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.620

Hazlett, H. C., Poe, M. D., Gerig, G., Styner, M., Chappell, C., Smith, R. G., … Piven, J. (2011). Early Brain Overgrowth in Autism Associated With an Increase in Cortical Surface Area Before Age 2 Years. *Archives of General Psychiatry*, *68*(5), 467. http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.39

Hazlett, H. C., Poe, M., Gerig, G., Smith, R. G., Provenzale, J., Ross, A., … Piven, J. (2005). Magnetic Resonance Imaging and Head Circumference Study of Brain Size in Autism: Birth Through Age 2 Years. *Archives of General Psychiatry*, *62*(12), 1366. http://doi.org/10.1001/archpsyc.62.12.1366

Heikkilä, E., Ristola, M., Endlich, K., Lehtonen, S., Lassila, M., Havana, M., … on behalf of the Addnet Consortium. (2007). Densin and beta-catenin form a complex and co-localize in cultured podocyte cell junctions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *305*(1-2), 9-18. http://doi.org/10.1007/s11010-007-9522-6

Hering, H., & Sheng, M. (2003). Activity-Dependent Redistribution and Essential Role of Cortactin in Dendritic Spine Morphogenesis. *The Journal of Neuroscience*, *23*(37), 11759-11769.

Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K., & Rudelli, R. D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, *41*(3), 289-294. http://doi.org/10.1002/ajmg.1320410306

Hofvander, B., Delorme, R., Chaste, P., Nydén, A., Wentz, E., Ståhlberg, O., … Leboyer, M. (2009). Psychiatric and psychosocial problems in adults with normal-intelligence autism spectrum disorders. *BMC Psychiatry*, *9*(1). http://doi.org/10.1186/1471-244X-9-35

Hollander, E., Novotny, S., Hanratty, M., Yaffe, R., DeCaria, C. M., Aronowitz, B. R., & Mosovich, S. (2003). Oxytocin Infusion Reduces Repetitive Behaviors in Adults with Autistic and Asperger's Disorders. *Neuropsychopharmacology*, *28*(1), 193-198. http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300021

Hollway, J. A., & Aman, M. G. (2011). Pharmacological treatment of sleep disturbance in developmental disabilities: A review of the literature. *Research in Developmental Disabilities*, *32*(3), 939-962. http://doi.org/10.1016/j.ridd.2010.12.035

Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, *57*(5), 719-729.

http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.013

Hoogenraad, C. C., Milstein, A. D., Ethell, I. M., Henkemeyer, M., & Sheng, M. (2005). GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nature Neuroscience*, *8*(7), 906-915. http://doi.org/10.1038/nn1487

Hosokawa, T., Rusakov, D. A., Bliss, T. V., & Fine, A. (1995). Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *The Journal of Neuroscience*, *15*(8), 5560-5573.

Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., … Deng, H. (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science*, *341*(6146), 651-654. http://doi.org/10.1126/science.1239278

Howlin, P., Karpf, J., & Turk, J. (2005). Behavioural characteristics and autistic features in individuals with Cohen Syndrome. *European Child & Adolescent Psychiatry*, *14*(2), 57-64. http://doi.org/10.1007/s00787-005-0416-4

Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., … Hui, L. (2011). Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, *475*(7356), 386-389. http://doi.org/10.1038/nature10116

Huch, M., & Koo, B.-K. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development*, *142*(18), 3113-3125. http://doi.org/10.1242/dev.118570

Huguet, G., Ey, E., & Bourgeron, T. (2013). The Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *14*(1), 191-213. http://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153431

Hultman, C. M., Sandin, S., Levine, S. Z., Lichtenstein, P., & Reichenberg, A. (2011). Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Molecular Psychiatry*, *16*(12), 1203-1212. http://doi.org/10.1038/mp.2010.121

Hultman, C., Sparén, P., & Cnattingius, S. (2002). Perinatal risk factors for infantile autism. - PubMed - NCBI. Consulté 17 septembre 2016, à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/12094096

Hung, A. Y., Futai, K., Sala, C., Valtschanoff, J. G., Ryu, J., Woodworth, M. A., … Sheng, M. (2008). Smaller Dendritic Spines, Weaker Synaptic Transmission, but Enhanced

Spatial Learning in Mice Lacking Shank1. *Journal of Neuroscience*, *28*(7), 1697-1708. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3032-07.2008

Hutsler, J. J., & Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, *1309*, 83-94. http://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120

Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., & Srivastava, D. (2010). Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell*, *142*(3), 375-386. http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.002

Ifrim, M. F., Williams, K. R., & Bassell, G. J. (2015). Single-Molecule Imaging of PSD-95 mRNA Translation in Dendrites and Its Dysregulation in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience*, *35*(18), 7116-7130. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2802-14.2015

Iossifov, I., O'Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., … Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, *515*(7526), 216-221. http://doi.org/10.1038/nature13908

Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., … Wigler, M. (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron*, *74*(2), 285-299. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.009

Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., … Südhof, T. C. (1997). Binding of Neuroligins to PSD-95. *Science*, *277*(5331), 1511-1515. http://doi.org/10.1126/science.277.5331.1511

Irwin, S. A., Idupulapati, M., Gilbert, M. E., Harris, J. B., Chakravarti, A. B., Rogers, E. J., … Greenough, W. T. (2002). Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *American Journal of Medical Genetics*, *111*(2), 140-146. http://doi.org/10.1002/ajmg.10500

Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J. B., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., … Greenough, W. T. (2001). Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: A quantitative examination. *American Journal of Medical Genetics*, *98*(2), 161-167. http://doi.org/10.1002/1096-8628(20010115)98:2<161::AID-AJMG1025>3.0.CO;2-B

Isaac, J. T. R., Ashby, M. C., & McBain, C. J. (2007). The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron*, *54*(6), 859-871. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.001

Jacquemont, S., Curie, A., des Portes, V., Torrioli, M. G., Berry-Kravis, E., Hagerman, R. J., … Gomez-Mancilla, B. (2011). Epigenetic Modification of the FMR1 Gene in Fragile X Syndrome Is Associated with Differential Response to the mGluR5 Antagonist AFQ056. *Science Translational Medicine*, *3*(64), 64ra1-64ra1. http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001708

Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., … Van Maldergem, L. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, *34*(1), 27-29. http://doi.org/10.1038/ng1136

Jan, Y.-N., & Jan, L. Y. (2003). The Control of Dendrite Development. *Neuron*, *40*(2), 229-242. http://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00631-7

Jaramillo, T. C., Speed, H. E., Xuan, Z., Reimers, J. M., Liu, S., & Powell, C. M. (2016). Altered Striatal Synaptic Function and Abnormal Behaviour in *Shank3* Exon4-9 Deletion Mouse Model of Autism: *Shank3* Exon4-9 Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Research*, *9*(3), 350-375. http://doi.org/10.1002/aur.1529

Ji, N. Y., Capone, G. T., & Kaufmann, W. E. (2011). Autism spectrum disorder in Down syndrome: cluster analysis of Aberrant Behaviour Checklist data supports diagnosis: Cluster analysis and DSM autism in Down syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, *55*(11), 1064-1077. http://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2011.01465.x

Jiang, Y., & Ehlers, M. D. (2013). Modeling Autism by SHANK Gene Mutations in Mice. *Neuron*, *78*(1), 8-27. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.016

Johnston, K., Dittner, A., Bramham, J., Murphy, C., Knight, A., & Russell, A. (2013). Attention Deficit Hyperactivity Disorder Symptoms in Adults with Autism Spectrum Disorders: ADHD symptoms in adult ASD. *Autism Research*, *6*(4), 225-236. http://doi.org/10.1002/aur.1283

Jordan, B. A., Fernholz, B., Boussac, M., Xu, C., Grigorean, G., Ziff, E., & Neubert, T. (2004). Identification and Verification of Novel Rodent Postsynaptic Density Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, *3*(9), 857-871. http://doi.org/10.1074/mcp.M400045-MCP200

Jourdain, P., Fukunaga, K., & Muller, D. (2003). Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Contributes to Activity-Dependent Filopodia Growth and Spine Formation. *The Journal of Neuroscience*, *23*(33), 10645-10649.

Just, M. A., Cherkassky, V. L., Keller, T. A., Kana, R. K., & Minshew, N. J. (2006). Functional and Anatomical Cortical Underconnectivity in Autism: Evidence from an fMRI Study of an Executive Function Task and Corpus Callosum Morphometry. *Cerebral Cortex*, *17*(4), 951-961. http://doi.org/10.1093/cercor/bhl006

Just, M. A., Cherkassky, V. L., Keller, T. A., & Minshew, N. J. (2004). Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain*, *127*(8), 1811-1821. http://doi.org/10.1093/brain/awh199

Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., … Takahashi, M. (2014). Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Reports*, *2*(2), 205-218. http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.12.007

Kaneko-Goto, T., Yoshihara, S., Miyazaki, H., & Yoshihara, Y. (2008). BIG-2 Mediates Olfactory Axon Convergence to Target Glomeruli. *Neuron*, *57*(6), 834-846. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.023

Kang, X., Yu, Q., Huang, Y., Song, B., Chen, Y., Gao, X., … Fan, Y. (2015). Effects of Integrating and Non-Integrating Reprogramming Methods on Copy Number Variation and Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLOS ONE*, *10*(7), e0131128. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0131128

Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child.*, *(2): 217-250*.

Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, *26*(7), 360-368. http://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00162-0

Kayser, M. S., Nolt, M. J., & Dalva, M. B. (2008). EphB Receptors Couple Dendritic Filopodia Motility to Synapse Formation. *Neuron*, *59*(1), 56-69. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.007

Kefalopoulou, Z., Politis, M., Piccini, P., Mencacci, N., Bhatia, K., Jahanshahi, M., … Foltynie, T. (2014). Long-term Clinical Outcome of Fetal Cell Transplantation for Parkinson Disease: Two Case Reports. *JAMA Neurology*, *71*(1), 83. http://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.4749

Kelleher, R. J., & Bear, M. F. (2008). The Autistic Neuron: Troubled Translation? *Cell*, *135*(3), 401-406. http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.017

Kenny, E. M., Cormican, P., Furlong, S., Heron, E., Kenny, G., Fahey, C., … Morris, D. W. (2014). Excess of rare novel loss-of-function variants in synaptic genes in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Molecular Psychiatry*, *19*(8), 872-879. http://doi.org/10.1038/mp.2013.127

Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., … Kim, K.-S. (2009). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*, *4*(6), 472-476. http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005

Kim, E., Camacho, J., Combs, Z., Ariza, J., Lechpammer, M., Noctor, S. C., & Martínez-Cerdeño, V. (2015). Preliminary findings suggest the number and volume of supragranular and infragranular pyramidal neurons are similar in the anterior superior temporal area of control subjects and subjects with autism. *Neuroscience Letters*, *589*, 98-103. http://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.021

Kim, K.-Y., Hysolli, E., & Park, I.-H. (2011). Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(34), 14169-14174. http://doi.org/10.1073/pnas.1018979108

Klei, L., Sanders, S. J., Murtha, M. T., Hus, V., Lowe, J. K., Willsey, A., … Devlin, B. (2012). Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Molecular Autism*, *3*(1), 9. http://doi.org/10.1186/2040-2392-3-9

Kneussel, M. (2005). Postsynaptic scaffold proteins at non-synaptic sites. *EMBO reports*, *6*(1), 22-27. http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400319

Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., … Nakauchi, H. (2010). Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells. *Cell*, *142*(5), 787-799. http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.039

Koenderink, M. J. T., & Uylings, H. B. M. (1995). Postnatal maturation of layer V pyramidal neurons in the human prefrontal cortex. A quantitative Golgi analysis. *Brain Research*, *678*(1-2), 233-243. http://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00206-6

Koenderink, M. J. T., Uylings, H. B. M., & Mrzljak, L. (1994). Postnatal maturation of the

layer III pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a quantitative Golgi analysis. *Brain Research*, *653*(1-2), 173-182. http://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90387-5

Konur, S., & Ghosh, A. (2005). Calcium Signaling and the Control of Dendritic Development. *Neuron*, *46*(3), 401-405. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.022

Korkotian, E., & Segal, M. (1999). Bidirectional regulation of dendritic spine dimensions by glutamate receptors. *Neuroreport.*, *10(13):2875-7*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/?term=Bidirectional+regulation+of+dendritic+spine+dimensions+by+glutamate+receptor

Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., & Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, *269*(5231), 1737-1740. http://doi.org/10.1126/science.7569905

Koukoui, S. D., & Chaudhuri, A. (2007). Neuroanatomical, molecular genetic, and behavioral correlates of fragile X syndrome. *Brain Research Reviews*, *53*(1), 27-38. http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.06.001

Kouser, M., Speed, H. E., Dewey, C. M., Reimers, J. M., Widman, A. J., Gupta, N., … Powell, C. M. (2013). Loss of Predominant Shank3 Isoforms Results in Hippocampus-Dependent Impairments in Behavior and Synaptic Transmission. *Journal of Neuroscience*, *33*(47), 18448-18468. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3017-13.2013

Kratsios, P., Pinan-Lucarré, B., Kerk, S. Y., Weinreb, A., Bessereau, J.-L., & Hobert, O. (2015). Transcriptional Coordination of Synaptogenesis and Neurotransmitter Signaling. *Current Biology*, *25*(10), 1282-1295. http://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.028

Kreienkamp, H.-J. (2008). Scaffolding Proteins at the Postsynaptic Density: Shank as the Architectural Framework. In E. Klussmann & J. Scott (Éd.), *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets* (Vol. 186, p. 365-380). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Consulté à l'adresse http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-72843-6_15

Krencik, R., & Zhang, S.-C. (2011). Directed differentiation of functional astroglial

subtypes from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *6*(11), 1710-1717. http://doi.org/10.1038/nprot.2011.405

Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., … Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. http://doi.org/10.1038/nature10648

Krumm, N., Turner, T. N., Baker, C., Vives, L., Mohajeri, K., Witherspoon, K., … Eichler, E. E. (2015). Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nature Genetics*, *47*(6), 582-588. http://doi.org/10.1038/ng.3303

Ladd-Acosta, C., Hansen, K. D., Briem, E., Fallin, M. D., Kaufmann, W. E., & Feinberg, A. P. (2014). Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Molecular Psychiatry*, *19*(8), 862-871. http://doi.org/10.1038/mp.2013.114

Lai, M.-C., Lombardo, M. V., & Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *The Lancet*, *383*(9920), 896-910. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1

Lai, M.-C., Lombardo, M. V., Suckling, J., Ruigrok, A. N. V., Chakrabarti, B., Ecker, C., … Baron-Cohen, S. (2013). Biological sex affects the neurobiology of autism. *Brain*, *136*(9), 2799-2815. http://doi.org/10.1093/brain/awt216

LaSalle, J. M. (2013). Autism genes keep turning up chromatin. *OA autism*, *1*(2), 14.

Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M.-P., … Briault, S. (2004). X-Linked Mental Retardation and Autism Are Associated with a Mutation in the NLGN4 Gene, a Member of the Neuroligin Family. *The American Journal of Human Genetics*, *74*(3), 552-557. http://doi.org/10.1086/382137

Leblond, C. S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., Huguet, G., … Bourgeron, T. (2012). Genetic and Functional Analyses of SHANK2 Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genetics*, *8*(2), e1002521. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002521

Leblond, C. S., Nava, C., Polge, A., Gauthier, J., Huguet, G., Lumbroso, S., … Bourgeron, T. (2014). Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments. *PLoS Genetics*, *10*(9), e1004580. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004580

Lee, B. K., & McGrath, J. J. (2015). Advancing parental age and autism: multifactorial pathways. *Trends in Molecular Medicine*, *21*(2), 118-125. http://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.005

Lee, J., Chung, C., Ha, S., Lee, D., Kim, D.-Y., Kim, H., & Kim, E. (2015). Shank3-mutant mice lacking exon 9 show altered excitation/inhibition balance, enhanced rearing, and spatial memory deficit. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*. http://doi.org/10.3389/fncel.2015.00094

Lefebvre, A., Beggiato, A., Bourgeron, T., & Toro, R. (2015). Neuroanatomical Diversity of Corpus Callosum and Brain Volume in Autism: Meta-analysis, Analysis of the Autism Brain Imaging Data Exchange Project, and Simulation. *Biological Psychiatry*, *78*(2), 126-134. http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.02.010

Lepeta, K., Lourenco, M. V., Schweitzer, B. C., Martino Adami, P. V., Banerjee, P., Catuara-Solarz, S., … Seidenbecher, C. (2016). Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders - A review from students to students. *Journal of Neurochemistry*, *138*(6), 785-805. http://doi.org/10.1111/jnc.13713

Li, M., Fallin, M. D., Riley, A., Landa, R., Walker, S. O., Silverstein, M., … Wang, X. (2016). The Association of Maternal Obesity and Diabetes With Autism and Other Developmental Disabilities. *PEDIATRICS*, *137*(2), e20152206-e20152206. http://doi.org/10.1542/peds.2015-2206

Li, X.-J., Du, Z.-W., Zarnowska, E. D., Pankratz, M., Hansen, L. O., Pearce, R. A., & Zhang, S.-C. (2005). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *23*(2), 215-221. http://doi.org/10.1038/nbt1063

Liang, G., & Zhang, Y. (2013). Genetic and Epigenetic Variations in iPSCs: Potential Causes and Implications for Application. *Cell Stem Cell*, *13*(2), 149-159. http://doi.org/10.1016/j.stem.2013.07.001

Lim, C.-S., Yang, J., Lee, Y.-K., Lee, K., Lee, J.-A., & Kaang, B.-K. (2015). Understanding the molecular basis of autism in a dish using hiPSCs-derived neurons from ASD patients. *Molecular Brain*, *8*(1). http://doi.org/10.1186/s13041-015-0146-6

Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J.-I., Suh, P.-G., Sheng, M., & Kim, E. (1999). Characterization of the Shank Family of Synaptic Proteins MULTIPLE GENES, ALTERNATIVE SPLICING, AND DIFFERENTIAL EXPRESSION IN BRAIN AND DEVELOPMENT. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(41), 29510-29518. http://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29510

Lim, S., Sala, C., Yoon, J., Park, S., Kuroda, S. 'ichi, Sheng, M., & Kim, E. (2001). Sharpin, a Novel Postsynaptic Density Protein That Directly Interacts with the Shank Family of Proteins. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *17*(2), 385-397.

http://doi.org/10.1006/mcne.2000.0940

Limoges, E., Mottron, L., Bolduc, C., Berthiaume, C., & Godbout, R. (2005). Atypical sleep architecture and the autism phenotype. *Brain*, *128*(5), 1049-1061. http://doi.org/10.1093/brain/awh425

Liu, J., Koscielska, K. A., Cao, Z., Hulsizer, S., Grace, N., Mitchell, G., … Hagerman, P. J. (2012). Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Human Molecular Genetics*, *21*(17), 3795-3805. http://doi.org/10.1093/hmg/dds207

Liu, Y., Liu, H., Sauvey, C., Yao, L., Zarnowska, E. D., & Zhang, S.-C. (2013). Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *8*(9), 1670-1679. http://doi.org/10.1038/nprot.2013.106

Liu, Z., & Smith, C. B. (2014). Lithium: A Promising Treatment for Fragile X Syndrome. *ACS Chemical Neuroscience*, *5*(6), 477-483. http://doi.org/10.1021/cn500077p

Liu, Z.-H., Chuang, D.-M., & Smith, C. B. (2011). Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, *14*(5), 618-630. http://doi.org/10.1017/S1461145710000520

Liu, Z.-H., Huang, T., & Smith, C. B. (2012). Lithium reverses increased rates of cerebral protein synthesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Neurobiology of disease*, *45*(3), 1145-1152. http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.037

Lo, S. T., Siemensma, E., Collin, P., & Hokken-Koelega, A. (2013). Impaired theory of mind and symptoms of Autism Spectrum Disorder in children with Prader–Willi syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, *34*(9), 2764-2773. http://doi.org/10.1016/j.ridd.2013.05.024

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., … Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, *523*(7560), 337-341. http://doi.org/10.1038/nature14432

Lugnegård, T., Hallerbäck, M. U., & Gillberg, C. (2011). Psychiatric comorbidity in young adults with a clinical diagnosis of Asperger syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, *32*(5), 1910-1917. http://doi.org/10.1016/j.ridd.2011.03.025

Lui, J. H., Hansen, D. V., & Kriegstein, A. R. (2011). Development and Evolution of the Human Neocortex. *Cell*, *146*(1), 18-36. http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.030

Lundstrom, S., Reichenberg, A., Anckarsater, H., Lichtenstein, P., & Gillberg, C. (2015).

Autism phenotype versus registered diagnosis in Swedish children: prevalence trends over 10 years in general population samples. *BMJ*, *350*(apr28 2), h1961-h1961. http://doi.org/10.1136/bmj.h1961

Ma, D. K., Marchetto, M. C., Guo, J. U., Ming, G., Gage, F. H., & Song, H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nature Neuroscience*, *13*(11), 1338-1344. http://doi.org/10.1038/nn.2672

Madison, J. M., Zhou, F., Nigam, A., Hussain, A., Barker, D. D., Nehme, R., … Haggarty, S. J. (2015). Characterization of bipolar disorder patient-specific induced pluripotent stem cells from a family reveals neurodevelopmental and mRNA expression abnormalities. *Molecular Psychiatry*, *20*(6), 703-717. http://doi.org/10.1038/mp.2015.7

Madsen, K. M., Hviid, A., Vestergaard, M., Schendel, D., Wohlfahrt, J., Thorsen, P., … Melbye, M. (2002). A Population-Based Study of Measles, Mumps, and Rubella Vaccination and Autism. *New England Journal of Medicine*, *347*(19), 1477-1482. http://doi.org/10.1056/NEJMoa021134

Maramara, L. A., He, W., & Ming, X. (2014). Pre- and Perinatal Risk Factors for Autism Spectrum Disorder in a New Jersey Cohort. *Journal of Child Neurology*, *29*(12), 1645-1651. http://doi.org/10.1177/0883073813512899

Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., … Muotri, A. R. (2010). A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, *143*(4), 527-539. http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016

Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., … Vaccarino, F. M. (2015). FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell*, *162*(2), 375-390. http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.034

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 793-807. http://doi.org/10.1038/nrn1519

Marshall, C. R., Noor, A., Vincent, J. B., Lionel, A. C., Feuk, L., Skaug, J., … Scherer, S. W. (2008). Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*, *82*(2), 477-488. http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.009

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(12), 7634.

Martínez-Cerdeño, V. (2016). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models: Dendrite and Spine in Autism. *Developmental Neurobiology*. http://doi.org/10.1002/dneu.22417

Martins, Y., Young, R. L., & Robson, D. C. (2008). Feeding and Eating Behaviors in Children with Autism and Typically Developing Children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *38*(10), 1878-1887. http://doi.org/10.1007/s10803-008-0583-5

Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., … Costello, J. F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, *466*(7303), 253-257. http://doi.org/10.1038/nature09165

McElhanon, B. O., McCracken, C., Karpen, S., & Sharp, W. G. (2014). Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *PEDIATRICS*, *133*(5), 872-883. http://doi.org/10.1542/peds.2013-3995

McKinney, B. C., Grossman, A. W., Elisseou, N. M., & Greenough, W. T. (2005). Dendritic spine abnormalities in the occipital cortex of C57BL/6Fmr1 knockout mice. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *136B*(1), 98-102. http://doi.org/10.1002/ajmg.b.30183

McPheeters, M. L., Warren, Z., Sathe, N., Bruzek, J. L., Krishnaswami, S., Jerome, R. N., & Veenstra-VanderWeele, J. (2011). A Systematic Review of Medical Treatments for Children With Autism Spectrum Disorders. *PEDIATRICS*, *127*(5), e1312-e1321. http://doi.org/10.1542/peds.2011-0427

McWilliams, R. R., Gidey, E., Fouassier, L., Weed, S. A., & Doctor, R. B. (2004). Characterization of an ankyrin repeat-containing Shank2 isoform (Shank2E) in liver epithelial cells. *Biochemical Journal*, *380*(1), 181-191. http://doi.org/10.1042/bj20031577

Mei, Y., Monteiro, P., Zhou, Y., Kim, J.-A., Gao, X., Fu, Z., & Feng, G. (2016). Adult restoration of Shank3 expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature*, *530*(7591), 481-484. http://doi.org/10.1038/nature16971

Mendez, I., Viñuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., … Isacson, O. (2008). Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature Medicine*, *14*(5), 507-509. http://doi.org/10.1038/nm1752

Mercati, O., Danckaert, A., Andre-Leroux, G., Bellinzoni, M., Gouder, L., Watanabe, K., … Cloez-Tayarani, I. (2013). Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites. *Biology Open*, *2*(3), 324-334. http://doi.org/10.1242/bio.20133343

Mercati, O., Huguet, G., Danckaert, A., André-Leroux, G., Maruani, A., Bellinzoni, M., … Bourgeron, T. (2016). CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders. *Molecular Psychiatry*. http://doi.org/10.1038/mp.2016.61

Michelsen, K. A., Acosta-Verdugo, S., Benoit-Marand, M., Espuny-Camacho, I., Gaspard, N., Saha, B., … Vanderhaeghen, P. (2015). Area-Specific Reestablishment of Damaged Circuits in the Adult Cerebral Cortex by Cortical Neurons Derived from Mouse Embryonic Stem Cells. *Neuron*, *85*(5), 982-997. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.001

Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L., Watabe, A., Makhinson, M., … et al. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, *396(6710):433-9*.

Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., … Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, *454*(7200), 49-55. http://doi.org/10.1038/nature07056

Mines, M. A., Yuskaitis, C. J., King, M. K., Beurel, E., & Jope, R. S. (2010). GSK3 Influences Social Preference and Anxiety-Related Behaviors during Social Interaction in a Mouse Model of Fragile X Syndrome and Autism. *PLoS ONE*, *5*(3). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009706

Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D. L., Kano, Y., … Mori, M. (2011). Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell*, *8*(6), 633-638. http://doi.org/10.1016/j.stem.2011.05.001

Modahl, C., Green, L. A., Fein, D., Morris, M., Waterhouse, L., Feinstein, C., & Levin, H. (1998). Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biological Psychiatry*, *43*(4),

270-277. http://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00439-3

Moessner, R., Marshall, C. R., Sutcliffe, J. S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., … Scherer, S. W. (2007). Contribution of SHANK3 Mutations to Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*, *81*(6), 1289-1297. http://doi.org/10.1086/522590

Mok, H., Shin, H., Kim, S., Lee, J.-R., Yoon, J., & Kim, E. (2002). Association of the Kinesin Superfamily Motor Protein KIF1Bα with Postsynaptic Density-95 (PSD-95), Synapse-Associated Protein-97, and Synaptic Scaffolding Molecule PSD-95/Discs Large/Zona Occludens-1 Proteins. *The Journal of Neuroscience*, *22*(13), 5253-5258.

Morgan, J. T., Chana, G., Pardo, C. A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., … Everall, I. P. (2010). Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biological Psychiatry*, *68*(4), 368-376. http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.024

Moss, J. F. (2016). Autism spectrum disorder and attention-deficit-hyperactivity disorder in Down syndrome. *Developmental Medicine & Child Neurology*. http://doi.org/10.1111/dmcn.13261

Moss, J., & Howlin, P. (2009). Autism spectrum disorders in genetic syndromes: implications for diagnosis, intervention and understanding the wider autism spectrum disorder population. *Journal of Intellectual Disability Research*, *53*(10), 852-873. http://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2009.01197.x

Mrzljak, L., Uylings, H. B. M., Kostovic, I., Eden, V., & G, C. (1992). Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex. II. A quantitative Golgi study. *Journal of Comparative Neurology*, *316*(4), 485-496. http://doi.org/10.1002/cne.903160408

Mukaetova-Ladinska, E. B., Arnold, H., Jaros, E., Perry, R., & Perry, E. (2004). Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *30*(6), 615-623. http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00574.x

Müller, H. W., & Seifert, W. (1982). A neurotrophic factor (NTF) released from primary glial cultures supports survival and fiber outgrowth of cultured hippocampal neurons: NTF Effects on Cultured Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *8*(2-3), 195-204. http://doi.org/10.1002/jnr.490080209

Munesue, T., Nakamura, H., Kikuchi, M., Miura, Y., Takeuchi, N., Anme, T., … Higashida, H. (2016). Oxytocin for Male Subjects with Autism Spectrum Disorder and Comorbid Intellectual Disabilities: A Randomized Pilot Study. *Frontiers in Psychiatry*, *7*. http://doi.org/10.3389/fpsyt.2016.00002

Murai, K. K., Misner, D., & Ranscht, B. (2002). Contactin Supports Synaptic Plasticity Associated with Hippocampal Long-Term Depression but Not Potentiation. *Current Biology*, *12*(3), 181-190. http://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00680-2

Murphy, C., Wilson, C. E., Robertson, D. M., Ecker, C., Daly, E. M., Hammond, N., … McAlonan, G. M. (2016). Autism spectrum disorder in adults: diagnosis, management, and health services development. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *Volume 12*, 1669-1686. http://doi.org/10.2147/NDT.S65455

Murphy, D. G. M., Beecham, J., Craig, M., & Ecker, C. (2011). Autism in adults. New biologicial findings and their translational implications to the cost of clinical services. *Brain Research*, *1380*, 22-33. http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.042

Nagarajan, R. P., Hogart, A. R., Gwye, Y., Martin, M. R., & LaSalle, J. M. (2006). Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, *1*(4), e1.

Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B., & Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional Activity-Dependent Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons. *Neuron*, *44*(5), 759-767. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.016

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., … Sheng, M. (1999). Shank, a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins that Binds to the NMDA Receptor/PSD-95/GKAP Complex and Cortactin. *Neuron*, *23*(3), 569-582. http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80809-0

Naisbitt, S., Valtschanoff, J., Allison, D. W., Sala, C., Kim, E., Craig, A. M., … Sheng, M. (2000). Interaction of the Postsynaptic Density-95/Guanylate Kinase Domain-Associated Protein Complex with a Light Chain of Myosin-V and Dynein. *The Journal of Neuroscience*, *20*(12), 4524-4534.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., … Yamanaka, S. (2007). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse

and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, *26*(1), 101-106. http://doi.org/10.1038/nbt1374

Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(32), 14152-14157. http://doi.org/10.1073/pnas.1009374107

Nakanishi, H., Obaishi, H., Satoh, A., Wada, M., Mandai, K., Satoh, K., … Takai, Y. (1997). Neurabin: A Novel Neural Tissue–specific Actin Filament–binding Protein Involved in Neurite Formation. *The Journal of Cell Biology*, *139*(4), 951.

Nardone, S., Sharan Sams, D., Reuveni, E., Getselter, D., Oron, O., Karpuj, M., & Elliott, E. (2014). DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. *Translational Psychiatry*, *4*(9), e433. http://doi.org/10.1038/tp.2014.70

Nguyen, M. V. C., Du, F., Felice, C. A., Shan, X., Nigam, A., Mandel, G., … Ballas, N. (2012). MeCP2 Is Critical for Maintaining Mature Neuronal Networks and Global Brain Anatomy during Late Stages of Postnatal Brain Development and in the Mature Adult Brain. *Journal of Neuroscience*, *32*(29), 10021-10034. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1316-12.2012

Nicholas, C. R., Chen, J., Tang, Y., Southwell, D. G., Chalmers, N., Vogt, D., … Kriegstein, A. R. (2013). Functional Maturation of hPSC-Derived Forebrain Interneurons Requires an Extended Timeline and Mimics Human Neural Development. *Cell Stem Cell*, *12*(5), 573-586. http://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.005

Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and Function of Dendritic Spines. *Annual Review of Physiology*, *64*(1), 313-353. http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008

Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2005). Spine-Neck Geometry Determines NMDA Receptor-Dependent Ca2+ Signaling in Dendrites. *Neuron*, *46*(4), 609-622. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.03.015

Nordahl, C. W., Scholz, R., Yang, X., Buonocore, M., Simon, T., Rogers, S., & Amaral, D. (2012). Increased Rate of Amygdala Growth in Children Aged 2 to 4 Years With Autism Spectrum Disorders: A Longitudinal Study. *Archives of General Psychiatry*, *69*(1), 53. http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.145

Odawara, A., Saitoh, Y., Alhebshi, A. H., Gotoh, M., & Suzuki, I. (2014). Long-term

electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *443*(4), 1176-1181. http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.142

Okamoto, K., Bosch, M., & Hayashi, Y. (2009). The Roles of CaMKII and F-Actin in the Structural Plasticity of Dendritic Spines: A Potential Molecular Identity of a Synaptic Tag? *Physiology*, *24*(6), 357-366. http://doi.org/10.1152/physiol.00029.2009

Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, *448*(7151), 313-317. http://doi.org/10.1038/nature05934

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*, *322*(5903), 949-953. http://doi.org/10.1126/science.1164270

Onder, T. T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A. U., Zhu, N., Bernt, K. M., … Daley, G. Q. (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*, *483*(7391), 598-602. http://doi.org/10.1038/nature10953

Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(3), 383-392. http://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.007

Ornoy, A., Weinstein- Fudim, L., & Ergaz, Z. (2016). Genetic Syndromes, Maternal Diseases and Antenatal Factors Associated with Autism Spectrum Disorders (ASD). *Child and Adolescent Psychiatry*, 316. http://doi.org/10.3389/fnins.2016.00316

O'Roak, B. J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J. D., Stanaway, I. B., Phelps, I. G., … Shendure, J. (2012). Multiplex Targeted Sequencing Identifies Recurrently Mutated Genes in Autism Spectrum Disorders. *Science*, *338*(6114), 1619-1622. http://doi.org/10.1126/science.1227764

O'Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., … Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, *485*(7397), 246-250. http://doi.org/10.1038/nature10989

Ozonoff, S., Young, G. S., Carter, A., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L., … Stone,

W. L. (2011). Recurrence Risk for Autism Spectrum Disorders: A Baby Siblings Research Consortium Study. *PEDIATRICS*. http://doi.org/10.1542/peds.2010-2825

Pak, C., Danko, T., Zhang, Y., Aoto, J., Anderson, G., Maxeiner, S., … Südhof, T. C. (2015). Human Neuropsychiatric Disease Modeling using Conditional Deletion Reveals Synaptic Transmission Defects Caused by Heterozygous Mutations in NRXN1. *Cell Stem Cell*, *17*(3), 316-328. http://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.017

Pannasch, U., Vargova, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., … Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(20), 8467-8472. http://doi.org/10.1073/pnas.1016650108

Park, E., Na, M., Choi, J., Kim, S., Lee, J.-R., Yoon, J., … Kim, E. (2003). The Shank Family of Postsynaptic Density Proteins Interacts with and Promotes Synaptic Accumulation of the PIX Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rac1 and Cdc42. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(21), 19220-19229. http://doi.org/10.1074/jbc.M301052200

Park, H., Han, K.-S., Seo, J., Lee, J., Dravid, S. M., Woo, J., … Lee, C. (2015). Channel-mediated astrocytic glutamate modulates hippocampal synaptic plasticity by activating postsynaptic NMDA receptors. *Molecular Brain*, *8*(1), 7. http://doi.org/10.1186/s13041-015-0097-y

Paşca, S. P., Portmann, T., Voineagu, I., Yazawa, M., Shcheglovitov, A., Paşca, A. M., … Dolmetsch, R. E. (2011). Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nature Medicine*, *17*(12), 1657-1662. http://doi.org/10.1038/nm.2576

Pattinson, D., Baccei, M., Karadottir, R., Torsney, C., Moss, A., McCutcheon, J., … Fitzgerald, M. (2006). Aberrant dendritic branching and sensory inputs in the superficial dorsal horn of mice lacking CaMKIIα autophosphorylation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *33*(1), 88-95. http://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.06.010

Paulsen, B. da S., Maciel, R. de M., Galina, A., da Silveira, M. S., Souza, C. dos S., Drummond, H., … Rehen, S. K. (2012). Altered Oxygen Metabolism Associated to Neurogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Schizophrenic Patient. *Cell Transplantation*, *21*(7), 1547-1559. http://doi.org/10.3727/096368911X600957

Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., … Feng, G.

(2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, *472*(7344), 437-442. http://doi.org/10.1038/nature09965

Peng, J., Kim, M. J., Cheng, D., Duong, D. M., Gygi, S. P., & Sheng, M. (2004). Semiquantitative Proteomic Analysis of Rat Forebrain Postsynaptic Density Fractions by Mass Spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(20), 21003-21011. http://doi.org/10.1074/jbc.M400103200

Penzes, P., Johnson, R. C., Sattler, R., Zhang, X., Huganir, R. L., Kambampati, V., … Eipper, B. A. (2001). The Neuronal Rho-GEF Kalirin-7 Interacts with PDZ Domain–Containing Proteins and Regulates Dendritic Morphogenesis. *Neuron*, *29*(1), 229-242. http://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00193-3

Petanjek, Z., Judas, M., Kostovic, I., & Uylings, H. B. M. (2008). Lifespan Alterations of Basal Dendritic Trees of Pyramidal Neurons in the Human Prefrontal Cortex: A Layer-Specific Pattern. *Cerebral Cortex*, *18*(4), 915-929. http://doi.org/10.1093/cercor/bhm124

Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, *127*(4), 321-355. http://doi.org/10.1002/aja.1001270402

Phelan, K., & McDermid, H. (2012). The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/22670140

Phillips, M., & Pozzo-Miller, L. (2015). Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neuroscience Letters*, *601*, 30-40. http://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.011

Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., … Scherer, S. W. (2014). Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *The American Journal of Human Genetics*, *94*(5), 677-694. http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018

Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., … Betancur, C. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, *466*(7304), 368-372. http://doi.org/10.1038/nature09146

Plath, K., & Lowry, W. E. (2011). Progress in understanding reprogramming to the

induced pluripotent state. *Nature Reviews Genetics*, *12*(4), 253-265. http://doi.org/10.1038/nrg2955

Polo, J. M., Anderssen, E., Walsh, R. M., Schwarz, B. A., Nefzger, C. M., Lim, S. M., … Hochedlinger, K. (2012). A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells. *Cell*, *151*(7), 1617-1632. http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.039

Potocki, L., Bi, W., Treadwell-Deering, D., Carvalho, C. M. B., Eifert, A., Friedman, E. M., … Lupski, J. R. (2007). Characterization of Potocki-Lupski Syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and Delineation of a Dosage-Sensitive Critical Interval That Can Convey an Autism Phenotype. *The American Journal of Human Genetics*, *80*(4), 633-649. http://doi.org/10.1086/512864

Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., … Varoqueaux, F. (2009). Neuroligin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin. *Neuron*, *63*(5), 628-642. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.023

Pratt, K. G., Watt, A. J., Griffith, L. C., Nelson, S. B., & Turrigiano, G. G. (2003). Activity-Dependent Remodeling of Presynaptic Inputs by Postsynaptic Expression of Activated CaMKII. *Neuron*, *39*(2), 269-281. http://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00422-7

Proepper, C., Johannsen, S., Liebau, S., Dahl, J., Vaida, B., Bockmann, J., … Boeckers, T. M. (2007). Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *The EMBO Journal*, *26*(5), 1397-1409. http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601569

Quitsch, A., Berhörster, K., Wee Liew, C., Richter, D., & Kreienkamp, H. (2005). Postsynaptic Shank Antagonizes Dendrite Branching Induced by the Leucine-Rich Repeat Protein Densin-180. *Journal of Neuroscience*, *25*(2), 479-487. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2699-04.2005

Raab, M., Boeckers, T. M., & Neuhuber, W. L. (2010). Proline-rich synapse-associated protein-1 and 2 (ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3)—scaffolding proteins are also present in postsynaptic specializations of the peripheral nervous system. *Neuroscience*, *171*(2), 421-433. http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.041

Radoeva, P. D., Coman, I. L., Salazar, C. A., Gentile, K. L., Higgins, A. M., Middleton, F. A., … Kates, W. R. (2014). Association between autism spectrum disorder in individuals

with velocardiofacial (22q11.2 deletion) syndrome and PRODH and COMT genotypes: *Psychiatric Genetics*, *24*(6), 269-272. http://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000062

Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., … Hanna, J. H. (2013). Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*, *502*(7469), 65-70. http://doi.org/10.1038/nature12587

Ramanathan, S., Woodroffe, A., Flodman, P. L., Mays, L. Z., Hanouni, M., Modahl, C. B., … Smith, M. (2004). A case of autism with an interstitial deletion on 4q leading to hemizygosity for genes encoding for glutamine and glycine neurotransmitter receptor sub-units (AMPA 2, GLRA3, GLRB) and neuropeptide receptors NPY1R, NPY5R. *BMC Medical Genetics*, *5*(1). http://doi.org/10.1186/1471-2350-5-10

Ramos, P. S., Sajuthi, S., Langefeld, C. D., & Walker, S. J. (2012). Immune function genes CD99L2, JARID2 and TPO show association with autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, *3*(1), 4. http://doi.org/10.1186/2040-2392-3-4

Raymond, G., Bauman, M., & Kemper, T. (1996). Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathologica*, *91(1):117-9*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/8773156

Reichenberg, A., Gross, R., Weiser, M., Bresnahan, M., Silverman, J., Harlap, S., … Susser, E. (2006). Advancing Paternal Age and Autism. *Archives of General Psychiatry*, *63*(9), 1026. http://doi.org/10.1001/archpsyc.63.9.1026

Reissner, C., Klose, M., Fairless, R., & Missler, M. (2008). Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(39), 15124-15129. http://doi.org/10.1073/pnas.0801639105

Ricciardi, S., Ungaro, F., Hambrock, M., Rademacher, N., Stefanelli, G., Brambilla, D., … Broccoli, V. (2012). CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1–PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. *Nature Cell Biology*, *14*(9), 911-923. http://doi.org/10.1038/ncb2566

Richdale, A. L., & Schreck, K. A. (2009). Sleep problems in autism spectrum disorders: Prevalence, nature, & possible biopsychosocial aetiologies. *Sleep Medicine*

Reviews, *13*(6), 403-411. http://doi.org/10.1016/j.smrv.2009.02.003

Roberts, E. M., English, P. B., Grether, J. K., Windham, G. C., Somberg, L., & Wolff, C. (2007). Maternal Residence Near Agricultural Pesticide Applications and Autism Spectrum Disorders Among Children in the California Central Valley. *Environmental Health Perspectives*. http://doi.org/10.1289/ehp.10168

Robinson, E. B., Lichtenstein, P., Anckarsater, H., Happe, F., & Ronald, A. (2013). Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(13), 5258-5262. http://doi.org/10.1073/pnas.1211070110

Rochefort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports*, *13*(8), 699-708. http://doi.org/10.1038/embor.2012.102

Roohi, J., Montagna, C., Tegay, D. H., Palmer, L. E., DeVincent, C., Pomeroy, J. C., … Hatchwell, E. (2008). Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *Journal of Medical Genetics*, *46*(3), 176-182. http://doi.org/10.1136/jmg.2008.057505

Roussignol, G., Ango, F., Romorini, S., Tu, J., Sala, C., Worley, P., … Fagni, L. (2005). Shank Expression Is Sufficient to Induce Functional Dendritic Spine Synapses in Aspiny Neurons. *Journal of Neuroscience*, *25*(14), 3560-3570. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4354-04.2005

Rubenstein, J. L. R., & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems: Model of autism. *Genes, Brain and Behavior*, *2*(5), 255-267. http://doi.org/10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x

Rudelli, R., Brown, W., Wisniewski, K., Jenkins, E., Laure-Kamionowska, M., Connell, F., & Wisniewski HM. (1985). Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathologica*, *67(3-4):289-95*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/?term=Adult+fragile+X+syndrome.+Clinico-neuropathologic+findings

Ruiz, S., Diep, D., Gore, A., Panopoulos, A. D., Montserrat, N., Plongthongkum, N., … Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(40), 16196-16201. http://doi.org/10.1073/pnas.1202352109

Russell, A. J., Mataix-Cols, D., Anson, M., & Murphy, D. (2005). Obsessions and compulsions in Asperger syndrome and high-functioning autism. *The British Journal of Psychiatry*, *186*(6), 525-528. http://doi.org/10.1192/bjp.186.6.525

Russell, A. J., Murphy, C. M., Wilson, E., Gillan, N., Brown, C., Robertson, D. M., … Murphy, D. G. (2016). The mental health of individuals referred for assessment of autism spectrum disorder in adulthood: A clinic report. *Autism*, *20*(5), 623-627. http://doi.org/10.1177/1362361315604271

Ryan, S. D., Dolatabadi, N., Chan, S. F., Zhang, X., Akhtar, M. W., Parker, J., … Lipton, S. A. (2013). Isogenic Human iPSC Parkinson's Model Shows Nitrosative Stress-Induced Dysfunction in MEF2-PGC1α Transcription. *Cell*, *155*(6), 1351-1364. http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.009

Sala, C., Piëch, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., & Sheng, M. (2001). Regulation of Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function by Shank and Homer. *Neuron*, *31*(1), 115-130. http://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00339-7

Sánchez-Danés, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jiménez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., … Raya, A. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease: iPS cell-based model of Parkinson's disease. *EMBO Molecular Medicine*, *4*(5), 380-395. http://doi.org/10.1002/emmm.201200215

Sanders, S. J., Ercan-Sencicek, A. G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M. T., Moreno-De-Luca, D., … State, M. W. (2011). Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron*, *70*(5), 863-885. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.002

Sandin, S., Hultman, C. M., Kolevzon, A., Gross, R., MacCabe, J. H., & Reichenberg, A. (2012). Advancing Maternal Age Is Associated With Increasing Risk for Autism: A Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, *51*(5), 477-486.e1. http://doi.org/10.1016/j.jaac.2012.02.018

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The Familial Risk of Autism. *JAMA*, *311*(17), 1770. http://doi.org/10.1001/jama.2014.4144

Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA Receptor Composition: Many Regulators, Many Consequences. *The Neuroscientist*, *19*(1), 62-75. http://doi.org/10.1177/1073858411435129

Sato, D., Lionel, A. C., Leblond, C. S., Prasad, A., Pinto, D., Walker, S., … Scherer, S. W. (2012). SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*, *90*(5), 879-887. http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.017

Saus, E., Brunet, A., Armengol, L., Alonso, P., Crespo, J. M., Fernández-Aranda, F., … Estivill, X. (2010). Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients. *Journal of Psychiatric Research*, *44*(14), 971-978. http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.03.007

Schaer, M., Kochalka, J., Padmanabhan, A., Supekar, K., & Menon, V. (2015). Sex differences in cortical volume and gyrification in autism. *Molecular Autism*, *6*(1). http://doi.org/10.1186/s13229-015-0035-y

Schell, M., Molliver, M., & Snyder, S. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92(9):3948-52*.

Schmeisser, M. J., Ey, E., Wegener, S., Bockmann, J., Stempel, A. V., Kuebler, A., … Boeckers, T. M. (2012). Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*. http://doi.org/10.1038/nature11015

Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D. S., & Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(21), 13902-13907. http://doi.org/10.1073/pnas.172511199

Schreck, K., Mulick, J., & Smith, A. (2004). Sleep problems as possible predictors of intensified symptoms of autism. *Research in Developmental Disabilities*, *25*(1), 57-66. http://doi.org/10.1016/j.ridd.2003.04.007

Schultz, J., Bork, P., Ponting, C. P., & Hofmann, K. (2008). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Science*, *6*(1), 249-253. http://doi.org/10.1002/pro.5560060128

Schumann, C. M., Bloss, C. S., Barnes, C. C., Wideman, G. M., Carper, R. A., Akshoomoff, N., … Courchesne, E. (2010). Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study of Cortical Development through Early Childhood in Autism. *Journal of Neuroscience*, *30*(12), 4419-4427. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5714-09.2010

Schumann, C. M., Hamstra, J., Goodlin-Jones, B., Lotspeich, L., Kwon, H., Buonocore, M., … Amaral, D. (2004). The Amygdala Is Enlarged in Children But Not Adolescents with Autism; the Hippocampus Is Enlarged at All Ages. *Journal of Neuroscience*, *24*(28), 6392-6401. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1297-04.2004

Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., … Wigler, M. (2007). Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science*, *316*(5823), 445-449. http://doi.org/10.1126/science.1138659

Serret, S., Thümmler, S., Dor, E., Vesperini, S., Santos, A., & Askenazy, F. (2015). Lithium as a rescue therapy for regression and catatonia features in two SHANK3 patients with autism spectrum disorder: case reports. *BMC Psychiatry*, *15*(1). http://doi.org/10.1186/s12888-015-0490-1

Setou, M., Seog, D.-H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., & Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*, *417*(6884), 83-87. http://doi.org/10.1038/nature743

Sharp, W. G., Berry, R. C., McCracken, C., Nuhu, N. N., Marvel, E., Saulnier, C. A., … Jaquess, D. L. (2013). Feeding Problems and Nutrient Intake in Children with Autism Spectrum Disorders: A Meta-analysis and Comprehensive Review of the Literature. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *43*(9), 2159-2173. http://doi.org/10.1007/s10803-013-1771-5

Shcheglovitov, A., Shcheglovitova, O., Yazawa, M., Portmann, T., Shu, R., Sebastiano, V., … Dolmetsch, R. E. (2013). SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature*. http://doi.org/10.1038/nature12618

Shen, Y., Dies, K. A., Holm, I. A., Bridgemohan, C., Sobeih, M. M., Caronna, E. B., … on behalf of the Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. (2010). Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders. *PEDIATRICS*, *125*(4), e727-e735. http://doi.org/10.1542/peds.2009-1684

Sheng, M., & Kim, E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci*, *113*(11), 1851-1856.

Sheridan, S. D., Theriault, K. M., Reis, S. A., Zhou, F., Madison, J. M., Daheron, L., … Haggarty, S. J. (2011). Epigenetic Characterization of the FMR1 Gene and Aberrant Neurodevelopment in Human Induced Pluripotent Stem Cell Models of Fragile X Syndrome. *PLoS ONE*, *6*(10), e26203.

http://doi.org/10.1371/journal.pone.0026203

Shimmura, C., Suda, S., Tsuchiya, K. J., Hashimoto, K., Ohno, K., Matsuzaki, H., … Mori, N. (2011). Alteration of Plasma Glutamate and Glutamine Levels in Children with High-Functioning Autism. *PLoS ONE*, *6*(10), e25340. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025340

Shimoda, Y., & Watanabe, K. (2009). Contactins: Emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adhesion & Migration*, *3*(1), 64.

Shipman, S. L., Schnell, E., Hirai, T., Chen, B.-S., Roche, K. W., & Nicoll, R. A. (2011). Functional dependence of neuroligin on a new non-PDZ intracellular domain. *Nature Neuroscience*, *14*(6), 718-726. http://doi.org/10.1038/nn.2825

Shiraishi, Y., Mizutani, A., Yuasa, S., Mikoshiba, K., & Furuichi, T. (2004). Differential expression of Homer family proteins in the developing mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, *473*(4), 582-599. http://doi.org/10.1002/cne.20116

Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., … Smith, A. (2009). Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*, *138*(4), 722-737. http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039

Silverman, J. L., Turner, S. M., Barkan, C. L., Tolu, S. S., Saxena, R., Hung, A. Y., … Crawley, J. N. (2011). Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. *Brain Research*, *1380*, 120-137. http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.026

Singh, N. N., Lancioni, G. E., Winton, A. S. W., Fisher, B. C., Wahler, R. G., Mcaleavey, K., … Sabaawi, M. (2006). Mindful Parenting Decreases Aggression, Noncompliance, and Self-Injury in Children With Autism. *Journal of Emotional and Behavioral Disorders*, *14*(3), 169-177. http://doi.org/10.1177/10634266060140030401

Smith, A., Wiles, C., Haan, E., McGill, J., Wallace, G., Dixon, J., … Trent, R. J. (1996). Clinical features in 27 patients with Angelman syndrome resulting from DNA deletion. *Journal of Medical Genetics*, *33*(2), 107.

Soufi, A., Donahue, G., & Zaret, K. S. (2012). Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome. *Cell*, *151*(5), 994-1004. http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.045

Spacek, J., & Harris, K. M. (1997). Three-Dimensional Organization of Smooth Endoplasmic Reticulum in Hippocampal CA1 Dendrites and Dendritic Spines of the Immature and Mature Rat. *The Journal of Neuroscience*, *17*(1), 190-203.

Speed, H. E., Kouser, M., Xuan, Z., Reimers, J. M., Ochoa, C. F., Gupta, N., … Powell, C. M.

(2015). Autism-Associated Insertion Mutation (InsG) of Shank3 Exon 21 Causes Impaired Synaptic Transmission and Behavioral Deficits. *Journal of Neuroscience*, *35*(26), 9648-9665. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3125-14.2015

Splawski, I. (2006). CACNA1H Mutations in Autism Spectrum Disorders. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(31), 22085-22091. http://doi.org/10.1074/jbc.M603316200

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M. J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., … Plath, K. (2009). Role of the Murine Reprogramming Factors in the Induction of Pluripotency. *Cell*, *136*(2), 364-377. http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.001

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science*, *322*(5903), 945-949. http://doi.org/10.1126/science.1162494

Star, E. N., Kwiatkowski, D. J., & Murthy, V. N. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature Neuroscience*, *5*(3), 239-246. http://doi.org/10.1038/nn811

Steffenburg, S., Gillberg, C., Hellgren, L., Andersson, L., Gillberg, I. C., Jakobsson, G., & Bohman, M. (1989). A Twin Study of Autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *30*(3), 405-416. http://doi.org/10.1111/j.1469-7610.1989.tb00254.x

Steffenburg, U., Hagberg, G., & Hagberg, B. (2001). Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatrica*, *90*(1), 34-39. http://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2001.tb00252.x

Steward, O., & Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience*, *2*(3), 284-291.

Stoeckli, E. T. (2010). Neural circuit formation in the cerebellum is controlled by cell adhesion molecules of the Contactin family. *Cell Adhesion & Migration*, *4*(4), 523-526. http://doi.org/10.4161/cam.4.4.12733

Strack, S., Robison, A. J., Bass, M. A., & Colbran, R. J. (2000). Association of Calcium/Calmodulin-dependent Kinase II with Developmentally Regulated Splice Variants of the Postsynaptic Density Protein Densin-180. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(33), 25061-25064. http://doi.org/10.1074/jbc.C000319200

Strang, J. F., Kenworthy, L., Daniolos, P., Case, L., Wills, M. C., Martin, A., & Wallace, G. L.

(2012). Depression and anxiety symptoms in children and adolescents with autism spectrum disorders without intellectual disability. *Research in Autism Spectrum Disorders*, *6*(1), 406-412. http://doi.org/10.1016/j.rasd.2011.06.015

Stuss, D. P., Boyd, J. D., Levin, D. B., & Delaney, K. R. (2012). MeCP2 Mutation Results in Compartment-Specific Reductions in Dendritic Branching and Spine Density in Layer 5 Motor Cortical Neurons of YFP-H Mice. *PLoS ONE*, *7*(3), e31896. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031896

Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, *455*(7215), 903-911. http://doi.org/10.1038/nature07456

Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K., & Okabe, S. (2005). Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nature Methods*, *2*(9), 677-684. http://doi.org/10.1038/nmeth783

Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.-Q., … Shih, A. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, *39*(3), 319-328. http://doi.org/10.1038/ng1985

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., … Mitalipov, S. (2013). Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell*, *153*(6), 1228-1238. http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*, *11*(19), 1553-1558. http://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00459-6

Tada, T., & Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(1), 95-101. http://doi.org/10.1016/j.conb.2005.12.001

Takahashi, H., Katayama, K., Sohya, K., Miyamoto, H., Prasad, T., Matsumoto, Y., … Craig, A. M. (2012). Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPδ trans-synaptic interaction. *Nature Neuroscience*, *15*(3), 389-398. http://doi.org/10.1038/nn.3040

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(3), 183-193. http://doi.org/10.1038/nrm.2016.8

Tanabe, K., Nakamura, M., Narita, M., Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2013). Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(30), 12172-12179. http://doi.org/10.1073/pnas.1310291110

Tanabe, K., Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2014). Induction of pluripotency by defined factors. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, *90*(3), 83-96. http://doi.org/10.2183/pjab.90.83

Tanaka, M., Duncan, R. S., McClung, N., Yannazzo, J.-A. S., Hwang, S.-Y., Marunouchi, T., … Koulen, P. (2006). Homer proteins control neuronal differentiation through IP_3 receptor signaling. *FEBS Letters*, *580*(26), 6145-6150. http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.013

Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., … Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, *83*(5), 1131-1143. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040

Tang, X., Zhou, L., Wagner, A. M., Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Gage, F. H., & Chen, G. (2013). Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, *11*(2), 743-757. http://doi.org/10.1016/j.scr.2013.05.002

Tani, P., Lindberg, N., Nieminen-von Wendt, T., von Wendt, L., Virkkala, J., Appelberg, B., & Porkka-Heiskanen, T. (2004). Sleep in Young Adults with Asperger Syndrome. *Neuropsychobiology*, *50*(2), 147-152. http://doi.org/10.1159/000079106

Tarabeux, J., Kebir, O., Gauthier, J., Hamdan, F. F., Xiong, L., Piton, A., … Krebs, M.-O. (2011). Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational Psychiatry*, *1*(11), e55. http://doi.org/10.1038/tp.2011.52

Terry-Lorenzo, R. T., Elliot, E., Weiser, D., Prickett, T., Brautigan, D., & Shenolika, S.

(2002). Neurabins Recruit Protein Phosphatase-1 and Inhibitor-2 to the Actin Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(48), 46535-46543. http://doi.org/10.1074/jbc.M206960200

Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., & Ostatnikova, D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior*, *138*, 179-187. http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.033

Toni, N., Buchs, P., Nikonenko, I., Bron, C., & Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature*, *402(6760):421-5*.

Tordjman, S., Anderson, G. M., Botbol, M., Toutain, A., Sarda, P., Carlier, M., … Verloes, A. (2012). Autistic Disorder in Patients with Williams-Beuren Syndrome: A Reconsideration of the Williams-Beuren Syndrome Phenotype. *PLoS ONE*, *7*(3), e30778. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030778

Torres, A. R., Sweeten, T. L., Cutler, A., Bedke, B. J., Fillmore, M., Stubbs, E. G., & Odell, D. (2006). The Association and Linkage of the HLA-A2 Class I Allele with Autism. *Human Immunology*, *67*(4-5), 346-351. http://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.01.001

Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., & Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, *420*(6917), 788-794. http://doi.org/10.1038/nature01273

Tropeano, M., Howley, D., Gazzellone, M. J., Wilson, C. E., Ahn, J. W., Stavropoulos, D. J., … Murphy, D. G. (2016). Microduplications at the pseudoautosomal *SHOX* locus in autism spectrum disorders and related neurodevelopmental conditions. *Journal of Medical Genetics*, *53*(8), 536-547. http://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103621

Tsuriel, S., Geva, R., Zamorano, P., Dresbach, T., Boeckers, T., Gundelfinger, E. D., … Ziv, N. E. (2006). Local Sharing as a Predominant Determinant of Synaptic Matrix Molecular Dynamics. *PLoS Biology*, *4*(9), e271. http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040271

Tu, H., Pinan-Lucarré, B., Ji, T., Jospin, M., & Bessereau, J.-L. (2015). C. elegans Punctin Clusters GABAA Receptors via Neuroligin Binding and UNC-40/DCC Recruitment. *Neuron*, *86*(6), 1407-1419. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.013

Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P., … Worley, P. F. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 Complexes by the Shank Family of Postsynaptic Density Proteins. *Neuron*, *23*(3), 583-592. http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80810-7

Turner, T. N., Sharma, K., Oh, E. C., Liu, Y. P., Collins, R. L., Sosa, M. X., … Chakravarti, A. (2015). Loss of δ-catenin function in severe autism. *Nature*, *520*(7545), 51-56. http://doi.org/10.1038/nature14186

Uchino, S., & Waga, C. (2013). SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain and Development*, *35*(2), 106-110. http://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.05.013

Uchino, S., & Waga, C. (2015). Novel Therapeutic Approach for Autism Spectrum Disorder: Focus on SHANK3. *Current Neuropharmacology*, *13*(6), 786-792. http://doi.org/10.2174/1570159X13666151029105547

Uemura, T., Mori, H., & Mishina, M. (2004). Direct interaction of GluRδ2 with Shank scaffold proteins in cerebellar Purkinje cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *26*(2), 330-341. http://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.02.007

Urbanska, M., Blazejczyk, M., & Jaworski, J. (2008). Molecular basis of dendritic arborization. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/?term=Molecular+basis+of+dendritic+arborization+urbanska

Vaags, A. K., Lionel, A. C., Sato, D., Goodenberger, M., Stein, Q. P., Curran, S., … Scherer, S. W. (2012). Rare Deletions at the Neurexin 3 Locus in Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*, *90*(1), 133-141. http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.025

Vanderklish, P. W., & Edelman, G. M. (2002). Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(3), 1639-1644. http://doi.org/10.1073/pnas.032681099

Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., … Brose, N. (2006). Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function. *Neuron*, *51*(6), 741-754. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.003

Verhoeven, W. M. A., Egger, J., Willemsen, De Leijer, & Kleefstra. (2012). Phelan-McDermid syndrome in two adult brothers: atypical bipolar disorder as its

psychopathological phenotype? *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 175. http://doi.org/10.2147/NDT.S30506

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, *463*(7284), 1035-1041. http://doi.org/10.1038/nature08797

Vijayakumar, N. T., & Judy, M. V. (2016). Autism spectrum disorders: Integration of the genome, transcriptome and the environment. *Journal of the Neurological Sciences*, *364*, 167-176. http://doi.org/10.1016/j.jns.2016.03.026

Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., … Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, *474*(7351), 380-384. http://doi.org/10.1038/nature10110

Volk, L., Chiu, S.-L., Sharma, K., & Huganir, R. L. (2015). Glutamate Synapses in Human Cognitive Disorders. *Annual Review of Neuroscience*, *38*(1), 127-149. http://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033821

Volkmar, F. R., & Nelson, D. S. (1990). Seizure Disorders in Autism. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, *29*(1), 127-129. http://doi.org/10.1097/00004583-199001000-00020

Vucurovic, K., Landais, E., Delahaigue, C., Eutrope, J., Schneider, A., Leroy, C., … Doco-Fenzy, M. (2012). Bipolar affective disorder and early dementia onset in a male patient with SHANK3 deletion. *European Journal of Medical Genetics*, *55*(11), 625-629. http://doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.07.009

Waga, C., Asano, H., Sanagi, T., Suzuki, E., Nakamura, Y., Tsuchiya, A., … Uchino, S. (2014). Identification of two novel *Shank3* transcripts in the developing mouse neocortex. *Journal of Neurochemistry*, *128*(2), 280-293. http://doi.org/10.1111/jnc.12505

Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A. C. F., Studer, L., & Mombaerts, P. (2001). Differentiation of Embryonic Stem Cell Lines Generated from Adult Somatic Cells by Nuclear Transfer. *Science*, *292*(5517), 740-743. http://doi.org/10.1126/science.1059399

Walikonis, R. S., Oguni, A., Khorosheva, E. M., Jeng, C.-J., Asuncion, F. J., & Kennedy, M. B. (2001). Densin-180 Forms a Ternary Complex with the α-Subunit of Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and α-Actinin. *The Journal of Neuroscience*, *21*(2), 423-433.

Walker, C. K., Krakowiak, P., Baker, A., Hansen, R. L., Ozonoff, S., & Hertz-Picciotto, I. (2015). Preeclampsia, Placental Insufficiency, and Autism Spectrum Disorder or Developmental Delay. *JAMA Pediatrics*, *169*(2), 154. http://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.2645

Wallace, G. L., Dankner, N., Kenworthy, L., Giedd, J. N., & Martin, A. (2010). Age-related temporal and parietal cortical thinning in autism spectrum disorders. *Brain*, *133*(12), 3745-3754. http://doi.org/10.1093/brain/awq279

Wallace, G. L., Robustelli, B., Dankner, N., Kenworthy, L., Giedd, J. N., & Martin, A. (2013). Increased gyrification, but comparable surface area in adolescents with autism spectrum disorders. *Brain*, *136*(6), 1956-1967. http://doi.org/10.1093/brain/awt106

Wang, S. S.-H., Kloth, A. D., & Badura, A. (2014). The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism. *Neuron*, *83*(3), 518-532. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.016

Wang, T., Warren, S. T., & Jin, P. (2013). Toward pluripotency by reprogramming: mechanisms and application. *Protein & Cell*, *4*(11), 820-832. http://doi.org/10.1007/s13238-013-3074-1

Wang, X., McCoy, P. A., Rodriguiz, R. M., Pan, Y., Je, H. S., Roberts, A. C., … Jiang, Y. -h. (2011). Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Human Molecular Genetics*, *20*(15), 3093-3108. http://doi.org/10.1093/hmg/ddr212

Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., … Rossi, D. J. (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*, *7*(5), 618-630. http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012

Wen, Z., Christian, K. M., Song, H., & Ming, G. (2016). Modeling psychiatric disorders with patient-derived iPSCs. *Current Opinion in Neurobiology*, *36*, 118-127. http://doi.org/10.1016/j.conb.2015.11.003

Wen, Z., Nguyen, H. N., Guo, Z., Lalli, M. A., Wang, X., Su, Y., … Ming, G. (2014). Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature*, *515*(7527), 414-418. http://doi.org/10.1038/nature13716

Werling, D. M., & Geschwind, D. H. (2015). Recurrence rates provide evidence for sex-differential, familial genetic liability for autism spectrum disorders in multiplex families and twins. *Molecular Autism*, *6*(1). http://doi.org/10.1186/s13229-015-

0004-5

Werling, D. M., Lowe, J. K., Luo, R., Cantor, R. M., & Geschwind, D. H. (2014). Replication of linkage at chromosome 20p13 and identification of suggestive sex-differential risk loci for autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, *5*(1), 13. http://doi.org/10.1186/2040-2392-5-13

Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P., & Jaenisch, R. (2008). c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell*, *2*(1), 10-12. http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.001

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., … Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, *448*(7151), 318-324. http://doi.org/10.1038/nature05944

Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., … Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(15), 5856-5861. http://doi.org/10.1073/pnas.0801677105

Willemsen, M. H., Rensen, J. H. M., van Schrojenstein-Lantman de Valk, H. M. J., Hamel, B. C. J., & Kleefstra, T. (2012). Adult Phenotypes in Angelman- and Rett-Like Syndromes. *Molecular Syndromology*. http://doi.org/10.1159/000335661

Williams, D. W., & Truman, J. (2004). Mechanisms of Dendritic Elaboration of Sensory Neurons in Drosophila: Insights from In Vivo Time Lapse. *Journal of Neuroscience*, *24*(7), 1541-1550. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4521-03.2004

Williams, R., Hauser, S., Purpura, D., DeLong, G., & Swisher, C. (1980). Autism and mental retardation: neuropathologic studies performed in four retarded persons with autistic behavior. *Archives of Neurology*, *37(12):749-53*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/?term=Autism+and+mental+retardation%3A+neuropathologic+studies+performed+in+four+retarded+persons+with+autistic+behavior.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, *385*(6619), 810-813. http://doi.org/10.1038/385810a0

Wilson, H., Wong, A., Shaw, S., Tse, W., Stapleton, G., Phelan, M., … McDermid, H. (2003).

Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *Journal of Medical Genetics*, *40(8):575-84*. Consulté à l'adresse https://connect.pasteur.fr/f5-w-687474703a2f2f7777772e6e6362692e6e6c6d2e6e69682e676f76$$/pubmed/?term=Molecular+characterisation+of+the+22q13+deletion+syndrome+supports+the+role+of+haploinsufficiency+of+SHANK3%2FPROSAP2+in+the+major+neurological+symptoms+Wilson+2003

Wöhr, M., Roullet, F. I., Hung, A. Y., Sheng, M., & Crawley, J. N. (2011). Communication Impairments in Mice Lacking Shank1: Reduced Levels of Ultrasonic Vocalizations and Scent Marking Behavior. *PLoS ONE*, *6*(6), e20631. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020631

Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., … Nagy, A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, *458*(7239), 766-770. http://doi.org/10.1038/nature07863

Won, H., Lee, H.-R., Gee, H. Y., Mah, W., Kim, J.-I., Lee, J., … Kim, E. (2012). Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature*, *486*(7402), 261-265. http://doi.org/10.1038/nature11208

Won, H., Mah, W., & Kim, E. (2013). Autism spectrum disorder causes, mechanisms, and treatments: focus on neuronal synapses. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *6*. http://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00019

Wong, C. C. Y., Meaburn, E. L., Ronald, A., Price, T. S., Jeffries, A. R., Schalkwyk, L. C., … Mill, J. (2014). Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Molecular Psychiatry*, *19*(4), 495-503. http://doi.org/10.1038/mp.2013.41

Woolfenden, S., Sarkozy, V., Ridley, G., Coory, M., & Williams, K. (2012). A systematic review of two outcomes in autism spectrum disorder - epilepsy and mortality: Review. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *54*(4), 306-312. http://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2012.04223.x

Worringer, K. A., Rand, T. A., Hayashi, Y., Sami, S., Takahashi, K., Tanabe, K., … Yamanaka, S. (2014). The let-7/LIN-41 Pathway Regulates Reprogramming to Human Induced Pluripotent Stem Cells by Controlling Expression of Prodifferentiation Genes. *Cell Stem Cell*, *14*(1), 40-52. http://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.001

Xiao, B., Cheng Tu, J., & Worley, P. F. (2000). Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(3), 370-374. http://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00087-8

Xie, H., Ye, M., Feng, R., & Graf, T. (2004). Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell*, *117*(5), 663-676. http://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00419-2

Xu, J., Zwaigenbaum, L., Szatmari, P., & Scherer, S. (2004). Molecular Cytogenetics of Autism. *Current Genomics*, *5*(4), 347-364. http://doi.org/10.2174/1389202043349246

Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., … Suzuki, N. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, *20*(23), 4530-4539. http://doi.org/10.1093/hmg/ddr394

Yang, C.-S., Li, Z., & Rana, T. M. (2011). microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA*, *17*(8), 1451-1460. http://doi.org/10.1261/rna.2664111

Yang, D. Y.-J., Beam, D., Pelphrey, K. A., Abdullahi, S., & Jou, R. J. (2016). Cortical morphological markers in children with autism: a structural magnetic resonance imaging study of thickness, area, volume, and gyrification. *Molecular Autism*, *7*(1). http://doi.org/10.1186/s13229-016-0076-x

Ye, H., Tan, Y. L. J., Ponniah, S., Takeda, Y., Wang, S.-Q., Schachner, M., … Xiao, Z.-C. (2008). Neural recognition molecules CHL1 and NB-3 regulate apical dendrite orientation in the neocortex via PTPα. *The EMBO Journal*, *27*(1), 188-200. http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601939

Yi, F., Danko, T., Botelho, S. C., Patzke, C., Pak, C., Wernig, M., & Sudhof, T. C. (2016). Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. *Science*, *352*(6286), aaf2669-aaf2669. http://doi.org/10.1126/science.aaf2669

Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., O'Shea, D. J., … Deisseroth, K. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, *477*(7363), 171-178. http://doi.org/10.1038/nature10360

Yoo, H. (2015). Genetics of Autism Spectrum Disorder: Current Status and Possible Clinical Applications. *Experimental Neurobiology*, *24*(4), 257.

http://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.257

Yoshihara, Y., De Roo, M., & Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology*, *19*(2), 146-153. http://doi.org/10.1016/j.conb.2009.05.013

Yoshimura, Y., Aoi, C., & Yamauchi, T. (2000). Investigation of protein substrates of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II translocated to the postsynaptic density. *Molecular Brain Research*, *81*(1-2), 118-128. http://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00170-4

Young-Pearse, T. L., & Morrow, E. M. (2016). Modeling developmental neuropsychiatric disorders with iPSC technology: challenges and opportunities. *Current Opinion in Neurobiology*, *36*, 66-73. http://doi.org/10.1016/j.conb.2015.10.006

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., … Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, *318*(5858), 1917-1920. http://doi.org/10.1126/science.1151526

Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(1), 24-34. http://doi.org/10.1038/nrn1300

Zahir, F. R., Baross, A., Delaney, A. D., Eydoux, P., Fernandes, N. D., Pugh, T., … Friedman, J. M. (2007). A patient with vertebral, cognitive and behavioural abnormalities and a de novo deletion of NRXN1. *Journal of Medical Genetics*, *45*(4), 239-243. http://doi.org/10.1136/jmg.2007.054437

Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., … Südhof, T. C. (2013). Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Neuron*, *78*(5), 785-798. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.029

Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., … Deng, H. (2008). Two Supporting Factors Greatly Improve the Efficiency of Human iPSC Generation. *Cell Stem Cell*, *3*(5), 475-479. http://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.002

Zhu, L., Wang, X., Li, X.-L., Towers, A., Cao, X., Wang, P., … Jiang, Y.-H. (2014). Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders. *Human Molecular Genetics*, *23*(6), 1563-1578. http://doi.org/10.1093/hmg/ddt547

Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2016). The Evolving Diagnostic and Genetic Landscapes of

Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Genetics*, *7*. http://doi.org/10.3389/fgene.2016.00065

Zielinski, B. A., Prigge, M. B. D., Nielsen, J. A., Froehlich, A. L., Abildskov, T. J., Anderson, J. S., … Lainhart, J. E. (2014). Longitudinal changes in cortical thickness in autism and typical development. *Brain*, *137*(6), 1799-1812. http://doi.org/10.1093/brain/awu083

Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., & Svoboda, K. (2009). Rapid Functional Maturation of Nascent Dendritic Spines. *Neuron*, *61*(2), 247-258. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.054

Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., & Gan, W.-B. (2005). Development of Long-Term Dendritic Spine Stability in Diverse Regions of Cerebral Cortex. *Neuron*, *46*(2), 181-189. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.001

ANNEXES

Articles :

Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites.

Mercati O. et al. 2012. *Biology Open*.

CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders.

Mercati O. et al. 2016. *Molecular Psychiatry.*

Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites

Oriane Mercati[1,2,3], Anne Danckaert[4], Gwénaëlle André-Leroux[5], Marco Bellinzoni[5], Laura Gouder[1,2,3], Kazutada Watanabe[6], Yasushi Shimoda[6], Régis Grailhe[7], Fabrice de Chaumont[8], Thomas Bourgeron[1,2,3] and Isabelle Cloëz-Tayarani[1,2,3,*]

[1]Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, 75015 Paris, France
[2]CNRS URA 2182 'Genes, synapses and cognition', Institut Pasteur, 75015 Paris, France
[3]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Human Genetics and Cognitive Functions, 75013 Paris, France
[4]Plate-Forme d'Imagerie Dynamique, Imagopole, Institut Pasteur, 75015 Paris, France
[5]Unité de Microbiologie Structurale, Institut Pasteur and CNRS UMR 3528, 75015 Paris, France
[6]Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan
[7]Neurodegeneration and Applied Microscopy, Institut Pasteur Korea, Geyonggi-do 463-400, South Korea
[8]Unité d'Analyse d'Images Quantitative, Institut Pasteur, 75015 Paris, France
*Author for correspondence (isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr)

Biology Open 2, 324–334
doi: 10.1242/bio.20133343
Received 12th October 2012
Accepted 28th November 2012

Summary

The neural cell-adhesion molecules contactin 4, contactin 5 and contactin 6 are involved in brain development, and disruptions in contactin genes may confer increased risk for autism spectrum disorders (ASD). We describe a co-culture of rat cortical neurons and HEK293 cells overexpressing and delivering the secreted forms of rat contactin 4–6. We quantified their effects on the length and branching of neurites. Contactin 4–6 effects were different depending on the contactin member and duration of co-culture. At 4 days in culture, contactin 4 and -6 increased the length of neurites, while contactin 5 increased the number of roots. Up to 8 days in culture, contactin 6 progressively increased the length of neurites while contactin 5 was more efficient on neurite branching. We studied the molecular sites of interaction between human contactin 4, -5 or -6 and the human Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Gamma (PTPRG), a contactin partner, by modeling their 3D structures. As compared to contactin 4, we observed differences in the Ig2 and Ig3 domains of contactin 5 and -6 with the appearance of an omega loop that could adopt three distinct conformations. However, interactive residues between human contactin 4–6 and PTPRG were strictly conserved. We did not observe any differences in PTPRG binding on contactin 5 and -6 either. Our data suggest that the differential contactin effects on neurite outgrowth do not result from distinct interactions with PTPRG. A better understanding of the contactin cellular properties should help elucidate their roles in ASD.

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0).

Key words: Contactin, Rat primary cortical neurons, 3D modeling, Co-culture between HEK cells and primary neurons, Neurite outgrowth, Neurite quantification, Protein tyrosine phosphatase receptor gamma

Introduction

The development and maintenance of neuronal networks depend on the differentiation of neurons and on the outgrowth and branching of their axons and dendrites. These processes are under the control of recognition molecules that interact with each other and involve phosphorylation steps of downstream protein effectors. Among these recognition molecules, the immunoglobulin superfamily of neural cell-adhesion molecules (Ig-CAMs) directly participates in brain development mechanisms as well as in synapse maturation and plasticity (Stoeckli, 2004). Contactins are a subfamily of Ig-CAMs. They represent major molecules for neuronal development and formation of synaptic contacts. Indeed, their roles in neuritogenesis, fasciculation of neurons, axonal and dendritic targeting, fine tuning of synapse formation and synaptic plasticity have been demonstrated (Murai et al., 2002; Shimoda and Watanabe, 2009; Stoeckli, 2010). The contactin subfamily consists of six structurally related members: contactin 1 (F3 or F9 or contactin), contactin 2 (TAG-1), contactin 3 (BIG-1), contactin 4 (BIG-2), contactin 5 (NB-2) and contactin 6 (NB-3). All contactins are attached at the cell membrane via a glycosylphosphatidyl inositol (GPI) anchor and lack intracellular domains. These proteins share 40–60% identity with each other at the amino acid sequence level (Ogawa et al., 1996; Shimoda and Watanabe, 2009). The extracellular part contains six Ig-like repeats similar to the Ig constant domains, followed by four fibronectin type III domains located closer to the plasma membrane. Like other GPI-linked proteins, active contactins exist in both membrane-bound and soluble forms (Rougon et al., 1994; Peles et al., 1995; Ye et al., 2011).

Biology Open

In rodents, contactins (Cntns) are expressed mainly in the central and/or peripheral nervous systems where they display distinct and partially overlapping patterns. For Cntn2, expression starts early in development while for other Cntns, it occurs mainly after birth (Shimoda and Watanabe, 2009; Zuko et al., 2011). Important roles have emerged for Cntns in different aspects of brain development and function. For example, Cntn1 has been shown to contribute to oligodendrocyte maturation (Hu et al., 2003). Its expression in specialized domains of myelinated fibers underlines its role in myelination (Gollan et al., 2003; Salzer et al., 2008; Labasque and Faivre-Sarrailh, 2010). Other Cntns have been less studied. Cntn4 acts as an axon guidance molecule in the mouse olfactory neural circuitry where it controls the establishment of odor maps (Kaneko-Goto et al., 2008). Cntn5 contributes to the development of glutamatergic neurons in the rat auditory brainstem (Toyoshima et al., 2009a), while Cntn6 orientates the growth of apical dendrites of deep layer cortical pyramidal neurons (Ye et al., 2008) and controls the normal projection and branching of axons of the corticospinal tract during development (Huang et al., 2012).

Molecular signaling of contactins is related to their structure. They contract heterophilic interactions with signaling partners or may serve as ligand themselves. Identified partners include amyloid precursor protein (APP), Notch and other Ig-CAMs such as CHL1 of the L1 family (Shimoda and Watanabe, 2009). Because of their role in neuronal development, a link with tyrosine phosphatases can be expected since these enzymes are also involved in such processes (Ensslen-Craig and Brady-Kalnay, 2004). Accordingly, recent data indicate that Cntn4, -5 and -6 selectively interact with the protein tyrosine phosphatase receptor gamma (Ptprg) through its carbonic anhydrase (CA) domain (Bouyain and Watkins, 2010a). The X-ray structure of the murine complex between the first four immunoglobulin (Ig) domains of Cntn4 and the CA domain of Ptprg has been solved. The key residues involved in the molecular interactions have been identified in mouse, but not in human (Bouyain and Watkins, 2010a).

Genetic studies of neuropsychiatric disorders have sparked off new interests in human contactins (CNTNs) and contactin associated proteins (CNTNAPs) because of their involvement in diseases such as autism spectrum disorders (ASD) (Burbach and van der Zwaag, 2009). Genetic alterations including copy number variants (CNVs) for *CNTN*3 (Morrow et al., 2008) *CNTN*4 (Glessner et al., 2009; Roohi et al., 2009; Cottrell et al., 2011), *CNTN*5 and *CNTN*6 (Saus et al., 2010; van Daalen et al., 2011) have been reported in ASD patients. Several reports have also linked the *CNTNAP2* gene, encoding for contactin-associated protein-like 2 (CASPR2), with ASD (Alarcón et al., 2008; Bakkaloglu et al., 2008). CASPR2 is a binding partner of CNTN2, and interestingly enough, its absence in mice reproduces the core autism-related behavioral deficits (Peñagarikano et al., 2011). Disruption of *CNTN* genes could alter the growth, branching and targeting of axons and dendrites in the brain of ASD patients. This is in accordance with the postulation of the long-range underconnectivity theory (Belmonte and Bourgeron, 2006; Geschwind and Levitt, 2007). Understanding more precisely how CNTNs differentially operate in the developing human brain has therefore become an important issue. Cntns share the properties to increase neurite outgrowth *in vitro* as demonstrated by distinct studies and types of neurons using simple contrast microscopy and manual counting.

For this study, we cultured large populations of rat primary cortical neurons in the presence of human embryonic kidney (HEK) cells for the delivery of soluble Cntns and set up an innovative automated quantitative analysis, with possible applications for mutational screening of Ig-CAM molecules in disease. We then investigated the effects of rat Cntn4, Cntn5 and Cntn6 on different aspects of neurite outgrowth. We also analyzed the molecular interactions of human PTPRG and human CNTN4, CNTN5 and CNTN6 by generating the 3D structures of each complex, respectively, using homology modeling and protein docking calculations. Finally, we tested the binding of a fusion protein of PTPRG on Cntn5 and -6 overexpressed in HEK cells. Our results show different increasing effects of Cntn4, Cntn5 and Cntn6 on neurite outgrowth and branching. We also observed significant differences in the structure of human CNTN5 and CNTN6 as compared to CNTN4, located at the crucial Ig2–Ig3 domains, with no direct consequence on PTPRG binding.

Results

A co-culture system of rat primary cortical neurons with transfected HEK293 cells for the measurement of neurite outgrowth

Primary rat cortical neurons were cultured in the presence of HEK293 cells transfected with a plasmid vector containing the cDNA of rat *Cntn4*, *Cntn5* or *Cntn6*. The respective proteins are GPI-anchored cell-adhesion molecules, the schematic structure of which is depicted in Fig. 1A. In transfected HEK293 cells, Cntn4, -5 and -6 proteins were almost exclusively expressed at membrane levels as shown by immunofluorescence experiments (Fig. 1B). Among HEK293 cell populations, the efficiency of transfection was found to be of 50% for each Cntn and remained constant in independent experiments (data not shown). Semi-quantitative analysis of fluorescence in permeabilized HEK293 cells revealed no statistical difference between the cell surface membrane and intracellular expression among the Cntns. Fluorescence at the plasmalemma accounted for 66–70%, and cytoplasm for 30–34% of total labeling for Cntn4, -5 and -6 proteins (Fig. 1C). Co-cultures of transfected HEK293 and MAP2-stained neurons are illustrated in Fig. 1D. Based on our observations, most of the neurons were not in direct contact with other cells. We can therefore assume that neurons elongated randomly without favoring contacts with surrounding cells. To determine whether the amounts of secreted forms of Cntns were proportional to the number of HEK293 cells, we performed Western blot analysis on HEK293 cell extracts and aliquots of culture supernatants. Two cell densities were used (Fig. 1E). We observed a single band for Cntn4, -5 and -6, at 130 kDa, corresponding to the expected size of these proteins. Our data clearly indicate that the amounts of secreted forms of Cntn4, -5 and -6 were directly related to cell densities, and therefore to the amount of anchored Cntn proteins at the level of cell membranes (Fig. 1E). Since the number of HEK293 cells apposed on neurons was kept identical in all conditions, the secreted forms of Cntns remained constant among independent cultures as illustrated in Fig. 1F. No secreted Cntn could be detected when neurons were cultured alone (Fig. 1F). To evaluate the concentration of secreted Cntns when overexpressed by HEK293, we loaded increasing amounts (0.5 to 25 ng) of commercialized mouse recombinant Cntn6 (R&D Systems, ref. 5890-CN) on gels and performed a Western blot analysis. As expected, signals from the

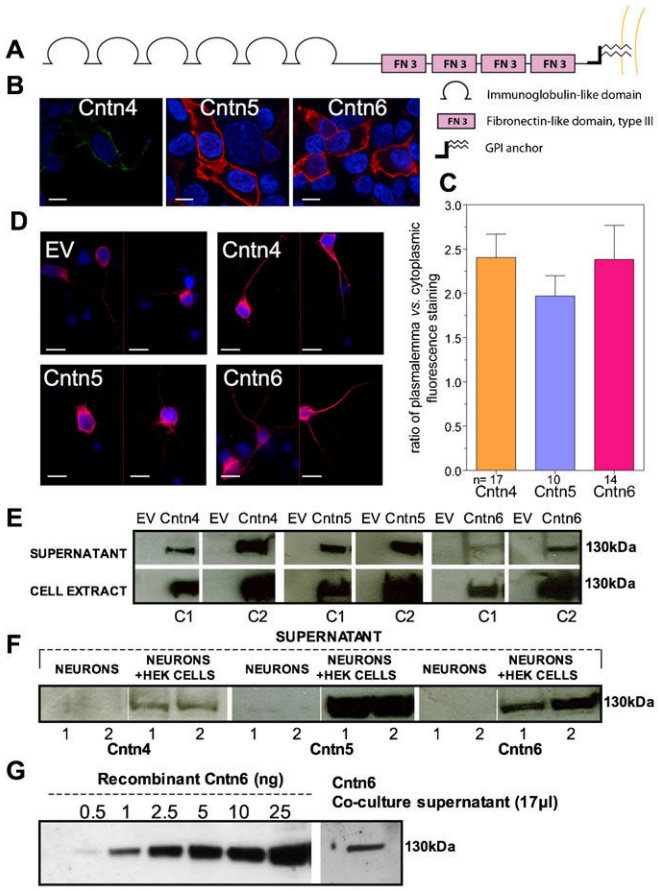


Fig. 1. Description of the co-culture system with analysis of secreted contactins. (**A**) Schematic structure of a contaction showing the six immunoglobulin-like domains and the four fibronectin-type III domains. The protein is attached to the membrane by a GPI moiety, and a soluble form is secreted upon GPI hydrolysis. (**B**) Membrane staining by immunofluorescence of non-permeabilized HEK293 cells after transfection with the *Cntn4*, *-5* or *-6* cDNA. Fixed cells were incubated with primary antibodies, then with Alexa 488-conjugated (Cntn4) and Alexa 594-conjugated (Cntn5 and -6) antibodies to Cntn as described in Materials and Methods. Scale bars=20 µm. (**C**) Semi-quantitative analysis of fluorescence in permeabilized HEK293 cells. Number of cells analyzed is indicated in the graphs. Values are the mean±s.e.m. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test. No significant difference was observed ($P>0.05$). (**D**) MAP2 staining of primary cortical neurons cultured in the presence of transfected HEK293 cells. In blue: DAPI nuclear staining. Some representative neurons are depicted in the absence and in the presence of Cntn4, Cntn5 or Cntn6. Note a higher ramification of neurons in the presence of Cntn5 as compared to Cntn4 and -6. Scale bars=20 µm. (**E**) Representative western blot of culture supernatants and HEK293 cell extracts for the detection of Cntn4, -5, and -6 proteins. Controls were obtained from HEK293 cells transfected with the empty vector (EV). Two cell densities (C1, C2) corresponding respectively to $\sim 1.5\times10^5$ and 3×10^5 cells were tested. (**F**) Representative western blot of co-culture supernatants. Rat cortical neurons were cultured in the presence of transfected HEK293 cells for 48–72 hours. No contactin proteins were detectable in the absence of HEK293 cells. Duplicates correspond to two independent co-cultures. (**G**) Western blot analysis of 0.5 to 25 ng of mouse Cntn6 and one aliquot of a co-culture supernatant for Cntn6. Exposure times were the same between all samples.

different amounts of Cntn6 were of increasing intensities (Fig. 1G). The signal intensity of the 17 µl-aliquot of a representative co-culture supernatant was close to the intensity of the 2.5 ng band. This suggests that under our experimental conditions, a concentration of Cntn4, -5 or -6 of at least 100 ng/ml could be raised and remains stable at least until 72 hours of co-culture (not shown).

Cntn4, -5 and -6 differentially increase the growth of rat primary cortical neurons

The automated quantification of neurite outgrowth was performed using the Acapella software as described in Materials and Methods. The sequential steps of analysis are depicted in Fig. 2. When primary neurons were co-cultured with HEK293 cells without Cntn expression, the length of the longest neurite and the numbers of roots and segments significantly increased between 4 and 6 days *in vitro* (DIV), and then they leveled off between 6 and 7–8 DIV (Fig. 3A). All neurons grew concomitantly in length and in branching as shown by plotting length *versus* roots and roots *versus* segments (Fig. 3B). In the latter graphs, slope values were calculated as an index of branching complexity. When neurons were co-cultured with HEK293 cells overexpressing the Cntns, increasing effects were observed on both neurite length and branching, but the effects were different depending on the Cntn member and duration of co-culture (Fig. 4A). At 4 DIV, Cntn4 and -6 significantly increased the length of the longest neurite, while Cntn5 increased the number of roots. All Cntns were increasing significantly the total number of segments per neuron. At 6 DIV, significant enhancing effects of Cntns were observed on the number of roots (Cntn4 and -6), on the length of the longest neurite (Cntn5 and -6), and on the total number of segments (Cntn5). At 7–8 DIV, slight increasing effects were observed for Cntn6 on the length of longest neurite and on the total number of segments. By contrast, Cntn4 and -5 did not display any significant effect on neurite elongation and branching. In the presence of Cntn4, -5 or -6, all neurons were growing concomitantly in length and branching as shown by plotting the number of roots *versus* the number of segments (supplementary material Fig. S1). Values for the Pearson's correlation coefficient and slope values were similar in all conditions between controls and Cntns (supplementary material Fig. S1).

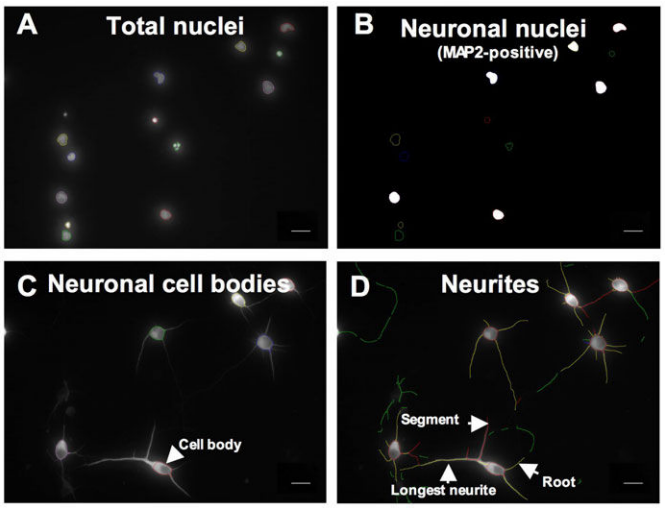


Fig. 2. Sequential automatic detection of neurite outgrowth and image processing by Acapella software (PerkinElmer). All cell nuclei are detected according to the DAPI staining (**A**). Neuronal nuclei are selected (**B**). Neuronal cell bodies are identified according to MAP2 staining (**C**). Neurites are identified and quantified (**D**). For quantification, all morphological parameters were measured under the same defined threshold conditions. Data are collected from at least 100 neurons. Neurons with no neurite were excluded. Scale bars = 20 µm.

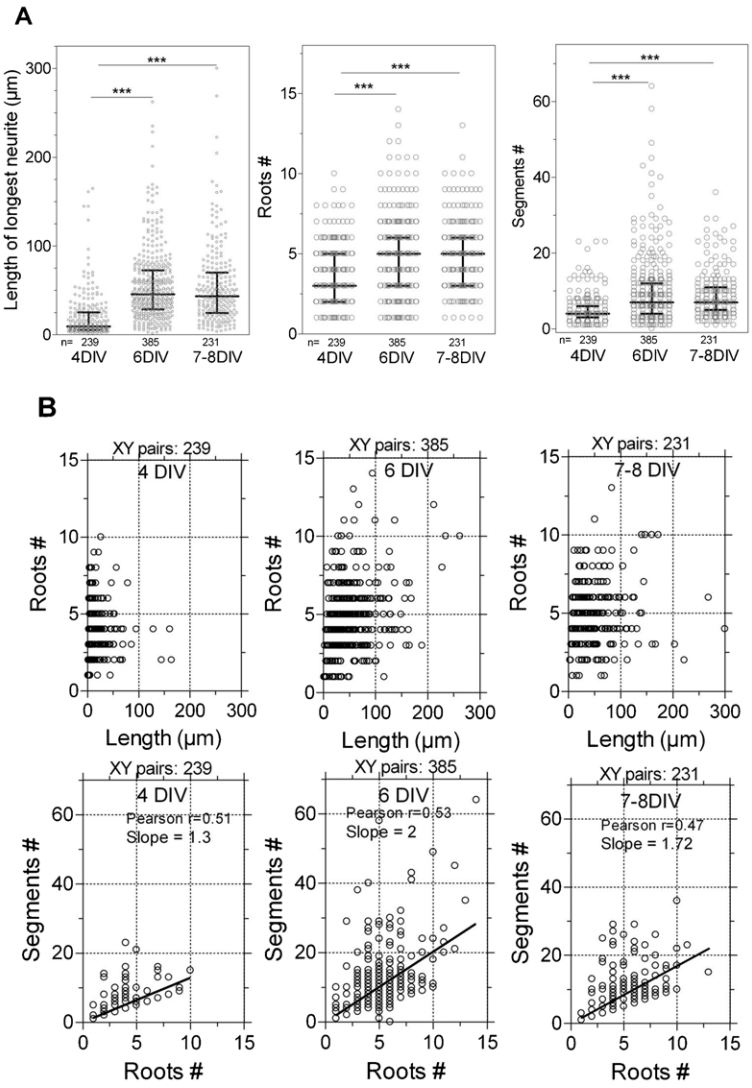


Fig. 3. Neurite outgrowth dynamics when cultured in the presence of HEK293 cells. Cultures of rat cortical neurons were established from newborn rats (P0–P1) as described in Materials and Methods. Neurons were kept for up to 8 days in culture (DIV). The same densities of HEK293 cells were added 48–72 hours before the end of culture, in all conditions (see Materials and Methods). The development of neuronal trees was followed over time. At the end of co-culture, neurons were fixed and immunostained with an anti-MAP2 antibody. (**A**) Quantification of neurite outgrowth parameters was performed using Acapella software. It includes the length of the longest neurite per neuron, the total number of roots, and the total number of segments. Graphs are scatter dot plots with a line at the median and the interquartile range. (**B**). Two-dimensional representations illustrating the evolution of neuronal trees over the different co-culture periods. Numbers of neurons analyzed are directly indicated in the graphs. The length of longest neurite *versus* number of roots and number of roots *versus* number of segments are represented. Slopes values and Pearson's correlation coefficients are indicated in the graphs. When primary neurons were co-cultured with HEK293 cells without Cntn expression, the length of the longest neurite, and the numbers of roots and segments increased significantly between 4 and 6 DIV and then leveled off between 6 and 7–8 DIV. Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test. ***$P<0.001$.

Homology modeling of Ig domains 1–4 of human CNTN4, -5 and -6 and docking analysis of their respective interface with the CA domain of human PTPRG

The two-dimensional alignment of human CNTN4$^{Ig1–4}$, -5$^{Ig1–4}$ and -6$^{Ig1–4}$ with the homologous mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ as a reference sequence is depicted in Fig. 5A. Models of human CNTN4$^{Ig1–4}$, -5$^{Ig1–4}$ and -6$^{Ig1–4}$ were obtained using the solved X-ray structure of the mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ as 3D template (Fig. 5C). We observed an almost complete superimposition of the human CNTN4, -5 and -6 structures, except at one location for human CNTN5 and -6 as compared to mouse Cntn4 and human CNTN4. A loop with an omega shape was produced (Fig. 5C, middle and right panels). This was due to the insertion of two amino acid residues in human CNTN5 and -6 structures at positions V239 and V166, respectively (Fig. 5B). The conformational flexibility of the CNTN5 omega loop (Ω loop) was evidenced as the Ω loop clustered into three discrete positions, i.e. "up", "down" and "twist-up", among the 50 models generated. However, the "up" position appeared as a more stable conformational state when compared to the two other positions (Fig. 5C; supplementary material Movie 1). The carbonic anhydrase domain of human PTPRG (PTPRG^{CA}) was first modeled by using the mouse Ptprg^{CA} as a reference sequence and the 3D template of the complex of mouse Cntn4$^{Ig1–4}$/Ptprg^{CA} (Fig. 6A). Complexes between CNTN$^{Ig1–4}$ and PTPRG^{CA} appeared to be strongly stabilized through the alignment of β-sheet structures in both partners, in a close vicinity of the Ω loop (Fig. 6B). Each complex between human CNTN4, -5 and -6 and human PTPRG^{CA} was then modeled and optimized through energy minimization. A summary of the interface characteristics (surface of interaction, energy, hydrogen bonds and salt bridges) for each model is provided in Table 1. Contacts between Ptprg^{CA} and Cntn are restricted to Ig domains 2 and 3 and involve the same two discrete segments, including residues 129–142 in Ig2 and 220–228 in Ig3 (mouse Cntn4 (Bouyain and Watkins, 2010a)). Corresponding segments for human CNTNs were residues 130–141 in Ig2 and 220–250 in Ig3 (CNTN4), residues 203–215 in Ig2 and 295–325 in Ig3 (CNTN5) and residues 130–142 in Ig2 and 222–252 in Ig3 (CNTN6). The corresponding amino acids involved in the CNTN$^{Ig1–4}$/PTPRG^{CA} interaction were found to be strictly identical for CNTN4, -5 and -6 (Fig. 6C), strongly indicating an identical interaction of human CNTN4, -5 and -6 with PTPRG^{CA}.

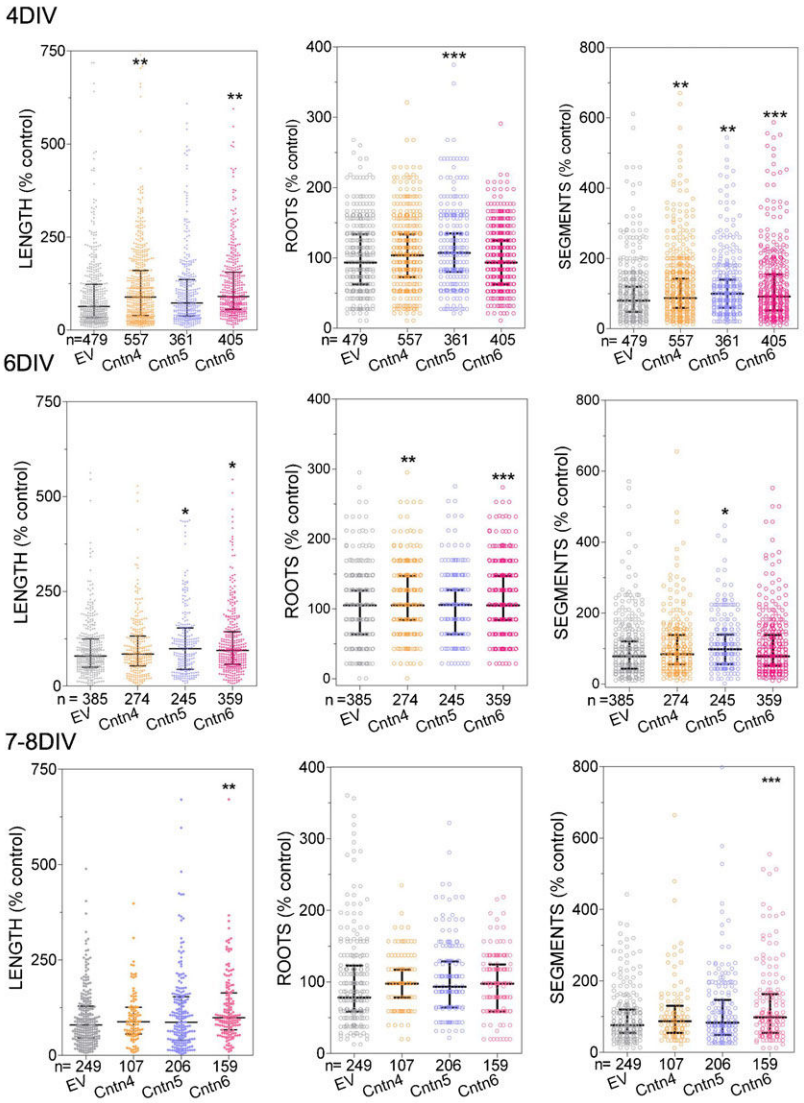


Fig. 4. Comparative effects of secreted Cntn4, -5, and -6 on neurite outgrowth in rat cortical neurons at different intervals of culture time. Cultures of rat cortical neurons were established from newborn rats (P0–P1) as described in Materials and Methods. Neurons were kept for up to 8 DIV. The same densities of HEK293 cells were added 48–72 hours before the end of culture, in all conditions (see Materials and Methods). The length of the longest neurite per neuron, the total numbers of roots and segments were followed over time in all conditions. At the end of culture, neurons were fixed and immunostained with an anti-MAP2 antibody. Quantification was performed using Acapella software. Numbers of neurons analyzed are indicated in each graph. Scatter dot plots with a line at the median and the interquartile range are represented. Data are expressed as percent of control mean obtained in the absence of Cntn. Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test. $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$. At early stages of growth, increasing effects of Cntn4 and -6 were pronounced on the length of the longest neurite (referred to as the length in graph abcissa). By contrast, increasing effects of Cntn5 were more pronounced on the number of roots and segments as an index of arborization.

Ptprg–Fc equally binds to the Cntn5 and Cntn6 over-expressed in HEK293 cells

In agreement with our modeling studies, we observed a significant binding of Ptprg–Fc to overexpressed rat Cntn5 and Cntn6 by HEK293 cells, as compared to HEK293 cells with no Cntn expression (Fig. 7A). Semi-quantitative analysis indicate that binding was of the same rank of order between Cntn5 and Cntn6 (Fig. 7B).

Discussion

Our study describes an efficient co-culture assay and an automated quantification method for the analysis of neurite outgrowth in cultured neurons and their morphological aspects including neurite length, and branching complexity, as a function of time. This assay provides an accurate analysis of a high number of cells allowing the detection of even subtle morphological variations in neurons. We applied this technique to analyze the effects of three members of the contactin family (Cntn4, -5, -6), a subgroup of cell-adhesion molecules that play essential roles in the development of neuronal circuits. We took advantage of the fact that contactins are GPI-anchored proteins, sorted into lipid rafts before transport to the membrane surface (Sharom and Lehto, 2002), and secreted into the extracellular matrix of cells. Their secretion is mediated by the activation of extracellular phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC), an enzyme that controls the surface expression and functional properties of GPI-anchored proteins (Ting and Pagano, 1991). Eight PI-PLC isoforms are expressed in HEK293 cells, and in the case of overexpression of a calcium sensor, an upregulation of one selective isoform, namely the PI-PLC-δ2 can be observed (Sharom and Lehto, 2002). Calcium signaling is therefore expected to control the PI-PLC activity and also the externalization of contactins as clearly demonstrated for the F3/contactin member (Pierre et al., 2001).

Neuritogenesis is a complex dynamic process combining neurite outgrowth and branching. Outgrowth results from the elongation and retraction of neurites with a concomitant rapid cytoskeleton reorganization at the growth cone (Valtorta and Leoni, 1999). In a first series of experiments, we followed the dynamics of neurite growth and branching, in the absence of Cntn, and at early stages of neuritogenesis. For this purpose, we used the exclusive labeling of dendritic trees of rat cortical

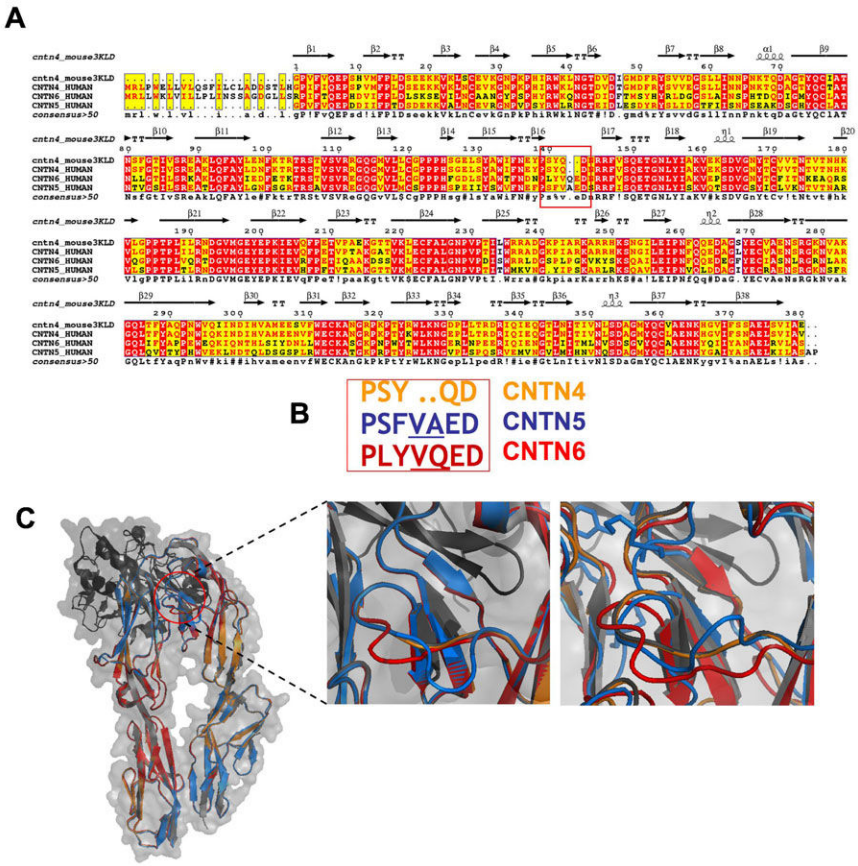


Fig. 5. Superimposed models of human CNTN4$^{Ig1–4}$, -5$^{Ig1–4}$, and -6$^{Ig1–4}$. (**A**) Two-dimensional alignment of human CNTN4$^{Ig1–4}$, CNTN5$^{Ig1–4}$, and CNTN6$^{Ig1–4}$ with the homologous mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ (reference sequence: 3KLD FASTA and pdb). (**B**) Amino acid sequences in the Ω loop present at the Ig2–Ig3 interfaces in CNTN4, -5 and -6. An insertion of two amino acids is present in CNTN5$^{Ig1–4}$ and CNTN6$^{Ig1–4}$ as compared to CNTN4$^{Ig1–4}$. (**C**) Structures of CNTN4$^{Ig1–4}$ (in yellow), CNTN5$^{Ig1–4}$ (in blue) and CNTN6$^{Ig1–4}$ (in red) after homology modeling using the Cntn4$^{Ig1–4}$ as a template (Bouyain and Watkins, 2010a). Higher magnification of the Ω loop for CNTN5 with two structural positions (down in left panel and up in right panel). Structural images were generated using PyMOL (http://www.pymol.org).

neurons with an anti-MAP2 antibody. The extent of neurite outgrowth depends on the density of cells, and the constituents of culture medium including the growth factors. Therefore, to obtain reproducible results, the conditions under which the cells were grown were kept identical in all experiments. Neurons were co-cultured with HEK293 cells transfected with the empty vector with no Cntn expression. In these control conditions, a rapid growth and branching of neurites was observed until day 6 of culture, which slowed down thereafter. The growth amplitude, the number of branching points and the growth kinetics are in agreement with the recent results published by Hocquemiller et al. who used mouse cortical neurons obtained from E17 mouse embryos (Hocquemiller et al., 2010). This suggests that the presence of HEK293 did not significantly modify the growth parameters of cortical neurons.

In a second set of experiments, we analyzed the presence of Cntns at HEK293 cell surface and in culture supernatants. Immunofluorescence in permeabilized cells allows detecting both the surface and intracellular immunoreactivities. For each Cntn member, a proportional relationship could be observed between Cntn levels in supernatants and at the membrane of HEK293 cells. In addition, the level of each Cntn remained constant among the culture medium in independent experiments and between 48 and 72 hours of co-culture (data not shown). These observations strongly suggest a rapid turnover of Cntns and the lack of their accumulation in culture medium. For the purpose of this study, we considered cultivating neurons in the presence of transfected HEK293 cells instead of adding the HEK293 supernatants to the cultured neurons. Our aim was to maintain the neurons in their optimal growth conditions with neuronal medium and such a protocol had no apparent effect on the survival of HEK293 cells. In our cultured neurons, intracellular signaling pathways were successfully activated during shorter periods of exposition (<2 hours) in the presence of HEK293 cell supernatants containing soluble Cntns (unpublished data). In the absence of HEK293 cells, neurons do not secrete detectable amount of Cntns. Consequently, only a negligible amount of Cntns from neurons, which were not detectable by Western blotting, may have been released. This may also suggest that the density of anchored Cntns is much smaller in neurons than in transfected HEK293 cells. Anchored CAM-molecules, including the contactins, signal through heterophilic binding with distinct partners, and may also function as secreted ligands for receptor partners. For example, secreted forms, which remain folded and functional, have been described for the L1 cell adhesion glycoprotein (Gouveia et al., 2007). Such forms are able to contract both homophilic and heterophilic interactions with different partners. In the case of Cntn2 in rat (TAG-1), a membrane protein has been shown to be developmentally regulated in primary neuronal cell cultures, whereas a secreted protein persists over time (Karagogeos et al., 1991). Cntn2 in chicken (Axonin-1) has also been proposed to be released from dorsal root ganglia neurons (Lierheimer et al., 1997). Based on these observations, functional Cntn4, -5, and -6 are expected to be secreted after hydrolysis from the HEK293 cell surface. In our experiments, levels of Cntns in supernatants seemed to reach concentrations that have been shown to be high enough to enhance neurite outgrowth (Yoshihara et al., 1995; Sakurai et al.,

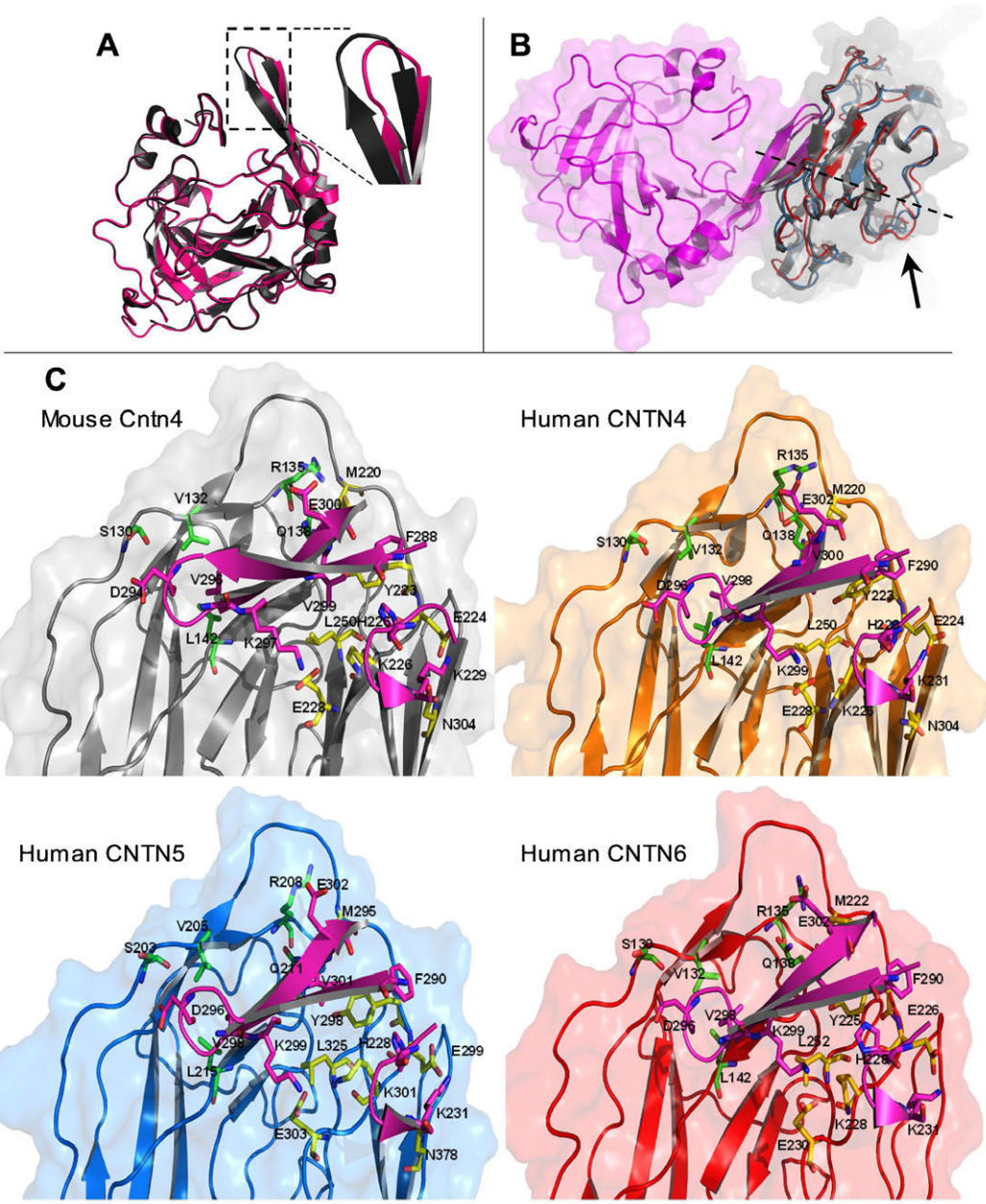


Fig. 6. Zoom magnification of the binding interfaces of the Ig-like domains of human CNTN4, -5 and -6 with the human PTPRG^{CA}. (**A**) Overlay of the carbonic anhydrase (CA) domain of mouse Ptprg with a model of the CA of human PTPRG obtained from the reference sequence of the mouse Ptprg with a specific focus on the β-hairpin (inset). Structural images were generated using PyMOL (http://www.pymol.org). (**B**) Alignment of the β-sheet structures within the complex between human CNTN$^{Ig1–4}$ and PTPRG^{CA} symbolized with the dotted line. Arrow indicates the close vicinity of the Ω loop. (**C**) Comparative surface representations of the four Ig-like domains of human CNTN4, -5, and -6 with binding of PTPRG. The same orientations are represented. Residues are shown as balls and sticks. Residues from CNTN^{Ig2}, CNTN^{Ig3} and PTPRG^{CA} are in green, yellow, and magenta, respectively, as presented in Bouyain and Watkins for mouse Cntn4 (Bouyain and Watkins, 2010a). Cntn4 is in gray, CNTN4 in yellow, CNTN5 in blue, and CNTN6 in red. Structural images were generated using PyMOL (http://www.pymol.org).

1997; Lee et al., 2000; Ogawa et al., 2001). As expected, the levels of secreted Cntns could be related to the number of HEK cells. At culture stages, prior to 8 days (8 DIV), the contacts between neuronal cells were not predominant suggesting that the effects were due to the Cntns secreted by HEK293 cells. This does not depend on surrounding neurons, which, as discussed above, do not secrete detectable levels of Cntns. These contacts may also depend on cell densities. Higher numbers of neurons could increase the number of contacts that could be sporadically observed in our co-culture. Moreover, we could not clearly detect the existence of true contacts between HEK cells and neuronal dendrites with the presence of punctae as putative synaptic

Table 1. Predicted parameters of interfaces between human CNTN$^{Ig1–4}$ and PTPRG^{CA}.

	Surface (Å)	delta G (kcal/mol)	H bonds	Salt bridges
Human [CNTN4_3KLD]	828	−7.1	3	4
Complex minimization	845	−5.5	10	13
Human [CNTN5_3KLD]	780	−9.6	7	5
Complex minimization	864	−9.0	8	5
Human [CNTN6_3KLD]	854	−9.0	8	5
Complex minimization	864	−3.6	15	9

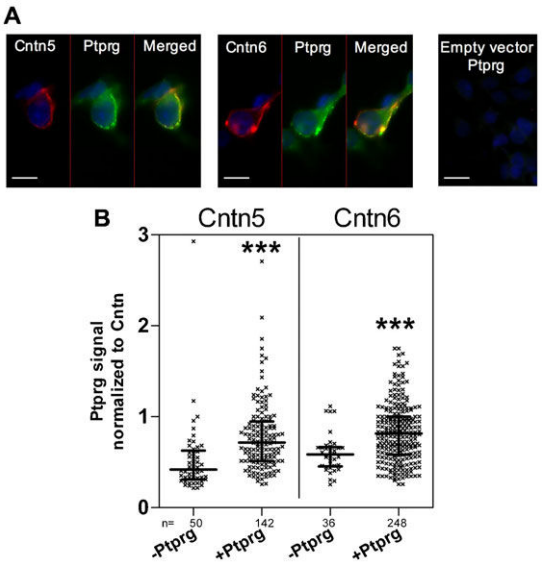


Fig. 7. Binding of Ptprg to HEK293 cells expressing the rat Cntn5 or Cntn6. HEK293 cells were transfected either with *Cntn5* or *Cntn6* cDNAs. Two days post-transfection, cells were incubated with Ptprg–Fc according to the protocol described in Materials and Methods. (**A**) In left and middle panels, red signals correspond to Cntn5 and -6, expressed at cell membranes. For Ptprg, positive labeling appears as lines of dots (green). Scale bars=20 µm. Right panel represents labeling in the absence of Cntn (empty vector) indicating no significant background in the absence of Ptprg binding. Note that the lines of dots are no longer visible. Scale bar=40 µm. (**B**) Semi-quantification of fluorescent signals in the absence and in the presence of Ptprg. Binding signals were normalized to Cntn fluorescence for each cell. Numbers of neurons analyzed are indicated in the graphs. Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test. ***$P<0.001$.

boutons between cell types (neuron–neuron and neuron–glia/HEK293 cell).

We analyzed the effects of Cntn4, -5 and -6 and observed a significant increasing effect on neurite elongation and branching, as compared to conditions without Cntn. Our data are in agreement with previous observations showing that both substrate-bound and soluble forms of recombinant proteins of Cntn6 have a neurite outgrowth promoting effect on cortical neurons (Lee et al., 2000). Cntn5 has also been shown to increase neurite outgrowth in cerebral cortical neurons, but not in hippocampal neurons (Ogawa et al., 2001). Recombinant Cntn4 has been reported to promote neurite outgrowth when used as a substrate for neurons *in vitro* (Yoshihara et al., 1995). By contrast, Cntn4 has been reported to either reduce or display no effect on the axonal outgrowth of RGC axons, based on growth-matrix composition in protein partners (i.e. APP, NgCAM) and concomitant interactions (Osterfield et al., 2008). The effects of Cntn4 and -6 on branching parameters have not been reported previously.

Our data show distinct increasing effects between Cntn4, -5 and -6 on neuritogenesis. The effects of Cntn4 and -6 were more pronounced on neurite elongation and that of Cntn5 on branching. Cntn4 and -6 led to an increase in length and in the number of segments for the first stages of growth (at 4 DIV), then in the number of roots (at 6 DIV). By contrast to Cntn6, Cntn4 did not promote neurite elongation and branching at later stages of growth. Cntn5 selectively increased the number of roots at early stages of growth and promoted more progressively their branching. Such differences between Cntns effects could be related to the differential brain expression of each member and/or distinct signaling mechanisms. More widespread distributions of Cntn4 and -6 in the brain have been reported previously (Kaneko-Goto et al., 2008; Lee et al., 2000). By contrast, Cntn5 is specifically expressed in the auditory pathway (Toyoshima et al., 2009a) presenting complex neuronal organizations and dendritic morphologies (Okoyama et al., 2006).

Cntn functions are mediated by heterophilic protein interactions but the precise molecular mechanisms involved in their effects on neurite outgrowth have not been identified yet. Given that the Cntns do not possess any transmembrane and/or cytoplasmic domains, their ability to modulate neurite outgrowth may be dependent on their extracellular domains and adhesive properties. It may also involve other molecules and receptors that can transduce signals to cytoplasm.

Among possible signaling partners, Cntns have been shown to interact with amyloid precursor protein (APP) (Osterfield et al., 2008; Shimoda et al., 2012), Notch (Cui et al., 2004), and other Ig-CAMs. For example, the neural close homolog of L1 (CHL1) can associate with Cntn6 and both molecules interact with the protein tyrosine phosphatase alpha (PTPα), to regulate apical dendrite orientation in the developing caudal cortex (Ye et al., 2008). Of particular interest is that the three Cntn4, -5 and -6 have been recently shown to selectively interact with the protein tyrosine phosphatase gamma (Ptprg) (Bouyain and Watkins, 2010a). Using Ptprg knockout-LacZ transgenic mice, the expression of Ptprg was observed in the developing and adult brains, and this was restricted to pyramidal neurons in the adult mouse (Lamprianou et al., 2006). With the production of anti-Ptprg monoclonal antibodies, the expression of Ptprg in mouse cortical and hippocampal neurons has recently been evidenced presynaptically (Y.S., unpublished data). One can reasonably assume that rat cortical and hippocampal neurons would also express this protein. PTPRG is thought to mediate important signaling events through its tyrosine-specific phosphatase activity (Paul and Lombroso, 2003). PTPRG is therefore expected to control tyrosine dephosphorylation by contactin members. Accordingly, PTPRG has been shown to inhibit NGF-mediated neurite outgrowth of PC12D cells (Shintani et al., 2001); however, its specific role in neuritogenesis has not yet been clearly established.

Molecular and crystal structure analyses revealed that the first four immunoglobulin domains of Cntn structures are folded in a specific horseshoe-like structure. The PTPRG binding sites are located in the CA domain of this protein and contact at the second and third immunoglobulin domains of mouse Cntn4 (Bouyain and Watkins, 2010a).

We hypothesized that the differential effects of Cntn4, -5 and -6 on neuritogenesis could be partly explained by distinct binding properties that these molecules may have on the hairpin loop of the extracellular $PTPRG^{CA}$. The crystal structures of chicken and human contactin 2 (TAG-1) have been analyzed (Freigang et al., 2000; Mörtl et al., 2007). By contrast, the X-ray structures of human CNTN4–6 have not been identified yet. Only the first four Ig-like domains of mouse Cntn4 have been registered in the Protein Data Bank. We therefore built a model of the Ig1–4 domains for each of the human CNTN4, -5 and -6. We then identified the residues present at the interfaces between the CNTN domains and human $PTPRG^{CA}$. We chose the human sequences rather than rat sequences for a possible extrapolation of our data to human physiopathology.

Our data clearly indicate that the entire structure of human CNTN4$^{Ig1–4}$ can be superimposed to the mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ whereas the human CNTN5$^{Ig1–4}$ and -6$^{Ig1–4}$ could not be fully superimposed to mouse and human CNTN4. Indeed, an insertion of an Ω loop was observed located at the interface between the Ig2 and Ig3 domains of human CNTN5 and -6, and predicted to be flexible (supplementary material Movie 1). The strong stability of Ig2 and Ig3 domains of human CNTN4 has been related to cellular functions of this protein (Mikulska et al., 2011). Since these domains interact directly with PTPRG^{CA}, it is possible that the presence of a flexible Ω loop in human CNTN5 and -6 within Ig2 and Ig3 domains, even if located quite remote from the interaction site, could have a functional relevance through its connectivity with the β strands of Ig3. For example, this plasticity could slightly modulate the binding affinity of human CNTN5 and -6 for PTPRG and thus modify its intracellular phosphatase activity. The residues that participate in the interactions between human PTPRG^{CA} and each human CNTN were found to be identical, and they were also identical to residues participating in the interaction between the murine Ptprg^{CA} and Cntn4$^{Ig1–4}$. We then measured the binding of Ptprg–Fc to rat Cntn5 and -6, when overexpressed by HEK293 cells. We did not find any significant modification in the intensity of Ptprg binding between the two Cntns. Our data strongly suggest that the differences in neurite outgrowth properties of Cntns that we observed in this study are not the consequence of molecular changes at Ptprg–Cntn interfaces. For Cntn5 and -6, they do not seem to result from changes in PTPRG binding capacities either. The mechanisms by which CNTN and PTPRG mediate their effects, locally or not, at cell membranes are far from being understood. It has been proposed that CNTN could facilitate the formation of PTPRG dimers with a resulting inhibition of its phosphatase activity (Bouyain and Watkins, 2010b). Alternatively, PTPRG and CNTN could function independently from phosphatase activity and rather promote the scaffolding of molecular signaling complexes (Bouyain and Watkins, 2010b). Such complexes could involve different partners among the CNTN members. In addition, the intracellular signaling pathways that are known to modulate neurite outgrowth and morphology of neurons could also be differentially activated by the CNTN members, independently from PTPRG. Finally, it should be noted that PTPRG could signal in a bidirectional manner, involving both phosphatase and carbonic anhydrase enzymatic activities.

In conclusion, we have developed an automated quantitative analysis of neuronal development that allows a more rapid screening of morphological characteristics with a high degree of accuracy and reproducibility. This method is particularly useful for the mutational screening of Ig-CAM molecules in disease since it circumvents the time-consuming purification and testing of each single mutated molecule if a coating procedure on slide would be retained. Our quantitative analysis of neuron morphology may be used to study various factors that could influence the development and functions of neurons that may be associated to brain disorders such as ASD. Our data show slight differences in the properties of Cntn4, -5 and -6 on neurite outgrowth that do not appear to be related to PTPRG. CNTN signaling is considered to be a very complex and cell-specific process. The identification of CNTN4, -5 and -6 protein networks, which may involve PTPRG, would be necessary to better understand their respective roles during neuritogenesis and brain wiring.

Materials and Methods

Animals

Pregnant Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Animals were housed in individual cages from weaning under a 12-hour light–dark cycle and controlled temperature (21℃) with water and food *ad libitum*. Adequate measures were taken to minimize pain or discomfort and experiments were carried out following the guidelines of the European Communities Council (86/609/EEC).

Cell culture procedures

HEK293 cells

HEK293 cells were cultured in Minimum Essential Medium (MEM) containing 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine (Invitrogen™, Life technologies SAS, Saint-Aubin, France) and 10% fetal calf serum (ref. CVFSVF00-01, Eurobio, Courtaboeuf, France) in a 5% CO_2 incubator at 37℃. Cells were grown in 100 mm Petri dishes. The day before transfection, cells were trypsinized, suspended in fresh medium and plated in 6-well plates containing glass coverslips. Coverslips were previously coated with 0.1 mg/ml of poly-L-Lysine (ref. P6282, Sigma–Aldrich Chimie, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were transfected either with rat Cntn4, Cntn5 or with Cntn6 cDNA sequences cloned in pcDNA3.1 vector (GenBank accession numbers for rat Cntn4, Cntn5 and Cntn6 are U35371, D87212 and D87248, respectively) using the jet PRIME® kit and according to the manufacturer's protocol (ref. POL114-15 Polyplus-transfection™ SA, Illkirch, France). At the end of transfection, 2–3×10^5 HEK293 cells per confluent 35 mm well were obtained. For co-culture assays and 24 hours post-transfection, cells were collected with neuronal culture medium containing 2 µM of Arabinofuranosylcytosine (Ara-C) (ref. C6645, Sigma–Aldrich, Chimie) kept warmed at 37℃. 2.5×10^5 HEK293 cells per ml of neuronal culture medium were seeded at the top of the neurons in culture (see below). For kinetics, HEK293 cells and neuronal cells were co-cultured for 48–72 hours before the fixation of cells (see below).

Primary rat cortical neurons

Primary rat cortical neurons enriched in hippocampal cells were prepared from newborn (P0–P1) Sprague-Dawley rats. Cortical and hippocampal tissues were dissected in HBSS/20 mM Hepes medium (ref. 14180-046 and 15630-049, Life technologies SAS). Tissues were then minced gently, digested with sterile papain (20 U/mL) (ref. LS003126, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA) in HBSS/Hepes for 10 minutes at 37℃, rinsed three times with HBSS/Hepes and then triturated in the presence of 1 mg/ml of DNase I for 5 minutes. After decantation, supernatants with dissociated neuronal cells were collected and diluted in Neurobasal medium® (ref. 21103-049, Life technologies SAS) supplemented with 1× B27®-supplement (Gibco®-Life Technologies SAS, France), L-glutamine (2 mM) and penicillin/streptomycin. Cells were counted using the Countess® automated cell-counter (Invitrogen™, Life technologies SAS, France) and plated at a density of 4×10^5 cells per mL onto poly-ornithine-coated (40 µg/mL; ref. P8638, Sigma–Aldrich Chimie) coverslips in 6-well plates. After 4 hours, the culture medium was replaced with fresh medium. Neurons were cultured for 2, 4 or 5–6 days before adding HEK293 cells.

Immunofluorescence

Immunofluorescence labeling on HEK293 cells was performed either in non-permeabilized or permeabilized conditions, in 6-well plates, 24 to 48 hours after transfection. Cells were fixed in the presence of 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature (RT) and washed 3 times in PBS. Cells were either directly saturated for 30 minutes in PBS containing 10% horse serum (ref. 16050-130, Life Technologies SAS), or permeabilized for 5 minutes in PBS/0.1% Triton then saturated as above. They were washed 3 times in PBS and incubated with the appropriate anti-Cntn primary antibody in PBS/0.1% Triton/2% horse serum for 2 hours at RT. Cells were washed 3 times in PBS and incubated with a fluorescent secondary antibody in PBS/0.1% Triton/2% horse serum for 1 hour at RT, and then washed again 3 times. Mouse anti-rat NB2 (3G12) and anti-rat NB3 (2F7) monoclonal antibodies amplified in ascites were used, at a dilution of 1/500 (Toyoshima et al., 2009b; Sakurai et al., 2009). These antibodies give a clear single band at approx. 130 kDa. The anti-Cntn4 antibody was purchased from R&D systems (AF2205, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) and used at a dilution of 1/200. For Cntn5 and Cntn6, the secondary antibody was an Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG (H^+L) used at a dilution of 1/200 (A11005, Molecular Probes®, Life Technologies). For Cntn4, the secondary antibody was an Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Goat IgG (H^+L) used at a dilution of 1/200 (A11055, Molecular Probes®, Life Technologies). Cells were washed 3 times in PBS and rinsed once in milliQ water. Semi-quantitative analysis of fluorescence in permeabilized HEK293 cells was performed using Image J software. The relative cell surface expression of Cntn4, -5 and -6 was analyzed by measuring the pixel intensities of images from a confocal-like microscopy technique. The relative cell surface expression of Cntn4, -5 and -6 was analyzed by measuring the pixel intensities of images from a confocal-like microscopy technique. Immunofluorescence labeling on co-cultures was performed in

permeabilized conditions. Cells were fixed in the presence of 4% paraformaldehyde for 10 minutes at RT and washed 3 times in PBS, permeabilized and saturated in PBS/0.05% Triton/10% horse serum for 1 hour at RT under agitation. Antibody incubation was then performed in drops, with the primary monoclonal mouse anti-MAP2 antibody (ref. MAB3418, Millipore®, France) at a dilution of 1/500 in PBS/0.5% Tween 20/4% horse serum, overnight at 4℃. The day after, coverslips were washed 3 times in PBS/0.5% Tween 20, then incubated with the secondary antibody Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (A11005, Molecular Probes, Life Technologies) at a dilution of 1/200 in PBS/0.5% Tween 20, for 45 minutes at RT. Cells were washed 3 times in PBS and rinsed once in milliQ water. Coverslips were then mounted on glass slides with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen™, Life technologies SAS, France).

Western blot

To evaluate the presence of soluble/secreted Cntns in culture, aliquots of culture supernatants were collected and loaded on a 7% Tris-Acetate NuPage® Novex® Mini Gel (ref. EA0355BOX, Life technologies SAS) under reducing conditions according to the manufacturer's protocol. After electrophoresis, gels were transferred onto a PVDF membrane using the iBlot® 7-minute Western Blotting System (Life technologies SAS). Blots were saturated in PBS containing 0.5% milk powder, 1% BSA and 0.05% Tween 20, for 1 hour at RT. Blots were then incubated overnight at 4℃ in saturation buffer, with the primary antibody: anti-Cntn4 (ref. AF2205, dilution 1/250; R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), anti-Cntn5 (3G12, dilution 1/1000) or anti-Cntn6 (2F7; dilution 1/2000). After 3 washes in PBS/0.05% Tween 20 (PBS-T), blots were incubated for 1 hour at RT in the presence of adequate polyclonal anti-Ig HRP (Sigma) in PBS-T. After 3 washes, the respective Cntn bands were revealed by the ECL^{+} procedure (Amersham Biosciences, Orsay, France) as described by the supplier. Autoradiography was performed using BioMax MR Films and quantification of the bands by scanning densitometry. For whole-cell extract preparations, neurons or HEK293 cells were rinsed with ice-cold PBS, resuspended in lysis buffer (1 ml per 10^7 cells) containing 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20 mM HEPES, 1% nonidet® P40, and a cocktail of protease inhibitors (ref. 11 873 580 001, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After cell scraping, cell suspensions were transferred in microfuge tubes, maintained under constant agitation for at least 30 minutes at 4℃, and then centrifuged for 30 minutes at 10,000 rpm. Pellets were discarded, protein concentrations were measured in supernatants, and aliquots were submitted to gel electrophoresis as described above.

Image acquisition, processing and statistical analysis

Fluorescence images were acquired with an inverted microscope Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an AxioCam MR3 camera. For neurite detection, ten to fifteen mosaic images were acquired for each condition per experiment with a LD Plan-neofluar 20× objective and a 64HE mPlum reflector (Alexa 594 channel). Total image width and height were of 4041 and 3025 pixels, respectively. Each pixel represented 16 bit gray levels. Quantitative image analysis was performed using the Acapella image analysis, version 2.3 software (PerkinElmer, Inc.). A specific script for automated detection of neurons and analysis of their morphology was used. The same threshold parameters were applied in all conditions. Measured parameters extracted from specific module "neurite detection" include the length of the longest neurite per neuron, number of roots and total number of segments. Neurons without neurites were excluded from the analysis. Individual tracing of neurite extension was possible over all co-culture periods. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test and GraphPad Prism version 4 software (GraphPad, San Diego, California, USA).

Cell surface binding assay

Ptprg–Fc was constructed as a fusion protein of the extracellular domain (amino acids 1–172) of the mouse Ptprg and the Fc portion of human IgG, therefore lacking the intracellular phosphatase domain (mouse and rat Ptprg share 99.6% homology with identical contact residues with Cntn). Binding experiments were performed basically as described previously (Shimoda et al., 2012). In brief, HEK293 cells plated on glass coverslips were transfected with the *Cntn* plasmid using jetPRIME® kit, according to the manufacturer's protocol (polyplus-transfection SA, Illkirch, France). After 48 hours, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes at RT and washed 3 times with PBS. After washing, the cells were incubated with the Ptprg–Fc fusion protein (5 µg/ml) in PBS containing 10% normal goat serum and 0.5% BSA for 1 hour at RT. After washing with PBS 5 times, cells were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated anti-human IgG (1:3000) for 1 hour at RT. After washing with PBS 5 times, cells were incubated with the 3G12 anti-Cntn5 antibody (1/500) or the 2F7 anti-Cntn6 antibody (1/500) for 1 hour at RT (Sakurai et al., 2009; Toyoshima et al., 2009a; Sakurai et al., 2010). After washing with PBS 5 times, the cells were incubated with an Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG (1:200) for 1 hour at RT. After five washes with PBS, coverslips were mounted on glass slides. Fluorescent signals were quantified using a specific plugin of the Icy software (de Chaumont et al., 2012) (http://icy.bioimageanalysis.org). The plugin was based on wavelets detection to visualize the red fluorescence and provide the mean for the red and green fluorescent signals (Olivo-Marin, 2002). The Ptprg–Fc signals were normalized to the level of Cntn fluorescence at cell membrane. The plug-in is available on line (http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/Ligand-Receptor_ratio_quantifier).

Homology modeling

The FASTA sequences of human CNTN4$^{Ig1–4}$, CNTN5$^{Ig1–4}$, CNTN6$^{Ig1–4}$ were retrieved from the UniProtKB server at (http://www.uniprot.org/uniprot) and 2D-aligned with the homologous mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ as reference sequence (3KLD.fasta retrieved from the solved structure at http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) using ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2). They were then 3D-aligned using Espript (http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript) to include the mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ secondary structure from the PDB entry 3KLD (Gouet et al., 1999; Bouyain and Watkins, 2010a). Human CNTN4$^{Ig1–4}$, CNTN5$^{Ig1–4}$, CNTN6$^{Ig1–4}$ were homology-modeled by computing both the alignment and the solved X-ray structure of the mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ used as 3D template (Protein Data Bank ID: 3KLD). For each CNTN, 50 models were generated using the model-building software Modeller (mod9v7), to satisfy the spatial restraints issued from the alignment with the target protein (Eswar et al., 2006). Models with the lowest score function values and best stereochemistry and checked by Molprobity (http://molprobity.biochem.duke.edu) (Chen et al., 2010) were then subjected to subsequent refinement by energy minimization using CHARMM implemented in Discovery Studio 2.5 (DS2.5; Accelrys, Inc.) (Brooks et al., 2009). Similarly, the human PTPRG^{CA} was homology-modeled using the mouse Ptprg^{CA} as reference sequence for alignment and 3D template (from the 3D the complex of mouse Cntn4$^{Ig1–4}$/mouse Ptprg^{CA}). 50 models were generated; one was selected from its score function before being minimized using CHARMM forcefield. After optimization, each resulting model, CNTN4, -5 and -6$^{Ig1–4}$ or PTPRG was visually inspected with PyMOL and superimposed to the mouse Cntn4$^{Ig1–4}$–Ptprg^{CA} complex template. Models of each complex between human CNTN4, -5 and -6 and human PTPRG^{CA} were then optimized with an energy minimization where the backbone was kept fixed for the two proteins of the complex. Characteristics of the interface between each human CNTN and human PTPRG (surface size, residues, hydrogen bonds, salt bridges, energy parameters) were determined using the PISA server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html).

Acknowledgements

This work was supported by the Institut Pasteur, INSERM, APHP, ANR (ANR-08-MNPS-037-01-SynGen), Neuron-ERANET (EUHF-AUTISM), Fondation Orange, Fondation pour la Recherche Médicale, RTRS Santé Mentale (Fondation FondaMental) and Fondation Bettencourt Schueller. O.M. is supported by an undergraduate fellowship from the Neuropole de recherche francilien (NeRF). We are grateful to Nathalie Lemière for her technical assistance.

Competing Interests

The authors have no competing interests to declare.

References

Alarcón, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C. L., Ledbetter, D. H. et al. (2008). Linkage, association, and gene-expression analyses identify *CNTNAP2* as an autism-susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 150-159.

Bakkaloglu, B., O'Roak, B. J., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., Chawarska, K., Klin, A., Ercan-Sencicek, A. G., Stillman, A. A. et al. (2008). Molecular cytogenetic analysis and resequencing of *Contactin Associated Protein-Like 2* in autism spectrum disorders. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 165-173.

Belmonte, M. K. and Bourgeron, T. (2006). Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nat. Neurosci.* **9**, 1221-1225.

Bouyain, S. and Watkins, D. J. (2010a). The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2443-2448.

Bouyain, S. and Watkins, D. J. (2010b). Identification of tyrosine phosphatase ligands for contactin cell adhesion molecules. *Commun. Integr. Biol.* **3**, 284-286.

Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr, Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S. et al. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545-1614.

Burbach, J. P. and van der Zwaag, B. (2009). Contact in the genetics of autism and schizophrenia. *Trends Neurosci.* **32**, 69-72.

Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2010). *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12-21.

Cottrell, C. E., Bir, N., Varga, E., Alvarez, C. E., Bouyain, S., Zernzach, R., Thrush, D. L., Evans, J., Trimarchi, M., Butter, E. M. et al. (2011). Contactin 4 as an autism susceptibility locus. *Autism Res.* **4**, 189-199.

Cui, X. Y., Hu, Q. D., Tekaya, M., Shimoda, Y., Ang, B. T., Nie, D. Y., Sun, L., Hu, W. P., Karsak, M., Duka, T. et al. (2004). NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 25858-25865.

de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y. et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods* **9**, 690-696.

Ensslen-Craig, S. E. and Brady-Kalnay, S. M. (2004). Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neural development and axon guidance. *Dev. Biol.* **275**, 12-22.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U. and Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **15**, 5.6.1-5.6.30.

Freigang, J., Proba, K., Leder, L., Diederichs, K., Sonderegger, P. and Welte, W. (2000). The crystal structure of the ligand binding module of axonin-1/TAG-1 suggests a zipper mechanism for neural cell adhesion. *Cell* **101**, 425-433.

Geschwind, D. H. and Levitt, P. (2007). Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 103-111.

Glessner, J. T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C. E., Wood, S., Zhang, H., Estes, A., Brune, C. W., Bradfield, J. P. et al. (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**, 569-573.

Gollan, L., Salomon, D., Salzer, J. L. and Peles, E. (2003). Caspr regulates the processing of contactin and inhibits its binding to neurofascin. *J. Cell Biol.* **163**, 1213-1218.

Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. and Métoz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-308.

Gouveia, R. M., Morais, V. A., Peixoto, C., Sousa, M., Regalla, M., Alves, P. M. and Costa, J. (2007). Production and purification of functional truncated soluble forms of human recombinant L1 cell adhesion glycoprotein from *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Protein Expr. Purif.* **52**, 182-193.

Hocquemiller, M., Vitry, S., Bigou, S., Bruyère, J., Ausseil, J. and Heard, J. M. (2010). GAP43 overexpression and enhanced neurite outgrowth in mucopolysaccharidosis type IIIB cortical neuron cultures. *J. Neurosci. Res.* **88**, 202-213.

Huang, Z., Yu, Y., Shimoda, Y., Watanabe, K. and Liu, Y. (2012). Loss of neural recognition molecule NB-3 delays the normal projection and terminal branching of developing corticospinal tract axons in the mouse. *J. Comp. Neurol.* **520**, 1227-1245.

Kaneko-Goto, T., Yoshihara, S., Miyazaki, H. and Yoshihara, Y. (2008). BIG-2 mediates olfactory axon convergence to target glomeruli. *Neuron* **57**, 834-846.

Karagogeos, D., Morton, S. B., Casano, F., Dodd, J. and Jessell, T. M. (1991). Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons *in vitro*. *Development* **112**, 51-67.

Labasque, M. and Faivre-Sarrailh, C. (2010). GPI-anchored proteins at the node of Ranvier. *FEBS Lett.* **584**, 1787-1792.

Lamprianou, S., Vacaresse, N., Suzuki, Y., Meziane, H., Buxbaum, J. D., Schlessinger, J. and Harroch, S. (2006). Receptor protein tyrosine phosphatase γ is a marker for pyramidal cells and sensory neurons in the nervous system and is not necessary for normal development. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5106-5119.

Lee, S., Takeda, Y., Kawano, H., Hosoya, H., Nomoto, M., Fujimoto, D., Takahashi, N. and Watanabe, K. (2000). Expression and regulation of a gene encoding neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup in mouse brain. *Gene* **245**, 253-266.

Lierheimer, R., Kunz, B., Vogt, L., Savoca, R., Brodbeck, U. and Sonderegger, P. (1997). The neuronal cell-adhesion molecule axonin-1 is specifically released by an endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase. *Eur. J. Biochem.* **243**, 502-510.

Mikulska, K., Pepłowski, L. and Nowak, W. (2011). Nanomechanics of Ig-like domains of human contactin (BIG-2). *J. Mol. Model.* **17**, 2313-2323.

Morrow, E. M., Yoo, S. Y., Flavell, S. W., Kim, T. K., Lin, Y., Hill, R. S., Mukaddes, N. M., Balkhy, S., Gascon, G., Hashmi, A. et al. (2008). Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* **321**, 218-223.

Mörtl, M., Sonderegger, P., Diederichs, K. and Welte, W. (2007). The crystal structure of the ligand-binding module of human TAG-1 suggests a new mode of homophilic interaction. *Protein Sci.* **16**, 2174-2183.

Murai, K. K., Misner, D. and Ranscht, B. (2002). Contactin supports synaptic plasticity associated with hippocampal long-term depression but not potentiation. *Curr. Biol.* **12**, 181-190.

Ogawa, J., Kaneko, H., Masuda, T., Nagata, S., Hosoya, H. and Watanabe, K. (1996). Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain. *Neurosci. Lett.* **218**, 173-176.

Ogawa, J., Lee, S., Itoh, K., Nagata, S., Machida, T., Takeda, Y. and Watanabe, K. (2001). Neural recognition molecule NB-2 of the contactin/F3 subgroup in rat: specificity in neurite outgrowth-promoting activity and restricted expression in the brain regions. *J. Neurosci. Res.* **65**, 100-110.

Okoyama, S., Ohbayashi, M., Ito, M. and Harada, S. (2006). Neuronal organization of the rat inferior colliculus participating in four major auditory pathways. *Hear. Res.* **218**, 72-80.

Olivo-Marin, J.-C. (2002). Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recognit.* **35**, 1989-1996.

Osterfield, M., Egelund, R., Young, L. M. and Flanagan, J. G. (2008). Interaction of amyloid precursor protein with contactins and NgCAM in the retinotectal system. *Development* **135**, 1189-1199.

Paul, S. and Lombroso, P. J. (2003). Receptor and nonreceptor protein tyrosine phosphatases in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2465-2482.

Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D. et al. (1995). The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase β is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* **82**, 251-260.

Peñagarikano, O., Abrahams, B. S., Herman, E. I., Winden, K. D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L. I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A. et al. (2011). Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell* **147**, 235-246.

Pierre, K., Dupouy, B., Allard, M., Poulain, D. A. and Theodosis, D. T. (2001). Mobilization of the cell adhesion glycoprotein F3/contactin to axonal surfaces is activity dependent. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 645-656.

Roohi, J., Montagna, C., Tegay, D. H., Palmer, L. E., DeVincent, C., Pomeroy, J. C., Christian, S. L., Nowak, N. and Hatchwell, E. (2009). Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *J. Med. Genet.* **46**, 176-182.

Rougon, G., Olive, S., Durbec, P., Faivre-Sarrailh, C. and Gennarini, G. (1994). Functional studies and cellular distribution of the F3 GPI-anchored adhesion molecule. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 409-414.

Sakurai, T., Lustig, M., Nativ, M., Hemperly, J. J., Schlessinger, J., Peles, E. and Grumet, M. (1997). Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase β. *J. Cell Biol.* **136**, 907-918.

Sakurai, K., Toyoshima, M., Ueda, H., Matsubara, K., Takeda, Y., Karagogeos, D., Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2009). Contribution of the neural cell recognition molecule NB-3 to synapse formation between parallel fibers and Purkinje cells in mouse. *Dev. Neurobiol.* **69**, 811-824.

Sakurai, K., Toyoshima, M., Takeda, Y., Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2010). Synaptic formation in subsets of glutamatergic terminals in the mouse hippocampal formation is affected by a deficiency in the neural cell recognition molecule NB-3. *Neurosci. Lett.* **473**, 102-106.

Salzer, J. L., Brophy, P. J. and Peles, E. (2008). Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia* **56**, 1532-1540.

Saus, E., Brunet, A., Armengol, L., Alonso, P., Crespo, J. M., Fernández-Aranda, F., Guitart, M., Martín-Santos, R., Menchón, J. M., Navinés, R. et al. (2010). Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients. *J. Psychiatr. Res.* **44**, 971-978.

Sharom, F. J. and Lehto, M. T. (2002). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 535-549.

Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2009). Contactins: emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh. Migr.* **3**, 64-70.

Shimoda, Y., Koseki, F., Itoh, M., Toyoshima, M. and Watanabe, K. (2012). A cis-complex of NB-2/contactin-5 with amyloid precursor-like protein 1 is localized on the presynaptic membrane. *Neurosci. Lett.* **510**, 148-153.

Shintani, T., Maeda, N. and Noda, M. (2001). Receptor-like protein tyrosine phosphatase γ (RPTPγ), but not PTPζ/RPTPβ, inhibits nerve-growth-factor-induced neurite outgrowth in PC12D cells. *Dev. Neurosci.* **23**, 55-69.

Stoeckli, E. T. (2004). Ig superfamily cell adhesion molecules in the brain. *Handb. Exp. Pharmacol.* **165**, 373-401.

Stoeckli, E. T. (2010). Neural circuit formation in the cerebellum is controlled by cell adhesion molecules of the Contactin family. *Cell Adh. Migr.* **4**, 523-526.

Ting, A. E. and Pagano, R. E. (1991). Density-dependent inhibition of cell growth is correlated with the activity of a cell surface phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Eur. J. Cell Biol.* **56**, 401-406.

Toyoshima, M., Sakurai, K., Shimazaki, K., Takeda, Y., Nakamoto, M., Serizawa, S., Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2009a). Preferential localization of neural cell recognition molecule NB-2 in developing glutamatergic neurons in the rat auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.* **513**, 349-362.

Toyoshima, M., Sakurai, K., Shimazaki, K., Takeda, Y., Shimoda, Y. and Watanabe, K. (2009b). Deficiency of neural recognition molecule NB-2 affects the development of glutamatergic auditory pathways from the ventral cochlear nucleus to the superior olivary complex in mouse. *Dev. Biol.* **336**, 192-200.

Valtorta, F. and Leoni, C. (1999). Molecular mechanisms of neurite extension. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354**, 387-394.

van Daalen, E., Kemner, C., Verbeek, N. E., van der Zwaag, B., Dijkhuizen, T., Rump, P., Houben, R., van 't Slot, R., de Jonge, M. V., Staal, W. G. et al. (2011). Social Responsiveness Scale-aided analysis of the clinical impact of copy number variations in autism. *Neurogenetics* **12**, 315-323.

Ye, H., Tan, Y. L., Ponniah, S., Takeda, Y., Wang, S. Q., Schachner, M., Watanabe, K., Pallen, C. J. and Xiao, Z. C. (2008). Neural recognition molecules CHL1 and NB-3 regulate apical dendrite orientation in the neocortex via PTPα. *EMBO J.* **27**, 188-200.

Ye, H., Zhao, T., Tan, Y. L., Liu, J., Pallen, C. J. and Xiao, Z. C. (2011). Receptor-like protein-tyrosine phosphatase α enhances cell surface expression of neural adhesion molecule NB-3. *J. Biol. Chem.* **286**, 26071-26080.

Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Nagata, S., Kagamiyama, H. and Mori, K. (1995). Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1, and F3: four members of an axon-associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J. Neurobiol.* **28**, 51-69.

Zuko, A., Bouyain, S., van der Zwaag, B. and Burbach, J. P. (2011). Contactins: structural aspects in relation to developmental functions in brain disease. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **84**, 143-180.

Biology Open

Supplementary Material

Oriane Mercati et al. doi: 10.1242/bio.20133343

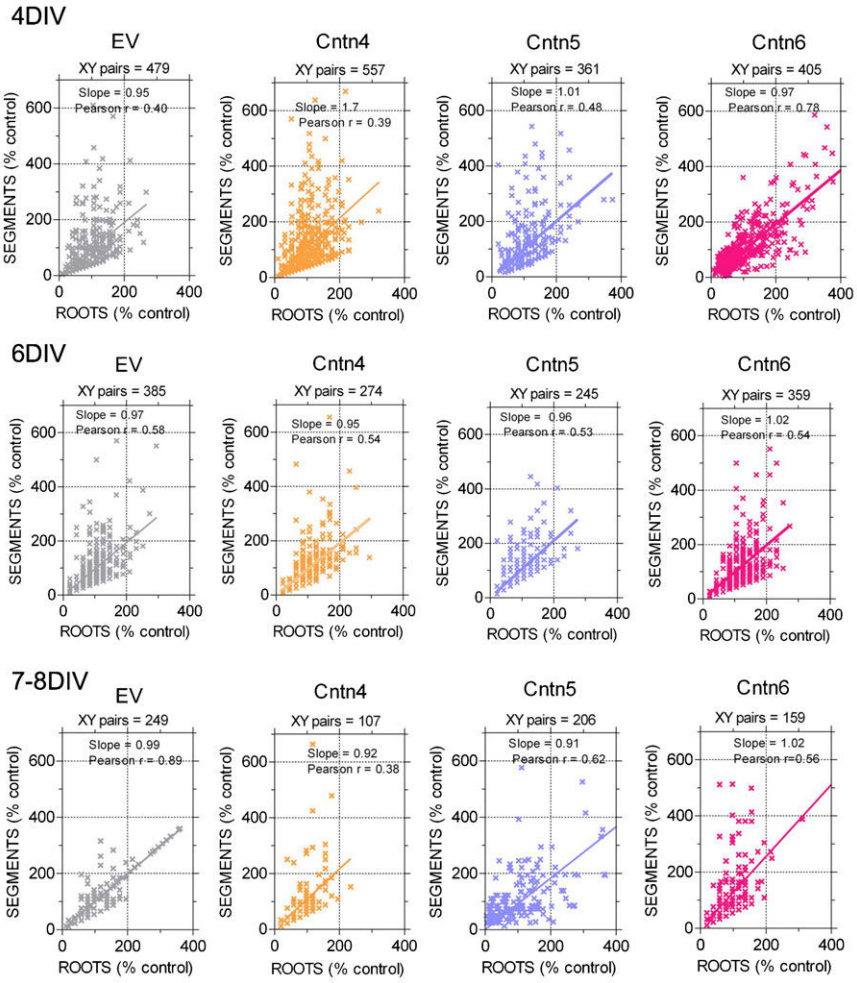
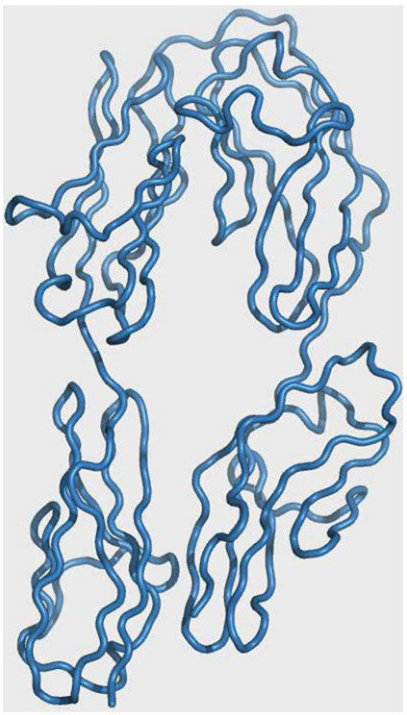


Fig. S1. Comparative effects of secreted Cntn4, -5, and -6 on arborization in rat cortical neurons in culture, at different time intervals. Cultures of rat cortical neurons were established from newborn rats (P0–P1) as described in Materials and Methods. Neurons were kept for up to 8 days in culture (DIV). The same densities of HEK293 cells were added 48–72 hours before the end of culture, in all conditions (see Materials and Methods). The length of the longest neurite per neuron, the total number of roots, and the segments were followed over time in all conditions. At the end of culture, neurons were fixed and immunostained with an anti-MAP2 antibody. Quantification was performed using Acapella software. Numbers of neurons analyzed are indicated in each graph. A two-dimensional representation showing the number of roots *versus* number of segments illustrates the evolution of neuronal trees over the different co-culture periods. Data are expressed as percent of control mean obtained in the absence of Cntn. Slope values and the Pearson's correlation coefficients are directly indicated in the graphs.



Movie 1. Flexible Ω loop in human CNTN5$^{Ig1–4}$. Three-dimensional structure of human CNTN5$^{Ig1–4}$ after homology modeling using the mouse Cntn4$^{Ig1–4}$ as a template (Bouyain and Watkins, 2010a). The flexible Ω loop in human CNTN5$^{Ig1–4}$ is located within Ig2 and Ig3 domains and can adopt distinct positions.

OPEN

Molecular Psychiatry (2016), 1–9
© 2016 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1359-4184/16
www.nature.com/mp

ORIGINAL ARTICLE

CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders

O Mercati[1,2,3,23], G Huguet[1,2,3,23], A Danckaert[4], G André-Leroux[5,6,7], A Maruani[8], M Bellinzoni[5,6], T Rolland[1,2,3], L Gouder[1,2,3], A Mathieu[1,2,3], J Buratti[1,2,3], F Amsellem[8], M Benabou[1,2,3], J Van-Gils[1,2,3], A Beggiato[8], M Konyukh[1,2,3], J-P Bourgeois[1,2,3], MJ Gazzellone[9], RKC Yuen[9], S Walker[9], M Delépine[10], A Boland[10], B Régnault[11], M Francois[12], T Van Den Abbeele[12], AL Mosca-Boidron[13], L Faivre[13], Y Shimoda[14], K Watanabe[14], D Bonneau[15], M Rastam[16,17], M Leboyer[18,19,20,21], SW Scherer[9,22], C Gillberg[17], R Delorme[1,2,3,8], I Cloëz-Tayarani[1,2,3,24] and T Bourgeron[1,2,3,17,21,24]

Contactin genes *CNTN5* and *CNTN6* code for neuronal cell adhesion molecules that promote neurite outgrowth in sensory-motor neuronal pathways. Mutations of *CNTN5* and *CNTN6* have previously been reported in individuals with autism spectrum disorders (ASDs), but very little is known on their prevalence and clinical impact. In this study, we identified *CNTN5* and *CNTN6* deleterious variants in individuals with ASD. Among the carriers, a girl with ASD and attention-deficit/hyperactivity disorder was carrying five copies of *CNTN5*. For *CNTN6*, both deletions (6/1534 ASD vs 1/8936 controls; $P = 0.00006$) and private coding sequence variants (18/501 ASD vs 535/33480 controls; $P = 0.0005$) were enriched in individuals with ASD. Among the rare *CNTN6* variants, two deletions were transmitted by fathers diagnosed with ASD, one stop mutation CNTN6^{W923X} was transmitted by a mother to her two sons with ASD and one variant CNTN6^{P770L} was found *de novo* in a boy with ASD. Clinical investigations of the patients carrying CNTN5 or CNTN6 variants showed that they were hypersensitive to sounds (a condition called hyperacusis) and displayed changes in wave latency within the auditory pathway. These results reinforce the hypothesis of abnormal neuronal connectivity in the pathophysiology of ASD and shed new light on the genes that increase risk for abnormal sensory perception in ASD.

Molecular Psychiatry advance online publication, 10 May 2016; doi:10.1038/mp.2016.61

INTRODUCTION

Autism spectrum disorders (ASD) are a heterogeneous group of disorders with different causes, phenotypic outcomes and ages of onset.[1–3] The diagnosis of ASD is based on impairments in reciprocal social communication and restricted, repetitive patterns of behaviors. In addition to these behavioral phenotypes, sensory-motor peculiarities are often present and are now included as one of the possible qualifying behavioral symptoms for a diagnosis of ASD.[4] These include an apparent indifference to pain/heat/cold, adverse response to specific sounds (for example, hyperacusis) or textures, excessive sensation when smelling or touching objects, and fascination with lights or spinning objects.[3,5] Individuals with ASD also exhibit alterations in sensory processing, including difficulties in the integration of information across different sensory modalities.[6,7] In addition, motor control abnormalities—for example, poor manual dexterity and coordination—are frequently reported in patients.[8] It has been proposed that these sensory-motor problems—especially those affecting the auditory pathway—might lead to communication impairments and subsequently to autism.[9–17] Interestingly, mutations of genes related to hearing loss were found in subjects with ASD,[18] but to date, no gene has been directly associated with sensory-motor impairments in ASD and the causes of such clinical features remain unknown.

Genetic studies have demonstrated that hundreds of genes may be involved in the pathogenesis of ASD.[19–21] The genetic variations include copy-number variants (CNVs) and single-nucleotide variants (SNVs), which can be inherited or *de novo*.[19] In a subset of patients, ASD appear to be a monogenic trait involving a single mutation with high penetrance.[22,23] However, in a majority of patients, the heritability of ASD is considered polygenic with a combination of inherited rare and common variants.[19,24] In these cases, risk variants may not fully segregate

[1]Human Genetics and Cognitive Functions Unit, Institut Pasteur, Paris, France; [2]CNRS UMR 3571: Genes, Synapses and Cognition, Institut Pasteur, Paris, France; [3]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Human Genetics and Cognitive Functions, Paris, France; [4]Imagopole, Citech, Institut Pasteur, Paris, France; [5]Institut Pasteur, Unité de Microbiologie Structurale, Paris, France; [6]CNRS UMR 3528, Paris, France; [7]INRA, Unité MaIAGE, UR1404, Jouy-en-Josas, France; [8]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Child and Adolescent Psychiatry Department, Robert Debré Hospital, Paris, France; [9]Centre for Applied Genomics, Program in Genetics and Genome Biology, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada; [10]Centre National de Génotypage, Evry, France; [11]Eukaryote Genotyping Platform, Genopole, Institut Pasteur, Paris, France; [12]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, ENT and Head and Neck Surgery Department, Robert Debré Hospital, Paris-VII University, Paris, France; [13]Département de Génétique, CHU Dijon et Université de Bourgogne, Dijon, France; [14]Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology, Nagaoka, Japan; [15]Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; [16]Department of Clinical Sciences in Lund, Lund University, Lund, Sweden; [17]Gillberg Neuropsychiatry Centre, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden; [18]INSERM U955, Psychiatrie Translationnelle, Créteil, France; [19]Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France; [20]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, DHU Pe-PSY, H. Mondor Hospital, Department of Psychiatry, Créteil, France; [21]FondaMental Foundation, Créteil, France and [22]McLaughlin Centre, Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada. Correspondence: Dr I Cloëz-Tayarani or Professor T Bourgeron, Neuroscience, Institut Pasteur, 25 rue du docteur Roux, Paris 75015, France.
E-mail: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr or thomasb@pasteur.fr
[23]These authors contributed equally to the work.
[24]These authors shared last authorship.
Received 18 August 2015; revised 12 February 2016; accepted 17 February 2016

with the trait and are usually present in a small subset of patients.[21] At least three main biological pathways have been associated with ASD: chromatin remodeling, mRNA translation and synaptic function.[25]

Among the candidate genes for ASD, Contactin *CNTN5* and *CNTN6* genes code for neural cell adhesion proteins that promote neurite outgrowth and synaptogenesis.[26–31] CNTNs are attached to the cell membrane by a glycosylphosphatidyl inositol anchor and can be found in two active forms, membrane-bound and secreted.[26,27] They contain six immunoglobulin-like (Ig) domains followed by four fibronectin type III (FNIII) domains. In mice, CNTN5 (also named NB-2) and CNTN6 (also named NB-3) are key proteins for the development of sensory-motor pathways.[32–35] CNTN5 contributes to the development of glutamatergic neurons in the auditory brainstem, from the ear through the inferior colliculus to the cortex.[34] Mice lacking CNTN5 present with increased auditory brainstem response (ABR) wave latencies.[34] CNTN5 is also expressed in mouse retinal neurons[36] and at high levels in the human lingual gyrus, a brain region involved in visual processing.[37] CNTN6 is regulated by T-Brain-1,[38] an ASD-risk protein, and interacts with cell adhesion molecule L1-like,[33] another protein associated with intellectual disability (ID) and language difficulties.[39] CNTN6 also interacts with NOTCH1 to produce oligodendrocytes from progenitor cells[40–42] and is highly expressed in the inferior colliculus and in the cerebellum.[32] CNTN6 is crucial for appropriate orientation of dendrite growth in mouse cortical pyramidal neurons,[33] and for synapse formation in the cerebellum.[43] Auditory function has not yet been investigated in mice lacking CNTN6, but they display impaired motor coordination.[32]

Several lines of evidence suggest that mutations of CNTNs and their binding partners, the Contactin-associated proteins (CNTNAPs), are risk factors for ASD.[26,27,44] First, heterozygous deletions of *CNTN4*, *CNTN5* or *CNTN6* (refs 45–52) have been identified in patients with neuropsychiatric disorders such as ASD and ID. In addition, individuals with *CNTNAP2* mutations display ID and epilepsy when mutations are homozygous[53] or higher risk for ASD and/or language impairments when mutations are heterozygous.[54–58] Finally, heterozygous deletions of *CNTNAP4* and *CNTNAP5* have been identified in a few cases of ASD.[56,58–62] Recently, a large mutation screen has detected *de novo* mutations of *CNTN6* and *CNTNAP4* in two unrelated patients with ASD, but no significant association between *CNTN* and *CNTNAP* rare SNVs and ASD.[63] Nevertheless, the authors of this study did not exclude that deleterious CNTN/CNTNAP variants could increase the risk of ASD in a subset of patients and were soliciting for functional studies to better ascertain the impact of the variants.[63]

In our study, we assessed the frequency of CNVs and SNVs affecting *CNTN5* and *CNTN6* in patients with ASD. We then evaluated the functional effects of the SNVs on neurite outgrowth using cultured neurons and addressed the molecular issues of those mutations on protein structure. Finally, given the involvement of *CNTN5* and *CNTN6* in the development of sensory-motor neuronal pathways, a clinical exploration of motor coordination and ABR was conducted in patients carrying *CNTN5* or *CNTN6* variants, and their relatives.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

The ASD diagnosis was based on clinical expert assessment including the Autism Diagnostic Interview–Revised (ADI-R)[64] and the Autism Diagnostic Observation Schedule.[65] In a few cases, the Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders (DISCO-10)[66] was used instead of the ADI-R. Intellectual quotient was measured using an age-appropriate Wechsler scale. For the most severe and/or non-verbal patients, the Raven's Standard Progressive Matrices and the Peabody Picture Vocabulary test were used. The cohorts recruited by the PARIS (Paris Autism Research International Sibpair) study are described in Supplementary Table 1. Families AUDIJ001 and AUDIJ002 carrying *CNTN5* CNVs were not part of our initial cohort of patients and therefore were not included in the association analysis (Supplementary Figure 1). Gross and fine motor coordination abilities were assessed during the neurological exam and with the Developmental Coordination Disorder Questionnaire (DCD-Q).[67] The local Institutional Review Boards at Hôpital Pitié-Salpêtrière (Paris, France) and University of Gothenburg (Sweden) approved the study. Written informed consent was obtained from all participants. For the patients who were unable to consent for themselves, a parent or legal guardian consented to the study on their behalf.

Auditory brainstem response audiometry

An experienced Ear-Nose-Throat specialist examined some of the patients carrying CNTN5 or CNTN6 variants and their first-degree relatives. The exploration included otoscopic examination, tympanogram and a measurement of the stapedian ipsilateral reflexes. Recording of the ABR was performed using the Biologic Navigator-Pro Evoked Potential System (Natus Medical, Mundelein, IL, USA). We used the Wilcoxon non-parametric test to detect statistical difference in wave latency between carriers and non-carriers of CNTN5 or CNTN6 variants, and between affected and non-affected subjects.

Genetic analyses

For CNV detection, 1534 unrelated individuals with ASD (901 from Pinto *et al.*[68] and 633 from our cohort) and 8936 controls were analyzed using Illumina SNP arrays (Supplementary Tables 1 and 2). Two CNV detection algorithms, PennCNV and QuantiSNP, were used and all samples met stringent quality control criteria as described.[68] For SNV detection, 429 individuals (212 independent patients with ASD and 217 controls) were screened for mutations in all exons of *CNTN5* and *CNTN6* using Sanger sequencing (Supplementary Tables 3 and 4). For replication, we had access to the results of whole-genome sequence from a sample of 289 individuals with ASD (200 trios and 89 sib pairs).[18] The whole-genome sequence was obtained as previously described.[18] The rare variants were defined as in Murdoch *et al.*:[63] seen in either cases or controls exclusively, missense, nonsense, splice site, or start or stop codon disruptions with a frequency of less than 1% in all populations from the general European (Non-Finnish) population from ExAC (http://exac.broadinstitute.org/). To estimate the frequency of individuals sequenced for CNTN5 or CNTN6 variants in ExAC, we used the median of the number of alleles sequenced divided by a factor of 2 (CNTN5 = 32858; CNTN6 = 33263) and we assumed that a single individual was carrying only one rare variant. Variants were considered deleterious when they were predicted as damaging by at least two of these five criteria: CADD Phred score ≥ 20, SIFT ≤ 0.05, PolyPhen2 ≥ 0.453, Mutation Assessor ≥ 2, vertebrate PhyloP ≥ 2. We used a one-sided Fisher's exact test or a χ^2 test to test for enrichment in CNVs or SNVs in patients compared with controls and the G*power software (http://www.gpower.hhu.de/) to estimate the achieved power of our analyses. For the multiple hits in known ASD-risk genes, we identified exonic CNVs and deleterious SNVs in Class I-III genes from Yuen *et al.*,[18] TADA genes from Sanders *et al.*[69] or genes from the SFARI database (9 November 2015; https://gene.sfari.org/autdb/Welcome.do). The overlap between the database is illustrated in Supplementary Figure 7 and the complete list of genes is indicated in Supplementary Table 10. For SNVs, we only considered those with a minor allele frequency of less than 1% in the general population from ExAC and from the 1000 genomes.

Cell culture procedures and *in vitro* analysis of neurite outgrowth

Experiments were performed according to the standardized co-culture assay and automated quantification method, which we published previously.[31] Primary rat cortical neurons were prepared from newborn (P0-P1) Sprague–Dawley rats, plated at a density of $4x10^5$ cells per ml and cultured for 6 days before adding the HEK293 cells. HEK293 cells were cultured in Minimum Essential Medium containing 100 U ml^{-1} penicillin, 100 µg ml^{-1} streptomycin, 2 mM glutamine (Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) and 10% fetal calf serum (ref. CVFSVF00-01, Eurobio, Courtaboeuf, France). HEK293 cells were transfected with rat CNTN6 cDNAs cloned in pcDNA3.1 vector (CNTN6 GenBank accession number: D87248) using the jet PRIME® kit (POL114-15 Polyplus-transfection SA, Illkirch, France). After transfection, $2–3x10^5$ cells were collected and seeded on top of the neurons in culture. The percentage of transfected cells was very similar in all experiments and corresponded to 50% of the

© 2016 Macmillan Publishers Limited

HEK cells. HEK293 and neurons were co-cultured for 2 days before fixation with 4% paraformaldehyde. The secreted CNTN6 were at an estimated concentration of 100 ng ml^{-1}.[31] Western blots and immunofluorescence labeling on HEK293 cells were performed 2 days after transfection as previously described.[31] Mouse anti-rat NB-3 (2F7) monoclonal antibodies were used at a dilution of 1/500.[34,43,70] Cells in co-cultures were incubated with the primary mouse anti-MAP2 antibody (ref. MAB3418, Millipore, Molsheim, France) at a dilution of 1/500. The secondary antibody was an Alexa Fluor 594 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) used at a dilution of 1/200 (A11005, Molecular Probes, Life Technologies). After washing, coverslips were mounted on glass slides with ProLong antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Life Technologies). Fluorescence mosaic images were acquired with an inverted microscope Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Le Pecq, France). Constructs carrying a non-synonymous variant were generated by site-directed mutagenesis of the wild-type rat *CNTN6* cDNA sequence using the QuikChange XL II Site-Directed Mutagenesis Kit from Agilent (Santa Clara, CA, USA). Primers were designed using Agilent's QuikChange Primer Design program (Supplementary Table 5). Mutated plasmids were then purified using NucleoBond Xtra Maxi EF from Macherey-Nagel, and sequenced.

Immunoglobulin and fibronectin domains: homology modeling

CNTN6$^{Ig1\text{-}4}$ were homology modeled, using the model-building software Modeller (mod9v7) from the solved X-ray template of mouse CNTN4$^{Ig1\text{-}4}$ (Protein Data Bank ID: 3KLD). Each CNTN6 variant was introduced in the *.pir* alignment file of the corresponding wild-type protein. Models ($N = 50$) were generated using Modeller, to satisfy the spatial restraints issued from the alignment with the target protein mouse CNTN4$^{Ig1\text{-}4}$.[71] Models with the lowest score function values and best stereochemistry, checked by Molprobity (http://molprobity.biochem.duke.edu/), were then subjected to energy minimization using CharmM forcefield with the backbone constrained (DS2.5; Accelrys, San Diego, CA, USA).[72] Similarly, each FNIII sequence was three-dimensionally aligned using Espript (http://espript.ibcp.fr/ESPript/) with its template selected using HHPred server (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred). For each FNIII building model, 100 homology models were generated using Modeller. After minimization with CharmM, all resulting WT and variant models were manually analyzed using Pymol (https://www.pymol.org/).

RESULTS

Frequency of CNTN5 and CNTN6 variants in ASD and controls

We first screened for CNVs affecting exons of *CNTN5* and *CNTN6* in our cohort of 633 individuals with ASD. We identified one patient with a deletion of *CNTN5* and four patients with a deletion of *CNTN6* (Figures 1 and 2; Supplementary Figures 2 and 3). None of the patients had a second deleterious *CNTN5/6* variant on the remaining allele. In the cohort of the Autism Genome Project from Pinto *et al.*,[68] we observed 2 *CNTN6* deletions and 2 *CNTN6* duplications out of 901 patients with ASD. In our sample of 8936 individuals from the general population (Supplementary Table 2), we observed 1 deletion and 3 duplications of *CNTN5* as well as 1 deletion and 12 duplications of *CNTN6*. Overall, *CNTN6* deletions were more frequent in patients compared with controls (ASD 6/1534 (0.39%) vs controls 1/8936 (0.01%); $P = 6 \times 10^{-5}$).

We also had access to the phenotypes of the patients from the Brain & Body Genetic Resource Exchange (BBGRE version 3.0; https://bbgre.brc.iop.kcl.ac.uk/) database that includes 5891 patients (776 with ASD). We found a total of 14 *CNTN6* deletions out of the 5891 patients (Supplementary Table 11) and a significant excess of *CNTN6* deletions in patients with ASD (6/776; 0.77%; $P = 0.02$). This excess of *CNTN6* deletions in ASD is even more significant when only small deletions (< 500 kb) are considered. There are 7 small *CNTN6* deletions out of 5891 patients listed in BBGRE version 3.0 and 6 out of 776 in patients with ASD ($P = 0.002$). Finally, in the Decipher database (https://decipher.sanger.ac.uk/index), a total of 47 *CNTN6* deletions are listed among 18 506 patients (0.25%). In contrast to the BBGRE database, the phenotype for autism is rarely indicated, but several patients carrying *CNTN6* deletions have cognitive impairments, ID or ASD (Supplementary Table 12).

In our cohort of patients, we had access to the DNA from the parents and all CNVs were inherited. Interestingly, two father carriers of a *CNTN6* deletion were diagnosed with ASD. After this initial screen, our collaborators (ALMB, LF) identified two additional families with *CNTN5* CNVs (Supplementary Figure 1). In family AUDIJ001, the mother, who had ASD, transmitted a deletion of *CNTN5* to her daughter with specific language impairment. In family AUDIJ002, a girl with ASD and attention-deficit/hyperactivity disorder carried five copies of *CNTN5* transmitted by her mother, who had specific learning disorder (reading).

We then sequenced all coding exons of the *CNTN5* and *CNTN6* genes in 429 individuals, including 212 independent patients with ASD and 217 controls from France and Sweden (Figures 1 and 2, Supplementary Figure 4 and Supplementary Tables 6 and 7). For *CNTN5*, we observed private variants in 5/212 (2.35%) patients compared with 4/217 (1.84%) controls ($P = 0.36$). For *CNTN6*, we observed 9/212 (4.24%) individuals with ASD carrying a private variant compared with 2/217 (0.92%) controls ($P = 0.03$, odds ratio = 4.68, 95% confidence interval = 1–21.8). Among the affected carriers, we observed a *de novo* CNTN6^{P770L} variant predicted as deleterious by all algorithms (Figure 3). We then confirmed the frequency of rare variants of *CNTN5* and *CNTN6* in an independent cohort of 289 patients with ASD from Canada (Supplementary Figure 5). We found very similar frequencies for *CNTN5* (7/289; 2.4%) and *CNTN6* (9/289; 3.1%) rare variants in the Canadian cohort of patients with ASD compared with our patients with ASD. In one family, two affected brothers with ASD carried a CNTN6^{W923X} stop mutation transmitted by the mother.

In summary, both *CNTN6* CNVs and rare SNVs were more frequent in patients with ASD compared with the general population. Given our sample and effect sizes, our achieved statistical power was 92% for the CNVs, but only 62% for the SNVs. To increase our statistical power for the SNVs, we used the sequencing data obtained in $>30\,000$ individuals from the ExAC database (Supplementary Figure 6). The frequency of rare *CNTN6* variants in individuals from the general European population from ExAC (533/33263; 1.6%) was not significantly different from our controls (2/217; 0.92%; $P = 0.6$). Using the cohorts from PARIS and Canada and the ExAC data set, the enrichment of rare *CNTN6* variants in individuals with ASD compared with the general population was highly significant (ASD: 18/501; 3.59%; controls: 535/33 480; 1.6%; $P = 0.0005$) and with an achieved power to observe such a difference of 87%.

Additional ASD-risk gene deleterious variants in patients carrying CNTN6 variants

As often found in genetic studies of ASD, the risk variants do not always co-segregate with the phenotypes. We therefore investigated whether individuals with ASD carrying a rare *CNTN6* variant had other rare (minor allele frequency $< 1\%$ in 1000 genomes or ExAC) and deleterious (considered as damaging by two algorithms) variants in genes known to be associated with ASD (for the ASD-risk genes see Supplementary Figure 7 and Supplementary Table 10). For all patients carrying CNTN6 variants, we searched for rare CNVs and screened for exonic SNVs in *CNTN3*, *CNTN4* and *CNTNAP2*. Finally, we analyzed the data from whole-exome sequencing ($N = 9$ families) and whole-genome sequencing ($N = 11$ families) to identify deleterious variants in known ASD-risk genes. Among the CNVs that we identified (Table 1), we found a maternal deletion of 29 kb including the fifth exon of the X-linked Duchenne muscular dystrophy (*DMD)* gene in a patient carrying a paternal *CNTN6* duplication, a paternal duplication of 285 kb including all exons of Nephrocystine 1 (*NPHP1*) gene in a patient carrying a maternal *CNTN6* deletion, and a paternal duplication of 873 kb including the first exon of the glutamate receptor ionotropic delta 2 gene (*GRID2*) in a patient carrying a *de*

© 2016 Macmillan Publishers Limited

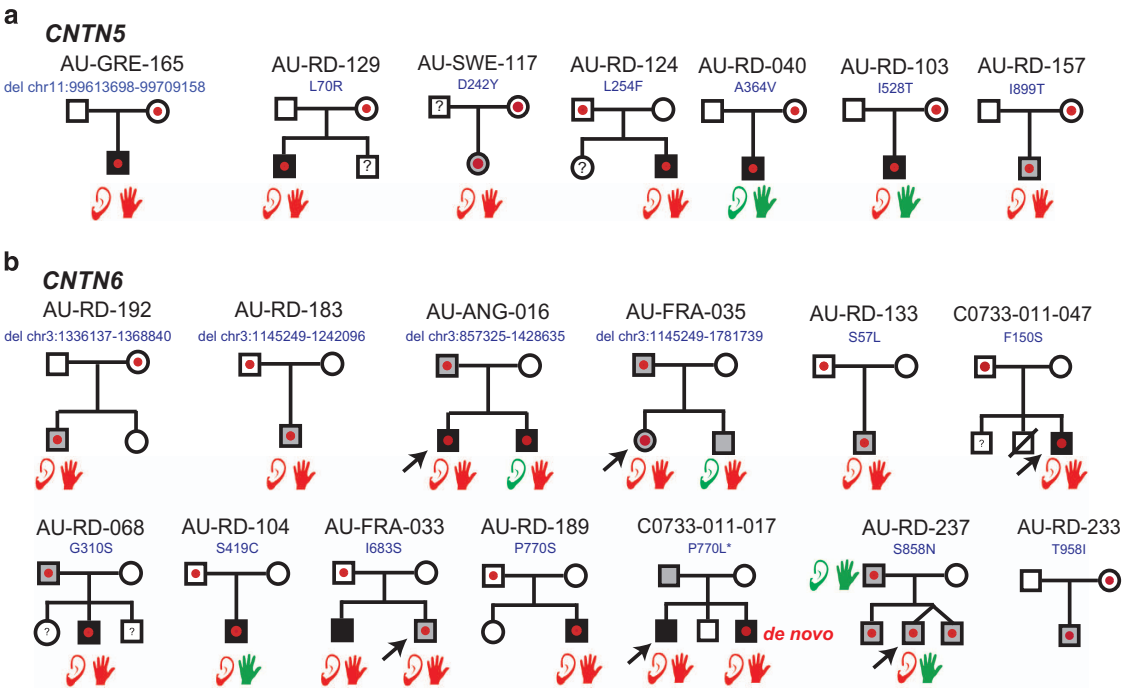


Figure 1. Families carrying *CNTN5* (**a**) and *CNTN6* (**b**) exonic CNVs or rare SNVs. *CNTN5* and *CNTN6* CNVs and SNVs are represented by dots. Black-filled symbols indicate a diagnosis of ASD with intellectual disability, whereas gray-filled symbols indicate a diagnosis of ASD without intellectual disability. In multiplex families, an arrow indicates the proband. Based on the ADI-R and clinical examination, normal (green) or abnormal (red) hypersensitivity to sounds and motor coordination ability are indicated by a schematic ear and hand, respectively. The absence of ear/hand means that information was not available. The locations of all CNVs identified in this study are indicated (hg19) and shown in Supplementary Figures 2 and 3. All families with *CNTN5*- or *CNTN6*-coding SNVs are shown in Supplementary Figure 4. ASD, autism spectrum disorder; CNV, copy-number variants; SNV, single-nucleotide variants.

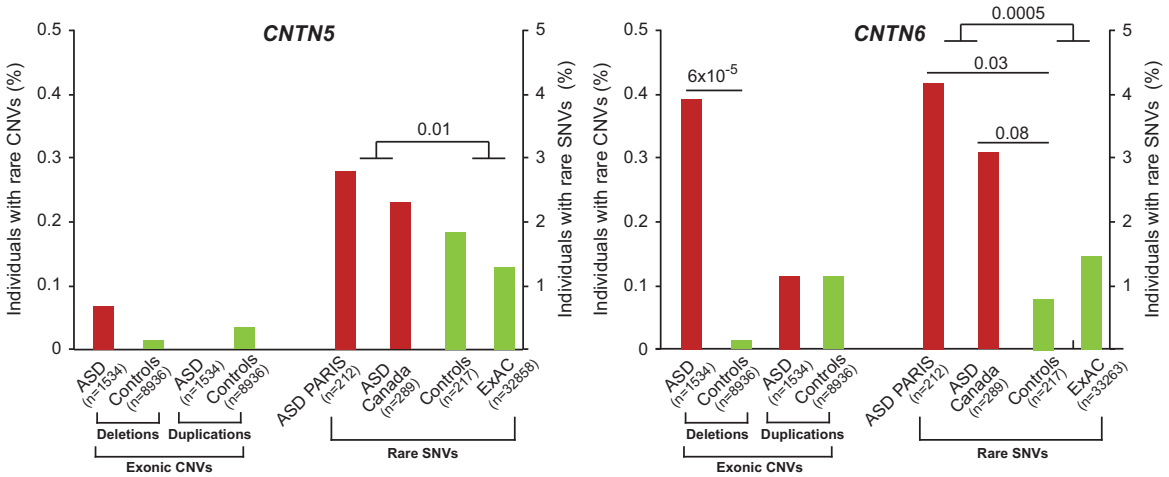


Figure 2. Frequency of *CNTN5* and *CNTN6* exonic CNVs and rare SNVs identified in patients with ASD and in controls. Differences in frequency of carriers of *CNTN5* or *CNTN6* CNVs or SNVs between patients and controls were calculated using a Fischer's exact test. The rare SNVs were defined as in Murdoch *et al*.:[63] seen in either cases or controls exclusively, missense, nonsense, splice site, or start or stop codon disruptions with a frequency of less than 1% in the general European (Non-Finnish) population from ExAC (http://exac.broadinstitute.org/). ASD, autism spectrum disorder; CNV, copy-number variants; SNV, single-nucleotide variants.

novo CNTN6^{P770S} variant. For the families with whole-exome/genome sequencing data, we found a X-linked stop mutation of the Ras-Associated *RAB39B* gene causing X-linked ID[73] in two brothers carrying the stop mutation CNTN6^{W923X}. A paternally transmitted frameshift mutation of the histone deacetylase *HDAC4* gene associated with ID[68] was identified in a patient carrying the CNTN6^{I529L} variant. In summary, although our study is underpowered to identify specific biological pathways mutated in patients carrying CNTN6 variants, we could detect several additional rare deleterious variants in known risk genes for ID or ASD.

Functional impact of CNTN6 variants

CNTN6 is known to enhance neurite outgrowth both *in vitro*[31] and *in vivo*.[35] In order to estimate the functional impact of CNTN6

© 2016 Macmillan Publishers Limited

variants, we used five prediction algorithms, an *in vitro* assay for the effect of CNTN6 variants on neurite outgrowth and a homology modeling of the protein (Figure 3 and Supplementary Figures 8 and 9). Several CNTN6 variants identified in this study were considered deleterious by at least two algorithms (Figure 3). Using an *in vitro* assay, we showed that some variants ($CNTN6^{G310S}$, $CNTN6^{I683S}$, $CNTN6^{P770S}$) could affect the promoting effect of CNTN6 on neuritogenesis, whereas others did not ($CNTN6^{S57L}$, $CNTN6^{T958I}$, $CNTN6^{R303Q}$, $CNTN6^{G678S}$; Figure 3 and Supplementary Figure 8). Based on the homology model of the CNTN6 protein structure, the variant $CNTN6^{G310S}$, observed in the French and Canadian cohorts of patients, might induce a molecule distortion (Supplementary Figures 8 and 9). The $CNTN6^{T958I}$ variant located in the fibronectin domains and identified in a patient with ASD, corresponds to the position of a critical amino acid (L1046) of the neogenin, a receptor of the axon guidance molecule netrin and a binding partner of the repulsive guidance molecule family members.[74] For this $CNTN6^{T958I}$ variant, we observed a putative secreted dimeric form suggested by the presence of an additional band of twice the molecular weight of the CNTN6 protein on western blot analysis (Supplementary Figure 8). However, further molecular studies would be required to firmly establish impaired ligand interactions or protein folding.

Clinical characterization of patients carrying CNTN5 or CNTN6 variants

CNTN5 and CNTN6 are interesting for ASD because of their role in the development of sensory-motor neuronal pathways.[28–31] We therefore explored sensory-motor abnormalities in the patients carrying CNTN5 or CNTN6 variants.

Based on the ADI-R and clinical evaluation, the vast majority of the patients carrying a CNTN5 or CNTN6 variant presented with fine or gross motor coordination problems, but did not statistically differ from the overall cohort for these symptoms ($P = 0.44$). When considering the item of the ADI-R related to excessive sensibility to noise (Figure 4), we found that probands carrying CNTN5 or CNTN6 variants were more prone to suffer from hyperacusis (39/48; 81%) than the rest of the cohort (360/548; 66%; $P = 0.036$). They also displayed more abnormal idiosyncratic-negative response to specific sensory stimuli (23/41; 56%) than the rest of the cohort (153/505; 30%; $P = 0.001$).

We then ascertained ABR for a subset of families with CNTN variants that were re-evaluated on this purpose (Figure 4). A total of 24 individuals (8 probands with ASD, 2 siblings with ASD, 2 fathers with ASD and 12 unaffected relatives) from 8 independent families were enrolled in this study. Three probands carried a *CNTN6* deletion, three carried a *CNTN6*-coding sequence variant affecting neurite outgrowth ($CNTN6^{G310S}$, $CNTN6^{I683S}$ and $CNTN6^{S858N}$), one carried a *CNTN5* deletion and one carried a $CNTN5^{L254F}$ variant predicted as deleterious. The clinical description of the probands is presented in Supplementary Table 8. Remarkably, except the carrier of $CNTN6^{S858N}$, all probands suffered from hyperacusis (which was painful during ear examination). None of the individuals without variants and none the unaffected relatives carrying variant showed over sensitivity to sound. ABRs were recorded for intensities of 60 and 80 dB and frequencies of 29 clicks per second. Wave latencies tended to be shorter in subjects carrying a CNTN5 or CNTN6 variant compared with non-carriers (Figure 4 and Supplementary Table 9).

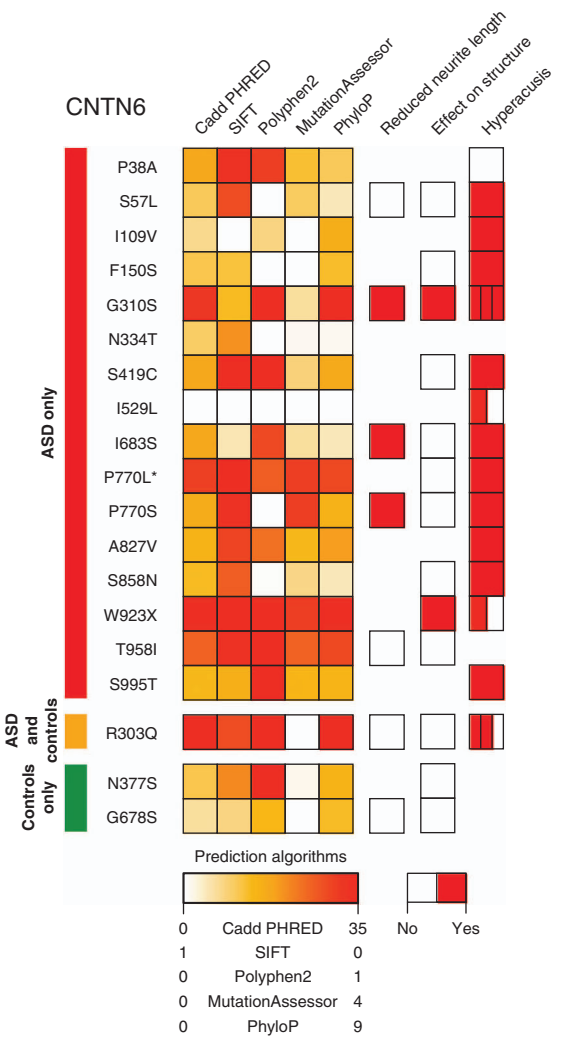


Figure 3. Functional impact of the CNTN6 variants. The predicted scores from five prediction algorithms are shown as a gradient for each mutation. The effect of each variant on neurite length, on the structure of the CNTN6 protein and the clinical observation of hypersensitivity to sounds (hyperacusis) are also indicated. The Divided squares represent multiple autism spectrum disorder (ASD) individuals carrying the same mutation. Missing squares represent unavailable information. The star indicates a *de novo* mutation.

DISCUSSION

In the present study, we identified *CNTN5* and *CNTN6* rare variants in individuals with ASD and investigated their impact on clinical phenotypes. Although we observed *CNTN5* genetic abnormalities in patients with ASD, the demonstration of an association between this gene and neuropsychiatric disorder would require larger cohorts of patients. In contrast, we provide further support that *CNTN6* mutations are risk factors for ASD. Our results confirm data from previous reports describing patients diagnosed with ASD and/or ID carrying inherited or *de novo* *CNTN6* CNVs or SNVs.[49–52]

Interestingly, two previous studies from Van Daalen *et al.*[49] and Hu *et al.*[52] reported that relatives of patients carrying *CNTN5* or *CNTN6* CNVs were diagnosed with neuropsychiatric disorders or had deficits in social interactions.[49,52] Similarly, in our study, several parents carrying *CNTN6* variants were diagnosed with ASD. This co-segregation between *CNTN6* variants and the presence of neuropsychiatric disorders in the relatives could explain why Murdoch *et al.*[63] did not found a significant association between *CNTN6* rare variants and ASD in the Simons Simplex Collection. Indeed, having first-degree relatives on the autism spectrum is an exclusion criterion of the Simons Simplex Collection.[75]

© 2016 Macmillan Publishers Limited

Table 1. Multiple hits identified in patients with ASD carrying CNTN6 rare variants

IID	*Status*	*Sex*	*Cohort*	*CNTN6 variant*	*Maternally inherited variants*	*Paternally inherited variants*
AU-RD-LAB-192-003	ASD	M	FR	**CNTN6 chr3:1336137-1368840 32 kb deletion (MI)**		**NPHP1-chr2:110863095-111148771 285 kb duplication**
AU-FRA-MIC-033-003	ASD	M	FR	CNTN6-I683S (PI)		CTTNBP2-P1586L, PTPRM-S706G
C0733-011-017-005	ASD	M	FR	CNTN6-P770L (*de novo*)		**GRID2-chr4:92606953-93480717 873 kb duplication,** NINL-R112Q, CADPS2-S11L, ATP2B4-V543I
AU-RD-BOR-104-003	ASD	M	FR	CNTN6-S419C (PI)	TAF1L-I1335T, RB1CC1-Y513H	ANK2-E1449G
AU-RD-BUR-237-004[a]	ASD	M	FR	CNTN6-S858N (PI)		**PARK2-chr6:162614973-162791579 176 kb deletion**
AU-RD-BUR-237-005[a]	ASD	M	FR	CNTN6-S858N (PI)		**PARK2-chr6:162614973-162791579 176 kb deletion**
AU-RD-BOU-233-005	ASD	M	FR	CNTN6-T958I (MI)	HDAC4-A786T	MYO1A-G651R, GRIK5-R582H
1-0232-003/5241-3	ASD	M	CA	**CNTN6-chr3:3:464181-1251877 787 kb duplication (PI)**	**DMD-chrX:31883357-31912783 29 kb deletion**, DISC1-E783Q, POGZ-P955R, JMJD1C-E2531K, CACNA1C-G37R, GNPTAB-N351S, AKAP9-V3780L, CREBBP-L551I	COG1-Q301H, NRCAM-G1168V, TGFBR2-S578T, ARFGEF2-G1298S, LRP2-R3888H, RELN-G370R, SPTAN1-E298G, ; MYO1A-R628G, DAPK1-G1348V, CREBBP-L551I
2-1335-003	ASD	M	CA	CNTN6-G310S (MI)	***USP45*-splice-A99930627G**, CACNA1D-A1305T, SUCLG2-K101R, GTF2I-N440S, CEP290-D433G	**chr15:29322000-29584000 262 kb duplication (NDNL2 and APBA2)**, KMT2C-C1114R, CNTNAP4-A600T, SYNE1-L3050V, LRP2-G3470D, NPHP1-S629L, CTTNBP2-E9K, MFRP-L458F, GTF2I-N440S, CEP290-D433G
2-1335-004	ASD	M	CA	CNTN6-G310S (MI)	CNTNAP2-C9S, MYO1A-K485E, CACNA1H-F1452S, HDLBP-P372A, (CEP290-D433G Inheritance unknown)	**KAT6B-chr10:76755251-76841351 86 kb duplication**, CNTNAP4-A600T, RELN-E2174K, (CEP290-D433G Inheritance unknown)
2-0018-003	ASD	M	CA	**CNTN6-W923X (MI)**	**RAB39B-E187X**, DNAH10-E3125K, DMD-M264T, PGAP3-A141G	CD163L1-T1307A
2-0018-004	ASD	M	CA	**CNTN6-W923X (MI)**	**RAB39B-E187X**, DNAH10-E3125K, CDH9-E603G, PGAP3-A141G, JMJD1C-E2531K	PIGV-L457F, RAI1-A381V, USP45-C62F, KIAA1033-R717Q, PAH-T380M, ASXL3-L2067R
2-1380-proband	ASD	M	CA	CNTN6-I529L (PI)	**CHST5-I121fs,** CADPS2-V799L, FBXO40-G517E, ASPM-E216K, GNPTAB-R46Q,	**HDAC4-M902fs**, **NDUFA5-Y3X**, MFRP-I331T, ARID1A-R1323C, PAH-I421T, CACNA1G-V96M, GFAP-D157N, SPARCL1-T363S, MYO1A-D67H
1-0366-006	ASD	M	CA	CNTN6-I529L (MI)	***KLC1*-splice-G104145883T**, CNTN3-V950I, COL4A1-G936A,	CNTN3-T901M, TTC8-K95R, ERBB2IP-H1045Y
2-1222-proband	ASD	M	CA	CNTN6-I109V (MI)	***CD44*-splice-G35243921A**, ***MIR17HG*-splice-T92005592G**, ZBTB20-D315E, TAF1L-E935K, ASTN2-A154V, LRP2-R2126G	**FCRL6-Q276X**, CNTNAP4-I763F, ETFB-R98C, KHDRBS2-Y305C, KIAA1033-T1046I, ANKRD11-R840Q
2-1357-003	ASD	M	CA	CNTN6-S995T (PI)	**FGFR2-X681W**, COL4A1-P304L, MYO9B-V1702I, FKRP-N480I, ERCC5-R1302W, ZNF423-L1068M, ASMT-T235N, HDAC4-P428T, AP4B1-I397V, CHD7-S2490P,	***DHCR7*-splice-C71146886G**, ***RAD21*-splice-C117879001T,** C5orf42-G3098R
2-1195-proband	ASD	M	CA	CNTN6-A827V (PI)	PARK2-Q34R, LMX1B-G210R, DLGAP2-R566H, PCNT-P2420L	CNTN3-H625R, CNTN3-H75D, COG1-Y744C, TTC8-G411R, SNTG2-Y212C, HOXA1-R121S, FGFR2-I8S, PRSS12-V424I, CDH15-L240F
1-0273-004	ASD	M	CA	CNTN6-P38A (PI)	**KATNAL2-Q53X**, ERBB2IP-D1135N, IQSEC2-P899L, DAG1-E37Q, PIK3CG-S1003G, ANKRD11-K2038E, ARFGEF2-E731K, BRWD1-D675V, BZRAP1-P1073A, ERCC6-G1322V, ST3GAL3-R414Q, PVRL1-G44S, SYNE1-Y7418C	***FOLR1*-splice-T71906793C**, **SRCAP-T1156fs**, CNTNAP1-R1200C, DIAPH3-P596, RARS2-R560C, ERCC2-V476I, VPS13B-T3012S, PIGV-P426L
1-0366-003	ASD	M	CA	CNTN6-I529L (MI)	***KLC1*-splice-G104145883T**, ***ASMT*-splice-T1748834C**, COL4A1-G936A, RANBP17-R491H, GFAP-E312Q	CEP41-P206A, TTC8-K95R, CARKD-V208L, AFF4-R225C
1-0518-proband	ASD	M	CA	CNTN6-N334T (MI)	***MIR17HG*-splice-T92004837C**, CNTN3-T657M, TTC8-M240I, PMM2-R141H, PTK7-S136L	***SOX5*-splice-C24521496-**, NINL-Q522H, DLGAP2-R785C, GRID2-F974Y, ATP2B4-E661K, CEP290-D1413H

Abbreviations: ASD, autism spectrum disorder; CA, Canada; FR, France; M, male; MAF, minor allele frequency; MI, maternally inherited; PI, paternally inherited. When both parents are carriers of the variant, the inheritance is indicated as unknown. For CNVs, only the rare and exonic CNVs are indicated. For SNVs, only the rare variants (MAF $<1\%$ in 1000 genomes and ExAC) and considered deleterious by at least 2 algorithms (CADD Phred score ≥ 20; SIFT ≤ 0.05, PolyPhen2 ≥ 0.453, Mutation Assessor ≥ 2, vertebrate PhyloP ≥ 2) are indicated. The complete list of ASD-risk genes is available in Supplementary Table 10.
[a]Individuals with no available WES/WGS information. Likely gene disrupting mutations are indicated in bold.

© 2016 Macmillan Publishers Limited

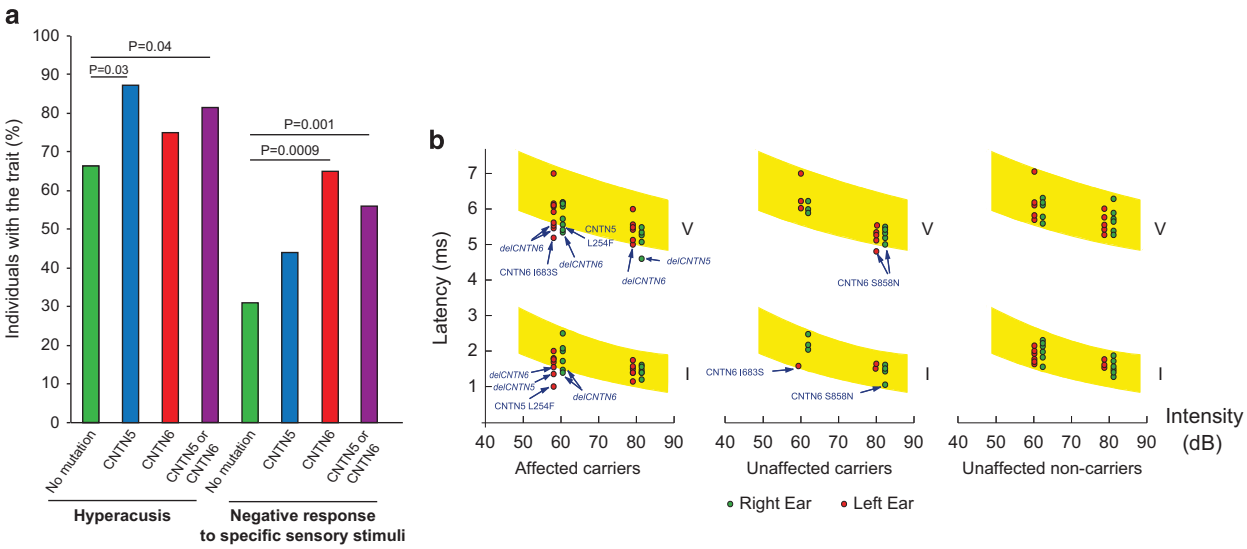


Figure 4. Clinical investigation and auditory brainstem responses in CNTN5 or CNTN6 rare variant carriers and non-carriers. (**a**) Individuals with ASD carrying CNTN5 ($N=24$) or CNTN6 ($N=24$) rare variants are more prone to suffer from hyperacusis or to display abnormal idiosyncratic-negative response to specific sensory stimuli than the rest of the cohort of patients with ASD ($N=544$). (**b**) Auditory brain response in the probands carrying *CNTN5* or *CNTN6* rare variants, and their first-degree relatives. The graph represents response latencies (in milliseconds) for waves I, III and V as a function of signal intensity (in decibels) in right ear (green dots) and left ear (red dots). Normal ranges of response (5–95th percentile) are shown in yellow (based on manufacturer information); variants of individuals outside the normal range are indicated. Electrodes were placed at Fz, ipsilateral earlobe and contralateral earlobe (ground). Responses were amplified with a gain of 100 000 and digitally filtered with a bandwidth of 100–3000 Hz. Each ear was stimulated by alternating 60 and 80 dB clicks with a presentation rate of 29 per second. Clicks were delivered using Etymotic Research ER-3 insert earphones. Two separate recordings that included 2000 individual sweeps were averaged. ASD, autism spectrum disorder.

We, and others,[49–52] showed that CNTN6 mutations are not fully penetrant, but they might represent risk factors for ASD in specific genetic backgrounds.[76] Using additional genotyping and sequencing data, we could detect multiple hits in the patients carrying the CNTN6 variants. Several mutations were affecting genes such as *GRID2, DMD* and *RAB39B* that are known to be risk factors for ID, neuromuscular disorder, epilepsy and in some cases ASD.[73,77–80] It would now be interesting to ascertain if patients with some genetic backgrounds are more sensitive to *CNTN6* mutations. Testing for such association would, however, require very large cohorts of patients and controls with genetic and phenotypic data.

Given the expression patterns and the roles of CNTN5 and CNTN6 in the development of sensory-motor neuronal pathways, either loss or gain of neurite outgrowth might perturb the sensory-motor functions of patients with ASD. CNTN6 is highly expressed in the granule cells of the cerebellum (but not in Purkinje cells) and is involved in the postnatal synapse formation. This expression pattern in the cerebellum is similar to that of SHANK3, another gene associated with ASD.[23,81] Both CNTN5 and CNTN6 are also expressed in the inferior colliculus, the principal midbrain nucleus of the auditory pathway.[32,34] This structure receives input from several peripheral brainstem nuclei in the auditory pathway, as well as from the auditory cortex. Remarkably, mice lacking CNTN5 display disorganized tonotopy and auditory brain response abnormalities.[82] Accordingly, we observed that almost all the patients who we reassessed suffered from painful hypersensitivity to noise. Some of these patients also displayed shortened waves latencies in their ABRs. Thus, abnormal gene dosage of *CNTN5* or *CNTN6* might represent a risk factor for the auditory problems recurrently reported in patients with ASD.[9–16]

In conclusion, we identified rare *CNTN5* and *CNTN6* deleterious mutations in a subset of individuals with ASD. Both CNTN5 and CNTN6 are expressed at high levels in the auditory pathway. This is in accordance with the fact that a majority of patients with mutations displayed painful hyperacusis. There is an emerging literature on the prominent role of sensory dysfunctions in the development of ASD. A better understanding of the genetic pathways associated with these abnormalities should lead to better clinical interventions in ASD.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Institut Pasteur, the Bettencourt-Schueller Foundation, Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris Diderot, Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-MNPS-037-01- SynGen), the Conny-Maeva Charitable Foundation, the Cognacq Jay Foundation, the Orange Foundation, the Fondamental Foundation, the GenMed Labex and the BioPsy labex. O Mercati was supported by an undergraduate fellowship from the Neuropole de Recherche Francilien (NeRF) and the Orange Foundation. The research leading to these results has also received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement no. 115300, resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in kind contribution. Control data sets were obtained, along with permission for use, from the database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP) found at http://www-ncbi-nlm-nih-gov.myaccess.library.utoronto.ca/gap through accession numbers phs000169.v1.p1 (Whole Genome Association Study of Visceral Adiposity in the HABC Study), phs000303.v1.p1 (Genetic Epidemiology of Refractive Error in the KORA Study) and phs000404.v1.p1 (COGEND; the Genetic Architecture of Smoking and Smoking Cessation). Support for the 'CIDR Visceral Adiposity Study' was provided through the Division of Aging Biology and the Division of Geriatrics and Clinical Gerontology, National Institute on Aging. Assistance with phenotype harmonization and genotype cleaning, as well as with general study coordination, was provided by Health ABC Study (HABC) Investigators. The KORA data set was obtained from the NEI Refractive Error Collaboration (NEIREC) Database, support for which was provided by the National Eye Institute. Support for genotyping of the COGEND samples, which was performed at the Center for Inherited Disease Research (CIDR), was provided by 1 X01 HG005274-01. Assistance with genotype cleaning of the COGEND samples, as well as with general study coordination, was provided by the Gene Environment Association Studies (GENEVA) Coordinating

© 2016 Macmillan Publishers Limited

Center (U01HG004446). Support for the collection of COGEND data sets and samples was provided by the Collaborative Genetic Study of Nicotine Dependence (COGEND; P01 CA089392) and the University of Wisconsin Transdisciplinary Tobacco Use Research Center (P50 DA019706, P50 CA084724). The contents of this article are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the NIH.

REFERENCES

1 Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 1943; **2**: 217–250.
2 Asperger H. Die "autistischen Psychopathen" im Kindesalter. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1944; **177**: 76–137.
3 Coleman M, Gillberg C. *The Autisms*. Oxford University Press: USA, 2012, 432 pp.
4 American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*, 5th edn. American Psychiatric Association: Washington, DC, 2013.
5 Rogers SJ, Ozonoff S. Annotation: what do we know about sensory dysfunction in autism? A critical review of the empirical evidence. *J Child Psychol Psychiatry* 2005; **46**: 1255–1268.
6 Foxe JJ, Molholm S, Del Bene VA, Frey HP, Russo NN, Blanco D *et al.* Severe multisensory speech integration deficits in high-functioning school-aged children with autism spectrum disorder (ASD) and their resolution during early adolescence. *Cereb Cortex* 2013; **25**: 298–312.
7 Marco EJ, Hinkley LB, Hill SS, Nagarajan SS. Sensory processing in autism: a review of neurophysiologic findings. *Pediatr Res* 2011; **69**: 48R–54R.
8 Ming X, Brimacombe M, Wagner GC. Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain Dev* 2007; **29**: 565–570.
9 Gillberg C, Steffenburg S, Jakobsson G. Neurobiological findings in 20 relatively gifted children with Kanner-type autism or Asperger syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1987; **29**: 641–649.
10 Khalfa S, Bruneau N, Roge B, Georgieff N, Veuillet E, Adrien JL *et al.* Peripheral auditory asymmetry in infantile autism. *Eur J Neurosci* 2001; **13**: 628–632.
11 Boddaert N, Belin P, Chabane N, Poline JB, Barthelemy C, Mouren-Simeoni MC *et al.* Perception of complex sounds: abnormal pattern of cortical activation in autism. *Am J Psychiatry* 2003; **160**: 2057–2060.
12 Ceponiene R, Lepisto T, Shestakova A, Vanhala R, Alku P, Naatanen R *et al.* Speech-sound-selective auditory impairment in children with autism: they can perceive but do not attend. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5567–5572.
13 Rosenhall U, Nordin V, Brantberg K, Gillberg C. Autism and auditory brain stem responses. *Ear Hear* 2003; **24**: 206–214.
14 Boddaert N, Chabane N, Belin P, Bourgeois M, Royer V, Barthelemy C *et al.* Perception of complex sounds in autism: abnormal auditory cortical processing in children. *Am J Psychiatry* 2004; **161**: 2117–2120.
15 Teder-Salejarvi WA, Pierce KL, Courchesne E, Hillyard SA. Auditory spatial localization and attention deficits in autistic adults. *Brain Res Cogn Brain Res* 2005; **23**: 221–234.
16 Gomot M, Belmonte MK, Bullmore ET, Bernard FA, Baron-Cohen S. Brain hyper-reactivity to auditory novel targets in children with high-functioning autism. *Brain* 2008; **131**: 2479–2488.
17 Demopoulos C, Brandes-Aitken AN, Desai SS, Hill SS, Antovich AD, Harris J *et al.* Shared and divergent auditory and tactile processing in children with autism and children with sensory processing dysfunction relative to typically developing peers. *J Int Neuropsychol Soc* 2015; **21**: 444–454.
18 Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N *et al.* Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat Med* 2015; **21**: 185–191.
19 Huguet G, Ey E, Bourgeron T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013; **14**: 191–213.
20 Jeste SS, Geschwind DH. Disentangling the heterogeneity of autism spectrum disorder through genetic findings. *Nat Rev Neurol* 2014; **10**: 74–81.
21 Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 2015; **16**: 551–563.
22 Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC *et al.* Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 2003; **34**: 27–29.
23 Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F *et al.* Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 2007; **39**: 25–27.
24 Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB *et al.* Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet* 2014; **46**: 881–885.
25 Ebert DH, Greenberg ME. Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature* 2013; **493**: 327–337.
26 Zuko A, Kleijer KT, Oguro-Ando A, Kas MJ, van Daalen E, van der Zwaag B *et al.* Contactins in the neurobiology of autism. *Eur J Pharmacol* 2013; **719**: 63–74.
27 Zuko A, Bouyain S, van der Zwaag B, Burbach JP. Contactins: structural aspects in relation to developmental functions in brain disease. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2011; **84**: 143–180.
28 Stoeckli ET. Ig superfamily cell adhesion molecules in the brain. *Handb Exp Pharmacol* 2004; 373–401.
29 Shimoda Y, Watanabe K. Contactins emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh Migr* 2009; **3**: 1–7.
30 Stoeckli ET. Neural circuit formation in the cerebellum is controlled by cell adhesion molecules of the Contactin family. *Cell Adh Migr* 2010; **4**: 523–526.
31 Mercati O, Danckaert A, Andre-Leroux G, Bellinzoni M, Gouder L, Watanabe K *et al.* Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites. *Biol Open* 2013; **2**: 324–334.
32 Takeda Y, Akasaka K, Lee S, Kobayashi S, Kawano H, Murayama S *et al.* Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup. *J Neurobiol* 2003; **56**: 252–265.
33 Ye H, Tan YL, Ponniah S, Takeda Y, Wang SQ, Schachner M *et al.* Neural recognition molecules CHL1 and NB-3 regulate apical dendrite orientation in the neocortex via PTP alpha. *EMBO J* 2008; **27**: 188–200.
34 Toyoshima M, Sakurai K, Shimazaki K, Takeda Y, Shimoda Y, Watanabe K. Deficiency of neural recognition molecule NB-2 affects the development of glutamatergic auditory pathways from the ventral cochlear nucleus to the superior olivary complex in mouse. *Dev Biol* 2009; **336**: 192–200.
35 Huang X, Sun J, Zhao T, Wu KW, Watanabe K, Xiao ZC *et al.* Loss of NB-3 aggravates cerebral ischemia by impairing neuron survival and neurite growth. *Stroke* 2011; **42**: 2910–2916.
36 Yamagata M, Sanes JR. Expanding the Ig superfamily code for laminar specificity in retina: expression and role of contactins. *J Neurosci* 2012; **32**: 14402–14414.
37 Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA *et al.* An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 2012; **489**: 391–399.
38 Chuang HC, Huang TN, Hsueh YP. T-Brain-1 - A potential master regulator in autism spectrum disorders. *Autism Res* 2015; **8**: 412–426.
39 Tassano E, Biancheri R, Denegri L, Porta S, Novara F, Zuffardi O *et al.* Heterozygous deletion of CHL1 gene: detailed array-CGH and clinical characterization of a new case and review of the literature. *Eur J Med Genet* 2014; **57**: 626–629.
40 Wong CM, Wang Y, Lee JT, Huang Z, Wu D, Xu A *et al.* Adropin is a brain membrane-bound protein regulating physical activity via the NB-3/Notch signaling pathway in mice. *J Biol Chem* 2014; **289**: 25976–25986.
41 Hu QD, Ma QH, Gennarini G, Xiao ZC. Cross-talk between F3/contactin and Notch at axoglial interface: a role in oligodendrocyte development. *Dev Neurosci* 2006; **28**: 25–33.
42 Cui XY, Hu QD, Tekaya M, Shimoda Y, Ang BT, Nie DY *et al.* NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 25858–25865.
43 Sakurai K, Toyoshima M, Ueda H, Matsubara K, Takeda Y, Karagogeos D *et al.* Contribution of the neural cell recognition molecule NB-3 to synapse formation between parallel fibers and Purkinje cells in mouse. *Dev Neurobiol* 2009; **69**: 811–824.
44 Poot M. A candidate gene association study further corroborates involvement of contactin genes in autism. *Mol Syndromol* 2014; **5**: 229–235.
45 Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S *et al.* Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 2009; **459**: 569–573.
46 Roohi J, Montagna C, Tegay DH, Palmer LE, DeVincent C, Pomeroy JC *et al.* Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *J Med Genet* 2009; **46**: 176–182.
47 Cottrell CE, Bir N, Varga E, Alvarez CE, Bouyain S, Zernzach R *et al.* Contactin 4 as an autism susceptibility locus. *Autism Res* 2011; **4**: 189–199.
48 Saus E, Brunet A, Armengol L, Alonso P, Crespo JM, Fernandez-Aranda F *et al.* Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients. *J Psychiatr Res* 2010; **44**: 971–978.
49 van Daalen E, Kemner C, Verbeek NE, van der Zwaag B, Dijkhuizen T, Rump P *et al.* Social Responsiveness Scale-aided analysis of the clinical impact of copy number variations in autism. *Neurogenetics* 2011; **12**: 315–323.
50 Guo H, Xun G, Peng Y, Xiang X, Xiong Z, Zhang L *et al.* Disruption of Contactin 4 in two subjects with autism in Chinese population. *Gene* 2012; **505**: 201–205.
51 Kashevarova AA, Nazarenko LP, Schultz-Pedersen S, Skryabin NA, Salyukova OA, Chechetkina NN *et al.* Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability. *Mol Cytogenet* 2014; **7**: 97.
52 Hu J, Liao J, Sathanoori M, Kochmar S, Sebastian J, Yatsenko SA *et al.* CNTN6 copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *J Neurodev Disord* 2015; **7**: 26.

© 2016 Macmillan Publishers Limited

53 Zweier C, de Jong EK, Zweier M, Orrico A, Ousager LB, Collins AL *et al.* CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 655–666.
54 Rodenas-Cuadrado P, Ho J, Vernes SC. Shining a light on CNTNAP2: complex functions to complex disorders. *Eur J Hum Genet* 2014; **22**: 171–178.
55 Poot M. Connecting the CNTNAP2 networks with neurodevelopmental disorders. *Mol Syndromol* 2015; **6**: 7–22.
56 Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM *et al.* Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 150–159.
57 Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M *et al.* A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 160–164.
58 Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM *et al.* Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 165–173.
59 O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 2012; **485**: 246–250.
60 Ballarati L, Recalcati MP, Bedeschi MF, Lalatta F, Valtorta C, Bellini M *et al.* Cytogenetic, FISH and array-CGH characterization of a complex chromosomal rearrangement carried by a mentally and language impaired patient. *Eur J Med Genet* 2009; **52**: 218–223.
61 Pagnamenta AT, Bacchelli E, de Jonge MV, Mirza G, Scerri TS, Minopoli F *et al.* Characterization of a family with rare deletions in CNTNAP5 and DOCK4 suggests novel risk loci for autism and dyslexia. *Biol Psychiatry* 2010; **68**: 320–328.
62 Karayannis T, Au E, Patel C, Kruglikov I, Markx S, Delorme R *et al.* Cntnap4 differentially contributes to GABAergic and dopaminergic synaptic transmission. *Nature* 2014; **511**: 236–240.
63 Murdoch JD, Gupta AR, Sanders SJ, Walker MF, Keaney J, Fernandez TV *et al.* No evidence for association of autism with rare heterozygous point mutations in Contactin-Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2), or in other Contactin-Associated Proteins or Contactins. *PLoS Genet* 2015; **11**: e1004852.
64 Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 1994; **24**: 659–685.
65 Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook EH Jr., Leventhal BL, DiLavore PC *et al.* The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord* 2000; **30**: 205–223.
66 Wing L, Leekam SR, Libby SJ, Gould J, Larcombe M. The Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders: background, inter-rater reliability and clinical use. *J Child Psychol Psychiatry* 2002; **43**: 307–325.
67 Wilson BN, Kaplan BJ, Crawford SG, Campbell A, Dewey D. Reliability and validity of a parent questionnaire on childhood motor skills. *Am J Occup Ther* 2000; **54**: 484–493.
68 Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L *et al.* Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2014; **94**: 677–694.
69 Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE *et al.* Insights into autism spectrum disorder genomic architecture and biology from 71 risk loci. *Neuron* 2015; **87**: 1215–1233.
70 Toyoshima M, Sakurai K, Shimazaki K, Takeda Y, Nakamoto M, Serizawa S *et al.* Preferential localization of neural cell recognition molecule NB-2 in developing glutamatergic neurons in the rat auditory brainstem. *J Comp Neurol* 2009; **513**: 349–362.
71 Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* 2006; **Chapter 5**: Unit 5 6.
72 Brooks BR, Brooks CL 3rd, Mackerell AD Jr., Nilsson L, Petrella RJ, Roux B *et al.* CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 2009; **30**: 1545–1614.
73 Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, Sirri A, Carrabino S, D'Elia E *et al.* Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy, and macrocephaly. *Am J Hum Genet* 2010; **86**: 185–195.
74 Bell CH, Healey E, van Erp S, Bishop B, Tang C, Gilbert RJ *et al.* Structure of the repulsive guidance molecule (RGM)-neogenin signaling hub. *Science* 2013; **341**: 77–80.
75 Fischbach GD, Lord C. The Simons Simplex Collection: a resource for identification of autism genetic risk factors. *Neuron* 2010; **68**: 192–195.
76 Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 2015; **16**: 551–563.
77 Girirajan S, Dennis MY, Baker C, Malig M, Coe BP, Campbell CD *et al.* Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 2013; **92**: 221–237.
78 Coutelier M, Burglen L, Mundwiller E, Abada-Bendib M, Rodriguez D, Chantot-Bastaraud S *et al.* GRID2 mutations span from congenital to mild adult-onset cerebellar ataxia. *Neurology* 2015; **84**: 1751–1759.
79 Gazzellone MJ, Zhou X, Lionel AC, Uddin M, Thiruvahindrapuram B, Liang S *et al.* Copy number variation in Han Chinese individuals with autism spectrum disorder. *J Neurodev Disord* 2014; **6**: 34.
80 Wu JY, Kuban KC, Allred E, Shapiro F, Darras BT. Association of Duchenne muscular dystrophy with autism spectrum disorder. *J Child Neurol* 2005; **20**: 790–795.
81 Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S *et al.* Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004580.
82 Li H, Takeda Y, Niki H, Ogawa J, Kobayashi S, Kai N *et al.* Aberrant responses to acoustic stimuli in mice deficient for neural recognition molecule NB-2. *Eur J Neurosci* 2003; **17**: 929–936.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 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/4.0/

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

CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders

Mercati O[1,2,3,$], Huguet G[1,2,3,$], Danckaert A[4], André-Leroux G[5,6], Maruani A[7], Bellinzoni M[5], Rolland T[1,2,3], Gouder L[1,2,3], Mathieu A[1,2,3], Buratti J[1,2,3], Amsellem F[7], Benabou M[1,2,3], Van-Gils J[1,2,3], Beggiato A[7], Konyukh M[1,2,3], Bourgeois J-P[1,2,3], Gazzellone MJ[8], Yuen RKC[8], Walker S[8], Delépine M[9], Boland A[9], Régnault B[10], Francois M[11], Van Den Abbeele T[11], Mosca-Boidron AL[12], Faivre L[12], Shimoda Y[13], Watanabe K[13], Bonneau D[14], Rastam M[15,16], Leboyer M[17,18,19,20], Scherer SW[8,21], Gillberg C[16], Delorme R[1,2,3,7], Cloëz-Tayarani I*[1,2,3], Bourgeron T*[1,2,3,16,20]

Supplementary data

Supplementary Table S1. Description of the patients from the PARIS cohort used for the CNV screening

Supplementary Table S2. Description of the cohorts used for CNV screening

Supplementary Table S3. Description of the patients from the PARIS cohort used for the SNV screening

Supplementary Table S4. Primers used for mutation screening of *CNTN5* and *CNTN6*

Supplementary Table S5. Primers used for site-directed mutagenesis of *CNTN5* and *CNTN6* variants

Supplementary Table S6. *CNTN5* coding variants identified in this study

Supplementary Table S7. *CNTN6* coding variants identified in this study

Supplementary Table S8. Clinical characterization of the patients carrying *CNTN5* or *CNTN6* variants and evaluated for auditory brainstem responses

Supplementary Table S9. Auditory brainstem responses of the patients and the controls.

Supplementary Figure S1. Genetic and clinical characterizations of family AUDIJ001 and AUDIJ002 carrying *CNTN5* CNVs

Supplementary Figure S2. *CNTN5* and *CNTN6* CNVs identified in patients with ASD

Supplementary Figure S3. Localization of the exonic CNVs affecting *CNTN5* or *CNTN6* in patients and controls

Supplementary Figure S4. Families with *CNTN5* and *CNTN6* coding SNVs from the PARIS cohort

Supplementary Figure S5. Families with *CNTN5* and *CNTN6* coding SNVs from Canada

Supplementary Figure S6. Frequency of *CNTN5* and *CNTN6* private variants in this study, in Murdoch et al. PLOS Genetics (2015) and in the ExAC cohort

Supplementary Figure S7. Venn diagram of the ASD-risk genes from different databases.

Supplementary Figure S8. Impact of the CNTN6 variants on neurite outgrowth.

Supplementary Figure S9. Effect of CNTN6 variants on protein structure.

Supplementary Table S1. Description of the patients from the PARIS cohort used for CNV screening.

	Total	Sex		Age class				Array platform (Illumina)			
		Male	Female	< 12 y	12 – <18 y	≥ 18y	NA	660W Quad	1M Duo – 1M	Omni1	Omni2.5
ASD with ID	*n = 361*	*294*	*67*	*4*	*68*	*203*	*86*	*0*	*250*	*108*	*3*
ASD without ID	*n = 195*	*162*	*33*	*3*	*43*	*113*	*36*	*27*	*151*	*14*	*3*
NA	*n = 77*	*66*	*11*	*4*	*8*	*1*	*64*	*0*	*36*	*41*	*0*
Total	***n = 633***	***522***	***111***	***11***	***119***	***317***	***186***	***27***	***437***	***163***	***6***

Supplementary Table S2. Description of the cohorts used for CNV screening.

Project	Technologies	N individuals	*CNTN5*		*CNTN6*	
			Loss	Gain	Loss	Gain
Patients with ASD						
The PARIS cohort	Illumina (1M, 1M duo, Omni 1, 2.5M, 5M)	*633*	*1*	*0*	*4*	*0*
Pinto et al. 2010	Illumina 1M	*901*	*0*	*0*	*2*	*2*
Total Patients with ASD	**Illumina**	***1534***	***1***	***0***	***6***	***2***
Controls [a]						
This study	Illumina (660Wq, 1M, 1M duo, Omni 1, 5M)	***2126***	*0*	*0*	*0*	*1*
SAGE+Hapmap3 (Pinto et al. 2010)	Illumina 1M	*1287*	*0*	*1*	*0*	*5*
HBAC	Illumina 1M duo	*2566*	*1*	*1*	*0*	*4*
KORA	Illumina 2.5M Quad	*1775*	*0*	*1*	*1*	*2*
COGEND	Illumina 2.5M	*1182*	*0*	*0*	*0*	*0*
Total Controls	**Illumina**	***8936***	***1***	***3***	***1***	***12***

[a] Control datasets were obtained, along with permission for use, from the database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP) found at http://www-ncbi-nlm-nih-gov.myaccess.library.utoronto.ca/gap through accession numbers phs000169.v1.p1 (Whole Genome Association Study of Visceral Adiposity in the HABC Study), phs000303.v1.p1 (Genetic Epidemiology of Refractive Error in the KORA Study), and phs000404.v1.p1 (COGEND; The Genetic Architecture of Smoking and Smoking Cessation).

Supplementary Table S3. Description of the patients from the PARIS cohort used for SNV screening.

		Total	***Sex***		***Age class***				***Family status***		
			Male	***Female***	***< 12 y***	***12 – <18 y***	***≥ 18y***	***NA***	***simplex***	***multiplex***	***single***
ASD with ID	*n = 125*	*95*	*30*	*1*	*22*	*93*	*9*	*89*	*36*	*0*
ASD without ID	*n = 82*	*66*	*16*	*2*	*14*	*60*	*6*	*46*	*20*	*16*
NA	*n = 5*	*5*	*0*	*1*	*0*	*4*	*0*	*3*	*2*	*0*
Total	***n =212***	***166***	***46***	***4***	***36***	***157***	***15***	***138***	***58***	***16***

Table S4. Primers used for mutation screening of *CNTN5* and *CNTN6*

Exon	Size (bp)	F primer	Forward primer sequence (5'-3')	R primer	Reverse primer sequence (5'-3')	Tm (°C)
3	418	CNTN5_1	TCTATCTCAAACAGGGCACTC	CNTN5_2	GCCTTCTGAAAGCTAGATGG	60
4	524	CNTN5_3	TGCAGCTCCAAAGAAGGTTT	CNTN5_4	TCTCCCCTAACATCCTCCAG	60
5	763	CNTN5_5	CACCCCAGAATTGTTAGCAC	CNTN5_6	TTCCATTTCGAAGCCATCTT	60
6	817	CNTN5_7	AGTTCGTGGCAATCCAGTTC	CNTN5_8	CATGAAAAGGACTTCAACCTG	60
7	731	CNTN5_9	GAGAGAATGGGCGTTATTGG	CNTN5_10	CGCTTCCTTTGTGCTCTAGG	60
8	527	CNTN5_11	GGCTTTGTTGTTTGAGCTTT	CNTN5_12	TTCTCCCTTTCTGGCATTAG	60
9	396	CNTN5_13	TCCTCAGGGGAAGACTAGGA	CNTN5_14	GGGGAAATGACACCTAGCAA	60
10	549	CNTN5_15	AACCCACGTGGAAAGTGAAA	CNTN5_16	CACCGATAATTCCCCATTCA	60
11	556	CNTN5_17	CCCCACTACATTGAAAGAGC	CNTN5_18	GCCTAGTTTGTCCTGTGTGA	60
12	591	CNTN5_19	TACATTGCTAAGTGGCCAAA	CNTN5_20	CTACCCTCAAGGCATTCTTC	60
13	621	CNTN5_21	AGGTCACCTCCATCTTACCA	CNTN5_22	TACGTCTCACGGTACTGCAA	60
14	620	CNTN5_23	AAACTCAGGGTCACCCCTTC	CNTN5_24	TGCCAATAAGAGGTTCCTTCA	60
15	850	CNTN5_25	AGGAACAGAGGCTCTTAAATC	CNTN5_26	GGCTAATGTGCATTTATGACT	56
16	593	CNTN5_27	CCCACAAGTTGCTGTTCCTT	CNTN5_28	GATGTGCTCAAAGTCCATGC	60
17	636	CNTN5_29	TTTCCCCCAGAAATCCTAGA	CNTN5_30	GAGTGGGTCCACAGGAACTC	60
18	766	CNTN5_31	GGAGGTGACACCATGACCAC	CNTN5_32	TAGGTCAAGGAAGGGCAATG	60
19	839	CNTN5_33	CATGGTTTGGTGCAATGAAG	CNTN5_34	TCCTCCCACTGTTTTTAGCC	60
20	849	CNTN5_35	TTTCCCCAACATGTTAATCC	CNTN5_36	CCAGAGAAAGGAATACACTGC	56
21	649	CNTN5_37	TTCCCCAGAAATGTCTTAGC	CNTN5_38	ACCTGTAGCTCCTGCTTTTG	60
22	509	CNTN5_39	CTGCTGTAGTGCTGCAATTT	CNTN5_40	TCAAAACTCCCCTTTGACTC	60
23	515	CNTN5_47	TGCCAGCCAACTACTAAGCA	CNTN5_48	GCCTAAATTCTGCTGGTCCT	60
24	522	CNTN5_43	TGGCCCTTTTGTGTACTTCT	CNTN5_44	TCTGCAATTGTGAGCAGATT	60
25	702	CNTN5_45	TCTCATGATTGGATGTGTTTG	CNTN5_46	CTTAACAAATGGATGGCACA	60
2	646	CNTN6_1	ATTATGATGCAACCCCCTTA	CNTN6_2	AAACTTTCCCTGTCTGAGTCAT	60
3	460	CNTN6_3	GGGTAATAGGGGATTGGTTT	CNTN6_4	ATTGTCACATGGCTGCATAC	60
4	469	CNTN6_5	CCAAGACAGCTACCTTTGGT	CNTN6_6	CATTGTCAAAAGCCCATAAA	60
5	542	CNTN6_7	ACCTTCCTTGGACAGACAAA	CNTN6_8	GCACTTGACGAGAGTCACAA	60
6	625	CNTN6_9	AAAAGTCAATGATGGGGAAA	CNTN6_10	GAACCATGTCTACTGCACCA	60
7	602	CNTN6_11	TTAGCTGAAAACATCCCGTTG	CNTN6_12	GAATTGCAGCCCTGATCATT	60
8	486	CNTN6_13	GCATACGGCAGGCACTTAAT	CNTN6_14	TCCCGTGACACTTTTTCACA	60
9	591	CNTN6_15	ATTGAAGCTCCTGCATGTCC	CNTN6_16	TATCCGTGTCGATGATGACG	60
10	589	CNTN6_17	GAAAGCCAAGGCAGTGTTCT	CNTN6_18	AAAATTGGGTTGGGATTATGC	60
11	591	CNTN6_19	GGTCCAAGAACACCTTGAGC	CNTN6_20	TTCAGGAGGAAGCCTTCAAA	60
12	559	CNTN6_21	TGCTTTGAAATCGACAATGA	CNTN6_22	ACTGGCAAAGTGTGCATGTT	60
13	468	CNTN6_23	TGTAGAACTCCAGGTTGCAT	CNTN6_24	TCTACGGAAGACACGAAACA	60
14	492	CNTN6_25	TTTGTTTCGTGTCTTCCGTA	CNTN6_26	TACCCATACCATGGAGTCCT	60
15	533	CNTN6_27	TGCAATCATCCTATGCCTGA	CNTN6_28	AAGGCACCTAGGTTGGGACT	60
16	587	CNTN6_29	CAGGCTGTTGCTACAGGTGA	CNTN6_30	GATGCGATGCAAACACAGTT	60
17	496	CNTN6_31	GAGCCAGGGTGCTCATGTAT	CNTN6_32	TTGGGAGAAAATTGTGCTGA	60
18+19	780	CNTN6_33	TGGCATTCCAAATAAAAGTG	CNTN6_34	GCTCACCTACCCTGTCTCAA	60
20	602	CNTN6_35	CCTTGTGGTTGTGGTTGATA	CNTN6_36	TACCACCTAACGTTCCAAGG	60
21	590	CNTN6_37	CATTCCCAAATGACCAGATT	CNTN6_38	TGCACATAAGCCATCATCTT	60
22	590	CNTN6_39	CAGTGACTTTCCACAGCAAG	CNTN6_40	CTCATCACCTTTTGCTCACA	60
23	573	CNTN6_41	GACACGGTAAGGCACTTTCT	CNTN6_42	AGCATCATTGAGGGGAGTTA	60

PCR reactions were performed using BioTaq DNA polymerase (Gentaur) and the following protocol: 94°C for 4 min, followed by 35 cycles of: 94°C-initiation for 30 seconds; annealing for 40 seconds and 72°C-elongation for 30 seconds; and a final 72°C-elongation for 10 min.

Table S5. Primers used for site-directed mutagenesis of *CNTN6* variants

a.a. change	rat cDNA nt change(s)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CNTN6_S57L	c170t + t171a	AGTTGTACTGCAAGTGGATACCCTT**TA**CCCCACTACAGGT	ACCTGTAGTGGGG**TA**AAGGGTATCCACTTGCAGTACAACT
CNTN6_R303Q	g908a	CGTTGCAGGTAACCTTC**A**AGGAAGAAACCTTGCAA	TTGCAAGGTTTCTTCCT**T**GAAGGTTACCTGCAACG
CNTN6_G310S	g928a	GAGGAAGAAACCTTGCAAAG**A**GTCAACTCATTTTCTATGCT	AGCATAGAAAATGAGTTGAC**T**CTTTGCAAGGTTTCTTCCTC
CNTN6_N377S	a1130g	GACTCTTATCATCACCATGCTGA**G**CGTGTCAGACTC	GAGTCTGACACG**C**TCAGCATGGTGATGATAAGAGTC
CNTN6_S419C	c1256g + a1257t	TCCAGATTTCTCAAAAAATCCCATTAAAAAAATTT**GT**GTTGTTCAAGTTGGTGGTG	CACCACCAACTTGAACAAC**AC**AAATTTTTTTAATGGGATTTTTTGAGAAATCTGGA
CNTN6_G678S	g2032t + g2033c	AATATGAATTTCGTGTTGTTGCT**TC**GAACAACATTGGAATTGGAGAGC	GCTCTCCAATTCCAATGTTGTTC**GA**AGCAACAACACGAAATTCATATT
CNTN6_I683S	t2048g	TGTTGCTGGGAACAACATTGGAA**G**TGGAGAGCCAAG	CTTGGCTCTCCA**C**TTCCAATGTTGTTCCCAGCAACA
CNTN6_P770S	c2308t	ACAGAAATGAAAGCATCATG**T**CTTTGTCTCCCTTTGAAGTC	GACTTCAAAGGGAGACAAAG**A**CATGATGCTTTCATTTCTGT
CNTN6_S858N	g2573a	AAAGAATCTATGATTGGGAAAATTAGAGTCA**A**TGGAAATGTCACAACC	GGTTGTGACATTTCCA**T**TGACTCTAATTTTCCCAATCATAGATTCTTT
CNTN6_T958I	c2873t	GTAAAACTCATGTCTTGGAAACAAATAATA**T**ATCAGCTGAGCTACTG	CAGTAGCTCAGCTGATA**T**ATTATTTGTTTCCAAGACATGAGTTTTAC

Mutated nucleotides are shown in blue.

Supplementary Table S6. *CNTN5* coding variants identified in this study

	Detected variants				Frequency [c]			PolyPhen2	Inheritance	
	Exon[a]	Nucleotide change [b] (chr. 11)	dbSNP (build 137)	a. a. change	ASD PARIS [c] (n=212)	ASD Canada (n=289)	Controls (n=217)	Domain	(Hum_Div) [d]	PARIS	Canada
ASD only	8	g. 99827588 G>T [#]	unknown	p. D242Y	1	0	0	Ig2	deleterious	M	-
	8	g. 99827624 C>T [#]	unknown	p. L254F	1	0	0	Ig2	deleterious	P	-
	10	g. 99931978 G>A	rs200767659	p. G339S	0	1	0	Ig3	deleterious	-	P
	10	g. 99932054 C>T	rs200797524	p. A364V	1	0	0	Ig3	deleterious	M	-
	14	g. 100061860 T>C	unknown	p. I528T	1	0	0	Ig5	neutral	M	-
	20	g. 100169923 A>C	rs200512456	p. E805D	0	2	0	FN2	deleterious	-	2 M
	20	g. 100170018 G>A	rs199937129	p. R837Q	0	1	0	FN2	deleterious	-	M
	21	g. 100179121 C>T	rs200726875	p. A884V	0	1	0	FN3	deleterious	-	P
	21	g. 100179166 T>C	rs201978001	p. I899T	1	0	0	FN3	neutral	M	-
	21	g. 100211262 C>T	rs201747311	p. S933F	0	1	0	FN3	deleterious	-	1 M
	21	g. 100211267 G>A	unknown	p. V935I	0	1	0	FN3	neutral	-	M
ASD and controls	6	g. 99715891 T>G	rs61749255	p. I158M	1	6	2	Ig1	deleterious	-	2 P, 4 M
	14	g. 100061865 A>G	rs11223168	p. I530V	32 htz	27 htz (3 hmz)	40 htz (1 hmz)	Ig5	neutral	-	-
	19	g. 100168410 T>A	rs141228828	p. L790I	6	2	4	FN2	deleterious	4 P, 1 M	1 M
	20	g. 100170119 G>C	rs200130506	p. A871P	1	0	1	-	deleterious	-	-
	25	g. 100226883 T>A	rs1216183	p. S1079T	50 htz (2 hmz)	54 htz (4 hmz)	46 htz (6 hmz)	-	neutral	-	-
	24	g. 100221596 A>T	rs1944169	p. Y1065F	0	0[e]	1	-	neutral	M	-
Controls only	8	g. 99827639 G>A	unknown	p. V259I	0	0	1	Ig2	neutral	-	-
	10	g. 99931945 C>G [#]	rs201910584	p. P328A	0	0	1	Ig3	deleterious	-	-
	10	g. 99932033 C>T [#]	rs56122118	p. P357L	0	0	1	Ig3	deleterious	-	-
	18	g. 100141888 delA	unknown	p. E743Dfs*5	0	0	1	FN1	-	-	-

[a] Variants in Exon 4 of *CNTN5* were not reported since there were discrepancies between results obtained through next generation sequencing and Sanger sequencing. [b]Nucleotide positions correspond to the NCBI37/hg19 build. [c] In order to have geographically matched patients and controls, among the 226 patients with ASD, 14 individuals were non from European descent and were not included in the statistical analysis. Yet, one coding-sequence variant, $CNTN5^{Y1065F}$, was identified in a patient from African origin. [d] PolyPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), which classifies variants into benign, possibly damaging and probably damaging. htz: Heterozygote; hmz: homozygote. P : Paternal; M: Maternal

Supplementary Table S7. *CNTN6* coding variants identified in this study

	Detected variants				Frequency				Inheritance	
	Exon	Nucleotide change [a] (chr. 11)	dbSNP (build 137)	a. a. change	ASD PARIS (n=212)	ASD Canada (n=289)	Controls (n=217)	Domain	PolyPhen2 (Hum_Div) [b]	PARIS	Canada
ASD only	3	g. 1262427 C>G	unknown	p. P38A	0	1	0	Ig1	deleterious	-	P
	3	g. 1262485 C>T	unknown	p. S57L	1	0	0	Ig1	neutral	P	-
	4	g. 1269644 A>G	unknown	p. I109V	0	1	0	Ig1	neutral	-	M
	5	g. 1320187 T>C	rs6808056	p. F150S	1	0	0	Ig2	neutral	P	-
	8	g. 1363500 G>A	rs149799168	p. G310S	1	1	0	-	deleterious	P	1 M
	9	g. 1367553 A>C	unknown	p. N334T	0	1	0	Ig4	neutral	-	M
	11	g. 1371511 C>G	unknown	p. S419C	1	0	0	Ig5	deleterious	P	-
	13	g. 1414075 A>C	rs139645898	p. I529L	0	2	0	Ig6	neutral	-	1 P, 1 M
	16	g. 1415710 T>G	unknown	p. I683S	1	0	0	FN1	deleterious	P	-
	18	g. 1424767 C>T	unknown	p. P770S	1	0	0	FN2	deleterious	P	-
	18	g. 1424768 C>T	unknown	p. P770L	1	0	0	FN2	deleterious	de novo	-
	19	g. 1425055 C>T	rs115667338	p. A827V	0	1	0	FN3	deleterious	-	P
	20	g. 1427350 G>A	unknown	p. S858N	1	0	0	FN3	neutral	P	-
	21	g. 1443180 G>A	unknown	p. W923X	0	1	0	FN4	-	-	1 M
	22	g. 1444057 C>T	unknown	p. T958I	1	0	0	FN4	deleterious	M	-
	22	g. 1444167 T>A	rs139391275	p. S995T	0	1	0	FN4	deleterious	-	P
ASD and Controls	8	g. 1363480 G>A	rs41293401	p. R303Q	3 htz (1 hmz)	5	6	Ig3	deleterious	1 M, 1 P	4 P, 7 M
Controls only	10	g. 1369187 A>G	unknown	p. N377S	0	0	1	Ig4	deleterious	-	-
	16	g. 1415694 G>A	rs138682306	p. G678S	0	0	1	FN1	neutral	-	-

[a] Nucleotide positions correspond to the NCBI37/hg19 build. [b] PolyPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), which classifies variants into benign, possibly damaging and probably damaging . htz: Heterozygote; hmz: homozygote.

Supplementary Table S8. Clinical characterization of patients carrying *CNTN5* or *CNTN6* variants and evaluated for auditory brainstem responses

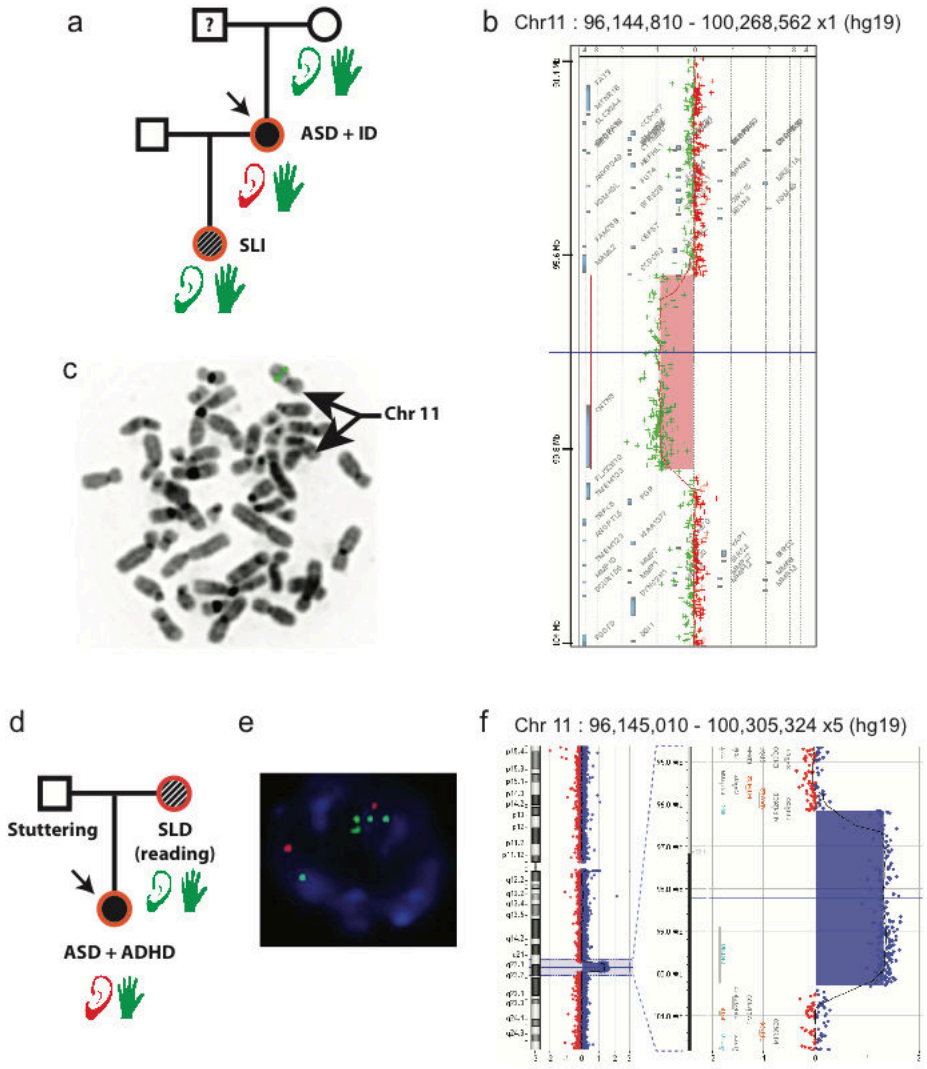
FAMILY	AU-DIJ-001	AU-DIJ-002	AU-RD-124	AU-FRA-035	AU-RD-183	AU-RD-192	AU-FRA-033	AU-RD-237	AU-RD-068
GENETICS									
Gene	*CNTN5*	*CNTN5*	*CNTN5*	*CNTN6*	*CNTN6*	*CNTN6*	*CNTN6*	*CNTN6*	*CNTN6*
Mutation	CNV/deletion	CNV/X5	L254F	CNV/deletion	CNV/deletion	CNV/deletion	I683S	S858N	G310S
Transmission	unknown	maternal	paternal	paternal	paternal	maternal	paternal	paternal	paternal
SEX	f	f	m	f	m	m	m	m	m
AGE	32	6	21	13	13	13	13	24	39
DIAGNOSIS ASSESSMENT	ASD	ASD	ASD	ASD	ASD	ASD	ASD	ASD	ASD
ADI-R									
Age at the time of evaluation (years)	32	5	10	6	3	3	7		28
Age of first symptoms (months)		24	2	18		18	30		10
Social domain (cut- off:10)	13	9	28	23	13	28	17		21
Communication domain: verbal (cut-off: 8) & non verbal (cut-off: 7)	13 - 7	13	11 (nv)	18 - 12	11 (nv)	11 (nv)	10 - 6		18 - 11
Repetitive domain (cut-off: 3)	4	1	5	4	4	4	8		9
ADOS									
Communication domain (cut-off: 5)		2	6	9		7	4		10
Social interaction domain (cut-off: 6)		4	12	14		7	15		13
Total		6	18	23		14	19		23
Interest and Behaviors			2	1			2		1
DSM-5 criteria	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes		yes
IQ MEASUREMENT									
Scales	RPM	Wechsler	RPM	RPM	Wechsler	RPM	Wechsler	RPM	RPM
Full IQ scores	70	82	75	84	96	93	85	84	66
MEDICAL HISTORY									
Pregnancy and delivery									
Course of pregnancy	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	twin	normal
Delivery course	eutocic	dystocic	dystocic	dystocic	eutocic	eutocic	dystocic	eutocic	eutocic
APGAR at 1 et 10 min (/10)		10 - 10	9 - 10	9 - 10	10 - 10	10 - 10	8 - 10	10 - 10	10 - 10

Birth heigh (cm) / weight (g) / head circumference (cm)		46/2790/32	54/3780/36	49/2600/ --	51/2960/33,5	51/3500/36	48 /3300/33	--/--/--	48/2950/33
Milestones									
walking (m)	18	12	10	14	14	13	13	18	24
first words (m)		18	18	14		24	13		48
first sentence (m)	48	30	no functional language	40	no functional language	54	26	36	no language
Main somatic comorbidities	Alopecia areata Hair loss	no	Febrile seizures at day 2 post birth	no	no	no	no		
Main psychiatric comorbidities		ADHD	no	Single phobia	ADHD	ADHD	Sleep-onset insomnia, ADHD	Panic disorder with agoraphobia, cannabis dependence	
CLINICAL EXAMINATION									
Developmental Coordination Disorder*	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	NA	yes
Ear Nose Throat examination									
Subjective features	painful hyperacusis	painful hyperacusis	painful hyperacusis	painful hyperacusis	painful hyperacusis	painful hyperacusis	painful hyperacusis	auditory hallucinations	painful hyperacusis
Auditory acuity tests	normal range		normal range	normal range	normal range	normal range	normal range	normal range	non compliant
Auditory brainstem response test	normal range		shortened wave I-V interpeak latency	shortened wave I-V interpeak latency	shortened wave I-V interpeak latency	normal range	shortened wave I-V interpeak latency	wave I-V interpeak latency shortened	non compliant
FAMILY HISTORY									
Father		sluttering		ASD without ID			chronic motor tic disorder	GAD	
Mother		dyslexia/ dysgraphia			MDD, anxiety disorder		MDD	GAD	
Siblings, other members	One daughter with ID carrying the deletion	Cousin with epilepsy		One brother with ASD but without ID not carrying the deletion			One brother with ASD and ID not carrying the variant	Two brothers, both with ASD without ID all carrying the variant	

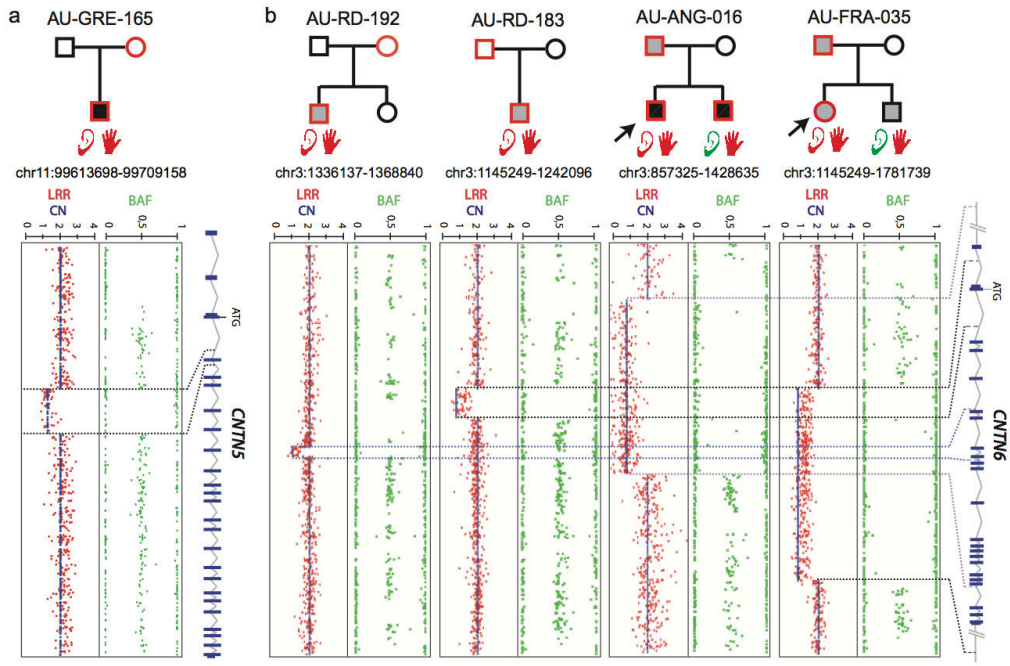
GAD: generalized anxiety disorder; IQ: intellectual quotient; MDD: mood disorder; RPM: Raven's Progressive matrices, m: male; f: female; nv: non verbal;
* based on the Neurological exam, the ADI-R and the Developmental Coordination Disorder Questionnaire

Supplementary Table S9. Auditory brainstem responses in patients and their relatives.

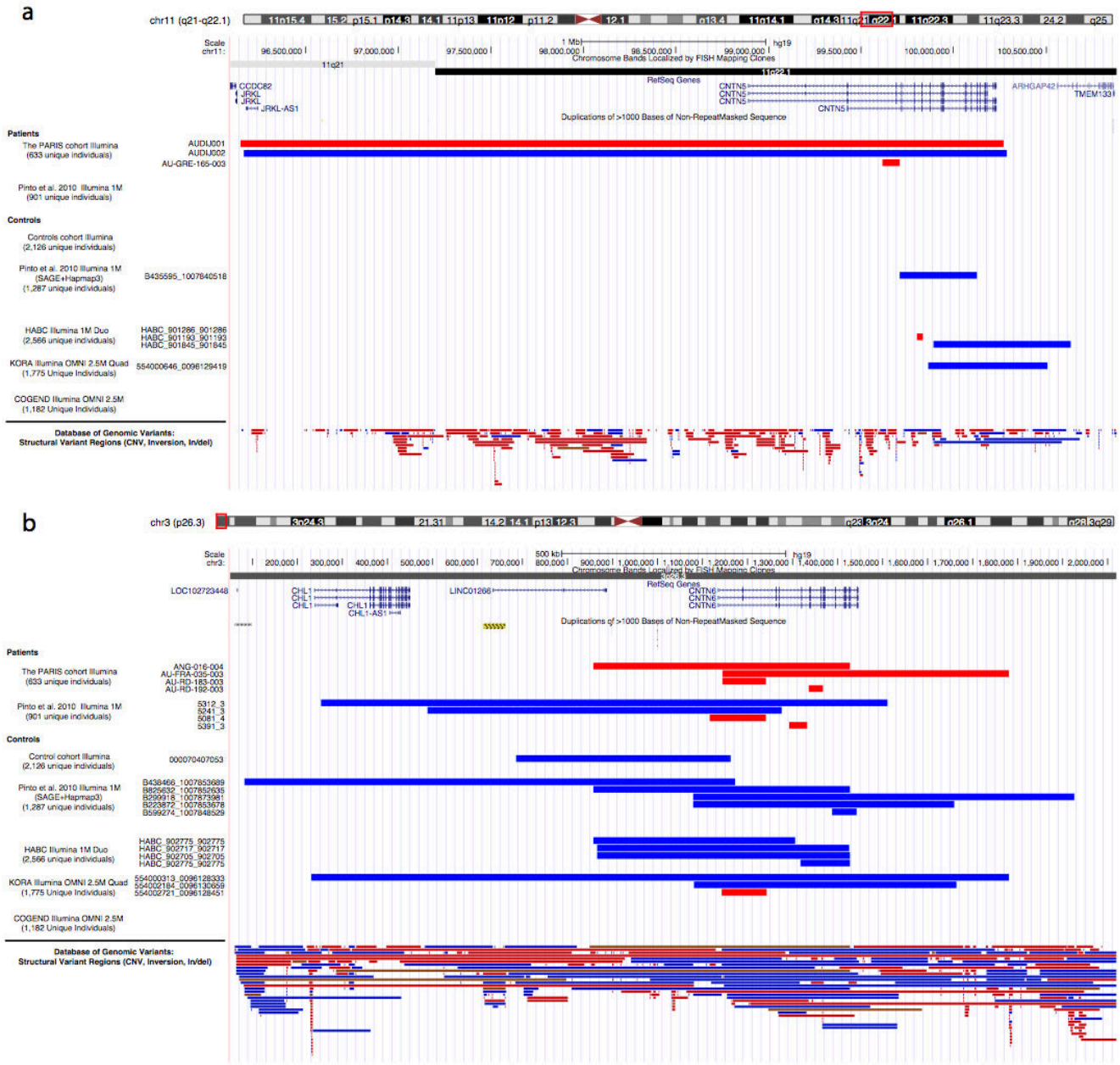
	LEFT EAR					RIGHT EAR				
	Frequency: 29 clicks / sec					*Frequency: 29 clicks / sec*				
	Affected Carriers (mean/SD/N)	Unaffected carriers (mean/SD/N)	Unaffected non carriers (mean/SD/N)	KW(2df) $\chi 2$	p	Affected Carriers (mean/SD/N)	Unaffected carriers (mean/SD/N)	Unaffected non carriers (mean/SD/N)	KW(2df) $\chi 2$	p
Intensity: 80 dB										
latency V	5.50/0.38/6	5.55/0.45/7	5.41/0.21/5	0.51	0.78	5.47/0.39/7	5.75/0.46/7	5.44/0.38/8	1.89	0.39
latency III-V	1.88/0.22/5	1.90/0.24/6	1.78/0.18/5	1.56	0.46	2.03/0.36/5	2.02/0.63/7	1.65/0.15/7	4.26	0.12
latency I-V	3.96/0.43/4	4.14/0.33/6	3.86/0.14/5	2.22	0.33	4.23/0.21/5	4.11/0.48/7	3.72/0.49/7	4.63	0.09
latency I-III	2.06/0.22/4	2.23/0.19/6	2.07/0.15/5	2.17	0.34	2.30/0.21/5	2.09/0.40/7	2.17/0.10/6	2.19	0.33
latency III	3.41/0.52/5	3.78/0.2/6	3.75/0.19/5	2.55	0.28	3.48/0.46/4	3.62/0.37/7	3.65/0.28/6	0.33	0.84
latency I	1.25/0.33/4	1.54/0.12/6	1.65/0.32/5	4.74	0.09	1.30/0.30/5	1.53/0.13/7	1.61/0.15/7	4.21	0.12
Intensity: 60 dB										
latency V	5.94/0.61/9	6.61/0.74/5	6.12/0.44/8	4.18	0.12	5.89/0.32/9	6.33/0.29/5	5.95/0.45/8	4.72	0.09
latency III-V	1.90/0.30/7	2.05/0.07/2	1.79/0.27/5	2.67	0.26	2.00/0.25/7	1.93/0.21/4	1.71/0.16/6	5.18	0.08
latency I-V	3.88/0.24/6	4.60/0.32/2	4.20/0.32/6	5.87	0.05	3.94/0.48/4	3.10/0.25/3	3.77/0.32/8	1.63	0.44
latency I-III	2.13/0.18/6	2.27/0.00/1	2.16/0.33/5	0.21	0.90	2.10/0.41/4	2.21/2.3/3	0.81/2.90/6	2.51	0.29
latency III	4.03/0.70/7	3.95/0.11/2	4.04/0.52/4	0.17	0.92	3.91/0.14/7	4.55/0.43/4	4.10/0.45/6	4.76	0.09
latency I	1.80/0.14/6	1.72/0.07/2	1.83/0.32/6	0.99	0.61	1.90/0.18/4	2.52/0.20/3	2.04/0.35/8	5.62	0.06



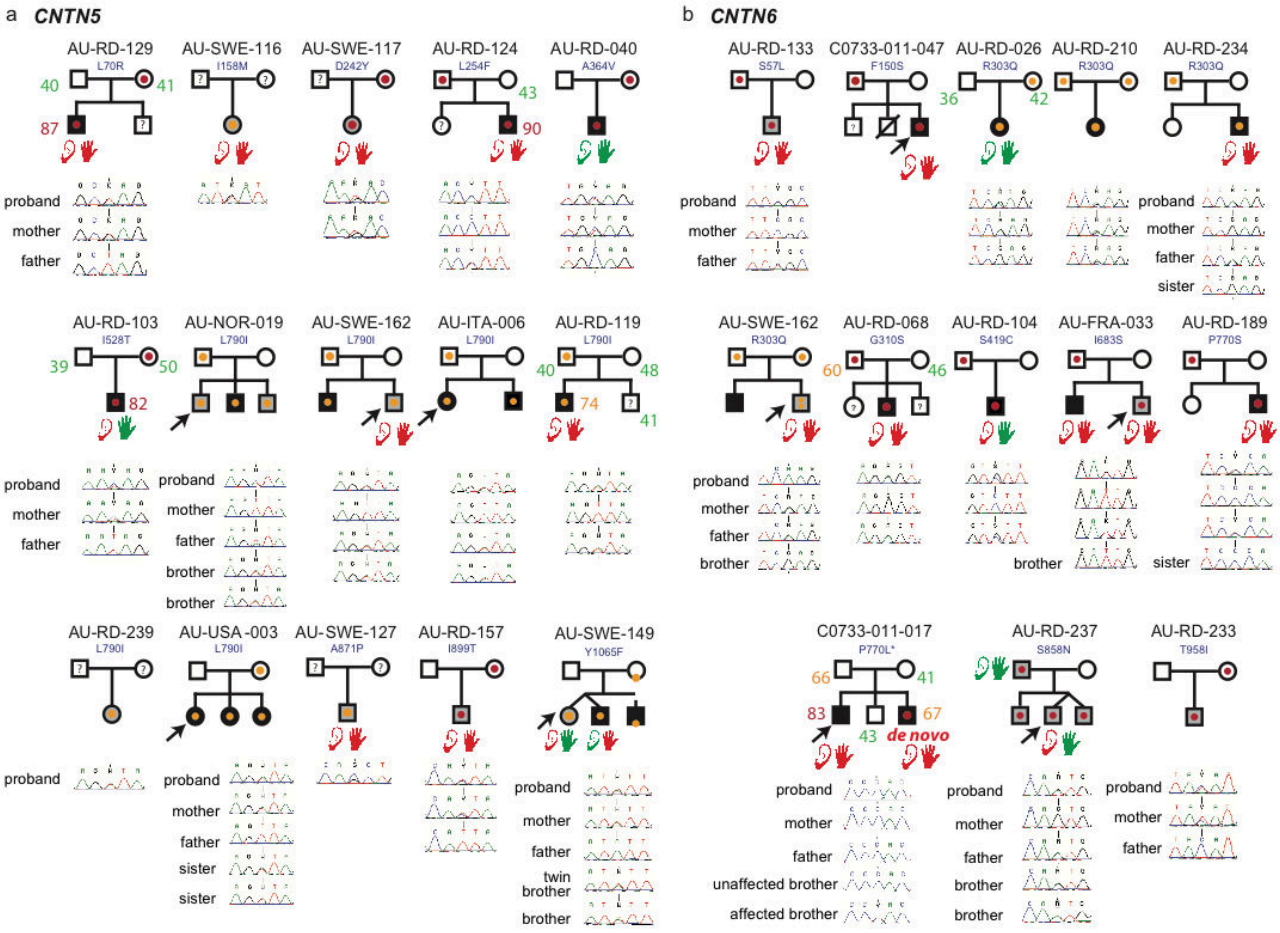
Supplementary Figure S1. Genetic and clinical characterization of the family AUDIJ001 and AUDIJ002 carrying *CNTN5* CNVs. Family AUDIJ001 (a) The *CNTN5* deletion was transmitted from the proband with ASD to her daughter with specific language impairment (SLI). **(b)** Agilent array-CGH 180K profile of the daughter showing the 11q21q22.1 deletion (4.1 Mb) encompassing all the exons of *CNTN5* (chr11: 96,144,810-100,268,562). *JRKL antisense RNA 1* is deleted, but not *MAML2*. **(c)** Inverse DAPI FISH image: the control probe RP11-176D23 (green) spanning *CNTN5* confirmed the heterozygous 11q21q22.1 deletion. Arrows indicate both chromosomes 11. **Family AUDIJ002 (d)** The proband with ASD and ADHD carried 5 copies of *CNTN5* inherited from her mother diagnosed with specific learning disorder (SLD, reading). **(e)** Interphase FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) image of the 5 copies of *CNTN5* in the proband (probe RP11-418D05 in green) on chromosome 11 (the probe RP11-583A17 in 11p15.5 is labeled in red). **(f)** Agilent array-CGH (Comparative Genomic Hybridization) 180K profile of the daughter showing the 5 copies of *CNTN5* (chr11:96,145,010-100,305,324).



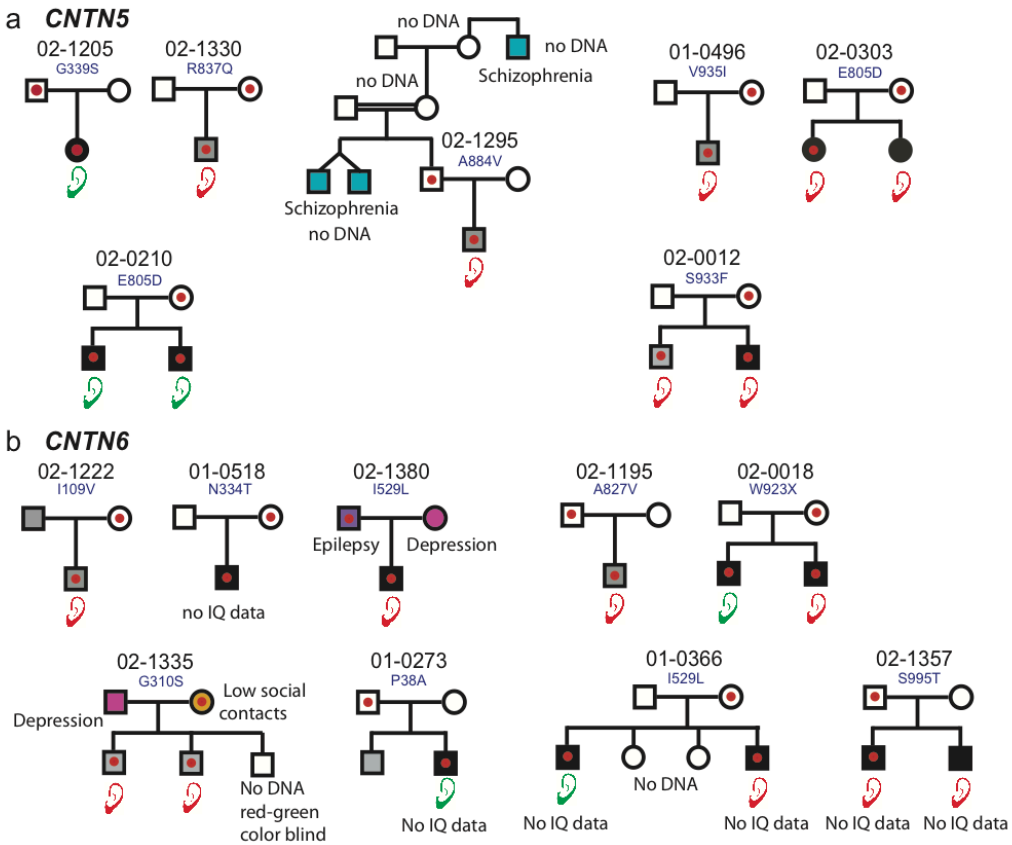
Supplementary Figure S2. *CNTN5* and *CNTN6* copy-number variants identified in patients with ASD. *CNTN5* and *CNTN6* CNVs were detected using the HumanOmni1 Illumina array. For each SNP, a green dot represents the B Allele Frequency (BAF) and a red dot, the log R ratio (LRR) of hybridization intensity. The blue line shows the predicted number of copies (CN). Black-filled symbols indicate a diagnosis of ASD with intellectual disability, while grey-filled symbols indicate a diagnosis of ASD without intellectual disability. In multiplex families, an arrow indicates the proband. Based on the ADI-R and clinical examination, normal (green) or abnormal (red) hypersensitivity to sounds and motor coordination ability are indicated by a schematic ear and hand, respectively. The absence of ear/hand means that information was not available. All exonic120
CNVs of *CNTN5* or *CNTN6* identified in patients and controls are shown in Supplementary Figure S3.



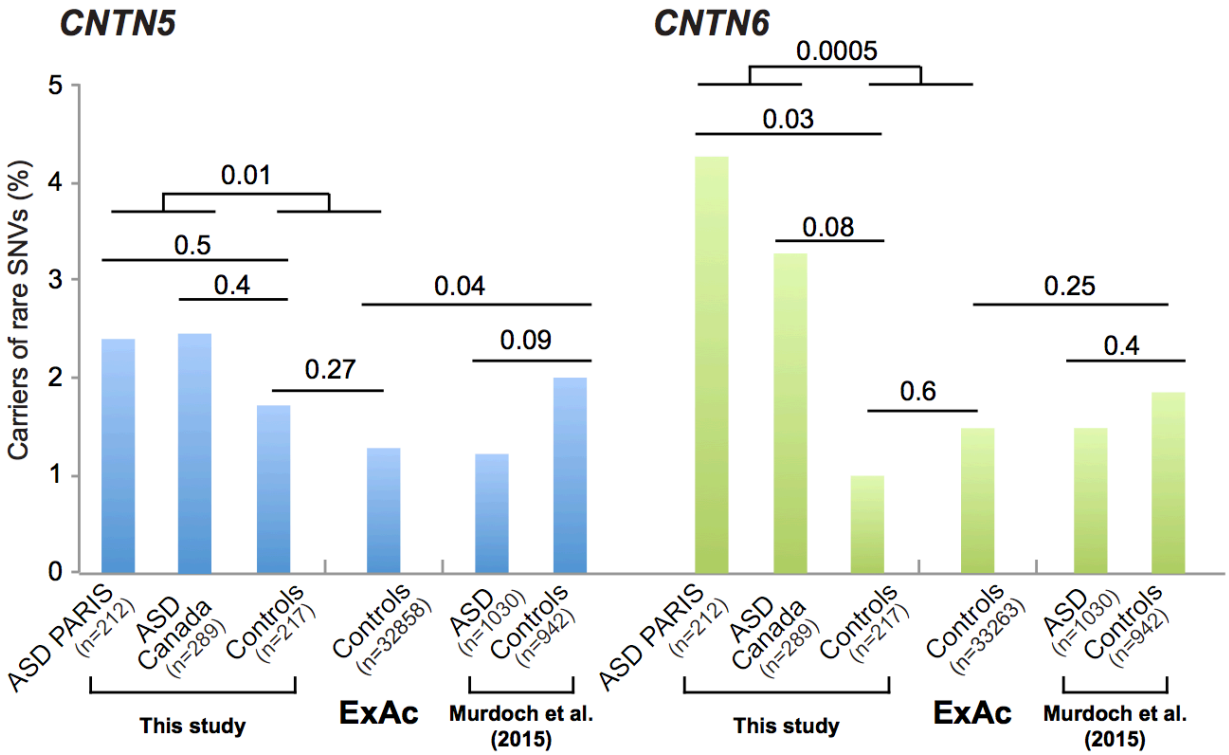
Supplementary Figure S3. Localization of the exonic CNVs (> 30kb) affecting *CNTN5* (a) or *CNTN6* (b) in patients and controls. HBAC: Health Aging and Body Composition cohort; KORA: KORA ("Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg" which translates as "Cooperative Health Research in the Region of Augsburg"); COGEND: Collaborative Genetic Study of Nicotine Dependence



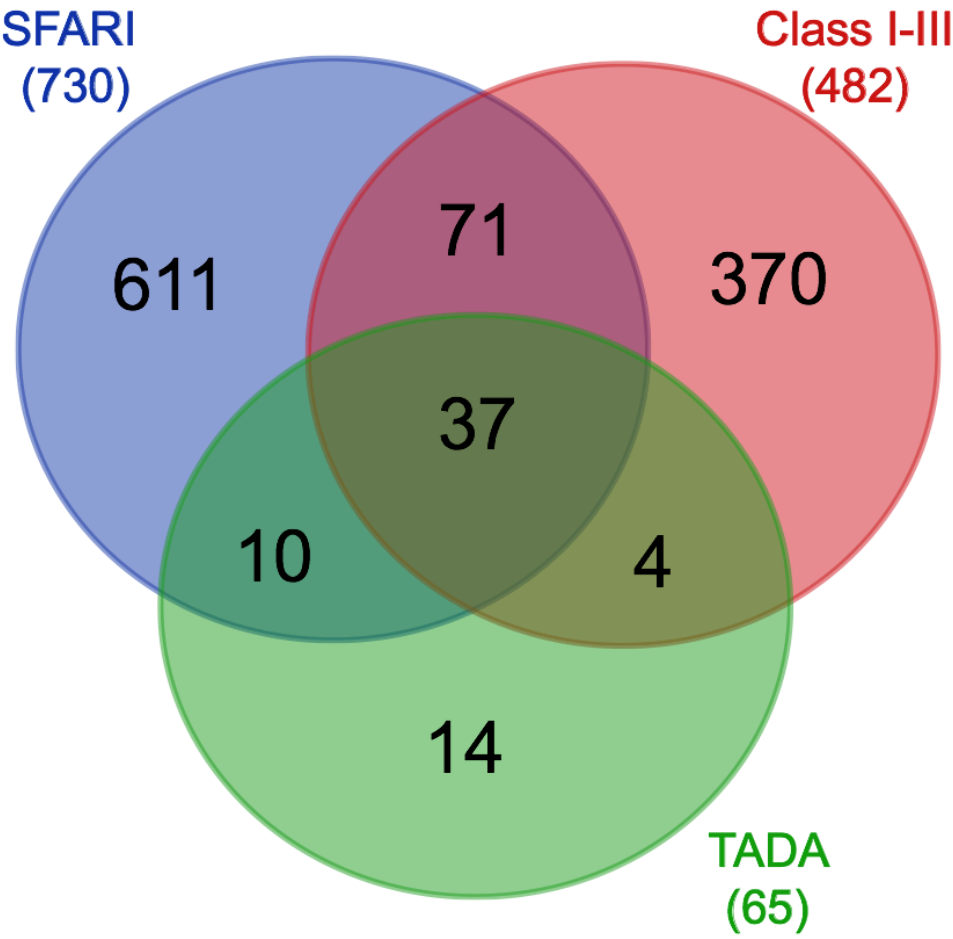
Supplementary Figure S4. Families with *CNTN5* and *CNTN6* coding SNVs from the PARIS cohort. The patients with ASD from the PARIS cohort (N=212) were investigated using Sanger sequencing. Coding-sequence variants are represented by dots (two dots = homozygous state). Black-filled symbols indicate a diagnosis of ASD with intellectual disability, while grey-filled symbols indicate a diagnosis of ASD without intellectual disability. In multiplex families, an arrow indicates the proband. Based on the ADI-R and clinical examination, normal (green) or abnormal (red) hypersensitivity to sounds and motor coordination ability are indicated by a schematic ear and hand, respectively. The absence of ear/hand means that information was not available. The scores for Social Responsiveness Scale are indicated when available. A total score of 76 or higher (red) is considered severe and strongly associated with clinical diagnosis of Autistic Disorder. Scores of 60 through 75 (Orange) are interpreted as indicating mild to moderate deficiencies in reciprocal social behavior. Scores of 59 and below (green) are considered to be within typical limits and generally not associated with clinically significant ASD. A question mark means that DNA was unavailable. The family AU-SWE-162 carried the CNTN5^{L790I} and the CNTN6^{R303Q}.



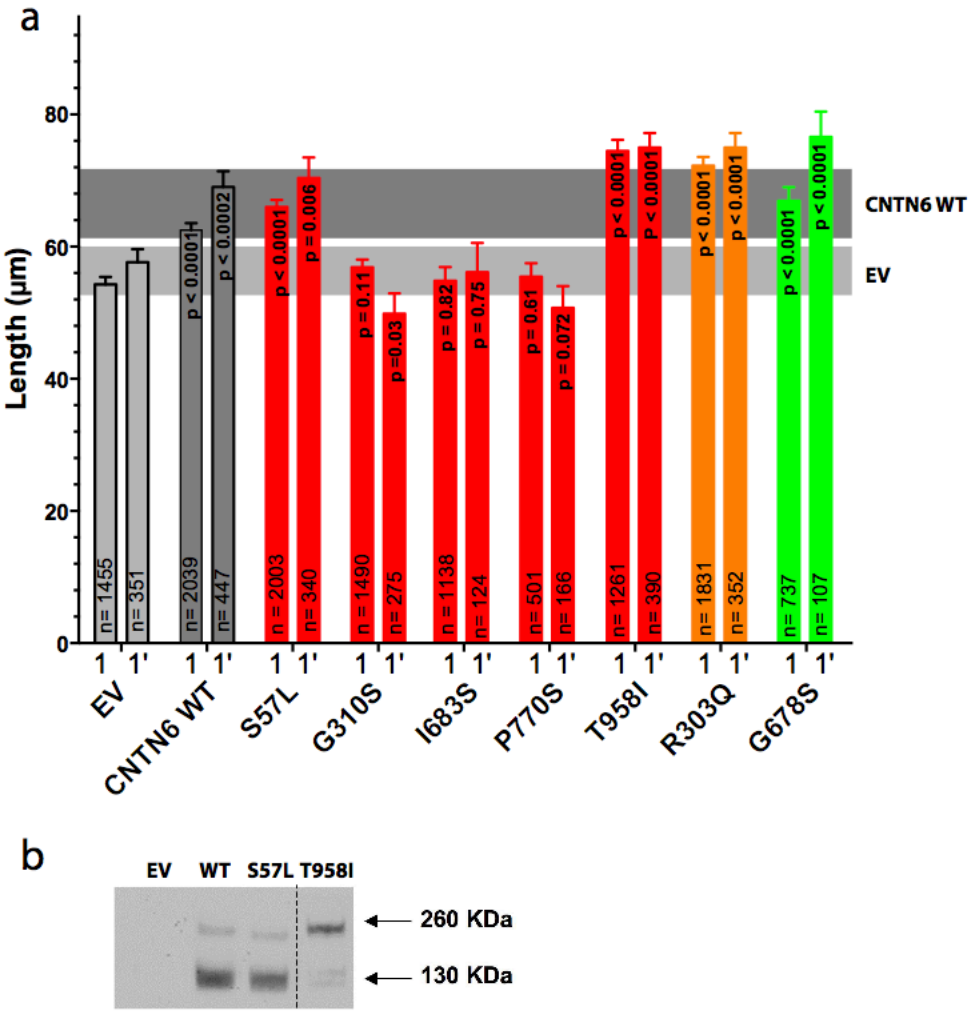
Supplementary Figure S5. Families with *CNTN5* and *CNTN6* coding SNVs from Canada. The cohort of patients with ASD from Canada (N=289 families) was investigated using whole genome sequencing. Coding-sequence variants are represented by dots. Black-filled symbols indicate a diagnosis of ASD with intellectual disability, while grey-filled symbols indicate a diagnosis of ASD without intellectual disability. For some individuals there was no information on IQ. Based on the ADI-R and clinical examination, normal (green) or abnormal (red) hypersensitivity to sounds is indicated by a schematic ear. The absence of ear means that information was not available.



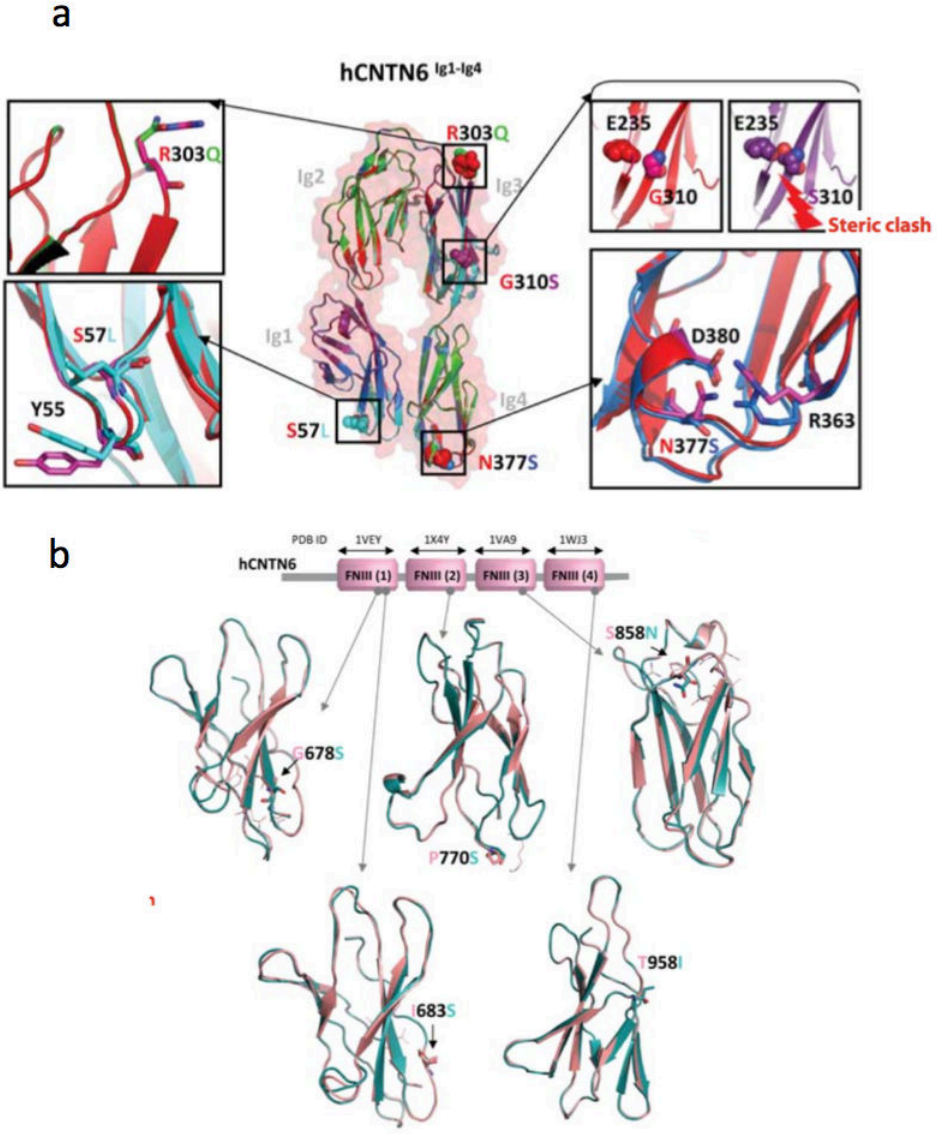
Supplementary Figure S6. Frequency of *CNTN6* private SNVs in this study, in Murdoch et al. PLOS Genetics (2015) and in the ExAC cohort. The SNVs with a single allele count in the ExAC cohort can be found at http://exac.broadinstitute.org/. Private mutations in this study and in Murdoch et al. (2015) met the following criteria: seen only once in either cases or controls exclusively, missense, nonsense, splice site, or start or stop codon disruptions with a frequency of less than 1% in the ExAC database.



Supplementary Figure S7. Venn diagram of the ASD-risk genes from different databases. The ASD genes were taken from the Class I-III genes of Yuen et al. (2015) [1], the TADA genes from Sanders et al. (2015) [2] or from the SFARI database (https://gene.sfari.org/autdb/Welcome.do). The complete list of genes is available as an excel file in the supplementary Table S10. The 37 genes present in the 3 databases are: *NRXN1, SHANK3, KDM5B, WDFY3, KDM6B, NCKAP1, ASH1L, PTEN, TCF7L2, DYRK1A, BCL11A, GRIN2B, SYNGAP1, ADNP, ANK2, ETFB, APH1A, CTTNBP2, CUL3, NAA15, KATNAL2, NLGN3, MIB1, SUV420H1, TBR1, SHANK2, MBD5, CHD8, ARID1B, POGZ, SETD5, TRIO, KMT2C, MYT1L, GABRB3, SCN2A, FOXP1.*



Supplementary Figure S8. Impact of the CNTN6 variants on neurite outgrowth. Cultures of cortical neurons were prepared using newborn rats (P0-P1) as described in Materials and Methods. **a.** The length of the longest neurite (mean +/- SEM) was measured in two independent experiments (1 and 1'). Neurons were co-cultured with HEK cells expressing the empty vector (EV), the wild-type CNTN6 (WT) or the CNTN6 carrying the variants identified in patients only (red), in patients and controls (orange) or in controls only (green). The intervals for the length of the longest neurite for experiments performed with the EV or the CNTN6 WT are indicated by the light and dark grey bars, respectively. The numbers of neurons analyzed are indicated in the graph. Statistical analyses were performed by using a F test to compare variances, followed by an impaired t-test with Welch correction. **b.** Representative western blots of selected co-culture supernatants for the detection of CNTN6 protein. No CNTN was detected with the empty vector (EV). Western blot of CNTN6 WT, $CNTN6^{S57L}$ show a major band at the expected molecular weight of 130 KDa. For $CNTN6^{T958I}$, we observed a major band at 260KDa suggesting a dimeric form of the protein.



Supplementary Figure S9. Effect of CNTN6 variants on protein structure. (a) Structure of the immunoglobulin domains. Models of wild-type and mutated human CNTN6 Ig1-4 are superimposed, the variants are mapped in spheres. Close views highlight the impact of CNTN6^{G310S} on the structure. **(b)** Structure of the fibronectin domains. Each Protein Data Bank (PDB) ID used for the 3D-BLAST is indicated.

References

1. Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N *et al.* Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat Med* 2015; 21: 185-191.FORMAT

2. Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE *et al.* Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* 2015; 87: 1215-1233.FORMAT