



HAL
open science

Identification de profils omiques liés à la sévérité des maladies psychiatriques du spectre affectif à psychotiques

Pierre Solomon

► To cite this version:

Pierre Solomon. Identification de profils omiques liés à la sévérité des maladies psychiatriques du spectre affectif à psychotiques. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2024. Français. NNT: 2024NANU1029 . tel-04907055

HAL Id: tel-04907055

<https://theses.hal.science/tel-04907055v1>

Submitted on 22 Jan 2025

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.

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Immunologie

Par

Pierre Solomon

**« Identification de profils omiques liés à la sévérité des maladies
psychiatriques du spectre affectif à psychotiques »**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 13/12/2024

Unité de recherche : Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie Translationnelle (CR2TI)
UMR1064 – CHU Nantes – Hotel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01

Rapporteurs avant soutenance :

Raoul Belzeaux Professeur d'université – Praticien Hospitalier (PU-PH), Faculté de Médecine,
Université de Montpellier
Marion Leboyer Professeur d'université – Praticien Hospitalier (PU-PH), Laboratoire Neuro-Psychiatrie
translationnelle, Université Paris Est Créteil

Composition du Jury :

Attention, en cas d'absence d'un des membres du Jury le jour de la soutenance, la composition du jury doit être revue pour s'assurer qu'elle est conforme et devra être répercutée sur la couverture de thèse

Président : Marion Leboyer Professeur des universités - Praticien hospitalier, Université Paris Est Créteil,
Laboratoire Neuro-Psychiatrie translationnelle, Créteil, France
Examineurs : Anne Roumier Professeur des universités, Institut du Fer à Moulin UMR 1270, Inserm
& Sorbonne Université
Raoul Belzeaux Professeur des universités - Praticien hospitalier, Faculté de Médecine /
Université de Montpellier
Dir. de thèse : Jérémie Poschmann Directeur de recherche, CR2TI (UMR1064), Nantes Université

Table des matières

Remerciement	5
Liste des abréviations	6
Liste des illustrations.....	10
Préambule	11
1. Introduction	13
1.1 Chapitre 1: Description des approches omiques	13
1.1.1 Les sciences omiques et leurs intérêts pour l'immunologie.....	13
1.1.2 Historique des différents omiques.....	14
1.1.2.1 Modèle fondamental de la biologie moléculaire	14
1.1.2.2 Génome et génomique	15
1.1.2.3 Epigénome et épigénétique	17
1.1.2.4 Transcriptome	19
1.1.2.5 Protéome	23
1.1.3 Composition cellulaire	24
1.1.4 Analyses multiomiques	24
1.2 Chapitre 2: Description des troubles psychiatriques sévères	26
1.2.1 Définition globale	26
1.2.2 Les troubles de l'humeur	27
1.2.2.1 La dépression majeure	27
1.2.2.2 Les troubles bipolaires	29
1.2.3 Les troubles psychotiques	31
1.2.3.1 La schizophrénie.....	31
1.2.3.2 Les troubles Schizo-affectifs.....	33
1.2.4 Etiologie des troubles psychiatriques sévères	33

1.2.4.1 Les causes génétiques	33
1.2.4.2 Les causes non-génétiques	34
1.2.5 Une étiologie commune des troubles psychiatriques sévères	35
1.3 Chapitre 3: Les interactions neuro-immunes	37
1.3.1 Anatomie du système nerveux.....	37
1.3.1.1 Système nerveux central (SNC)	37
1.3.1.2 Protection du SNC par les méninges	39
1.3.1.3 Régulation des échanges entre le SNC et le système circulatoire par la Barrière Hémato-Encéphalique.....	40
1.3.2 La notion de privilège immunitaire	42
1.3.2.1 Définition et origines	42
1.3.2.2 Evolution du concept de privilège immunitaire	43
1.3.3 Troubles psychiatriques et système immunitaire	45
1.3.3.1 Les troubles psychiatriques ont également été associées à une dérégulation du système immunitaire.....	45
1.3.3.2 Hypothèse de l'origine neuro-immunologique des troubles psychiatriques	45
1.4 Chapitre 4: La recherche de biomarqueurs en psychiatrie.....	47
1.4.1 Des biomarqueurs des troubles mentaux ont déjà étaient proposés	47
1.4.2 Absence de biomarqueur validé	47
1.4.3 La classification des troubles psychiatriques est un frein pour l'identification de biomarqueur.....	50
1.4.3.1 Définition de la dichotomie kraepelinienne	50
1.4.3.2 Remise en cause du modèle dichotomique	50
1.4.4 Utilisation de modèles dimensionnels	52
1.4.4.1 Définition des modèles dimensionnels	52
1.4.4.2 Comparaison avec les modèles catégoriels	55

1.4.4.3	Avantage des modèles dimensionnels pour la recherche	56
2.	Objectifs de la thèse: Le projet MulioBio	57
2.1	Hypothèse	57
2.2	Description de l'étude PsyCourse	58
2.3	Description des projets auxquels j'ai participé durant ma thèse	58
3.	Résultats.....	60
3.1	Projet n°1: L'analyse intégrative des profils d'expression des miARN révèle des mécanismes moléculaires distincts et communs sous-jacents aux troubles psychiatriques sévères	60
3.2	Projet n°2: Classification semi-supervisée à l'aide de mesures longitudinales de la sévérité des symptômes	127
3.3	Discussion et perspective	169
3.3.1	Analyse du miRNAome sur des groupes élargis de patients	169
3.3.2	Analyse du SI basée sur des groupes de sévérité des TPS	172
3.3.3	Limitations de cette thèse.....	175
3.3.4	Conclusion et perspectives.....	176
	Références	179
4.	Annexes	203
4.1	Monocyte Signature Associated with Herpes Simplex Virus Reactivation and Neurological Recovery after Brain Injury.....	204

Remerciement

Je tiens en premier à remercier le Dr. Jérémie Poschmann pour son encadrement de mes stages de Master à cette thèse. Mon expérience au CR2TI a été très enrichissante tant sur le plan technique que personnel. Je remercie également le Dr. Antoine Roquilly qui a été mon directeur de thèse pendant environ un an et demi, le temps que Jérémie obtienne son HDR. Vos questions et conseils m'ont beaucoup aidé à avancer lors de ce projet.

Je remercie également le Dr. Raoul Belzeaux, le Dr. Marion Leboyer, et le Dr. Anne Roumier pour avoir accepté de faire partie de mon jury ainsi pour le temps qu'ils ont accordé à l'évaluation de mon travail.

Je remercie sincèrement le Dr. Urs Heilbronner, le Dr. Monika Budde, et le Dr. Thomas G. Schulze pour avoir créé la cohorte PsyCourse et avoir accepté de collaborer avec la CR2TI dans le cadre de ma thèse. Je les remercie également pour l'accueil qu'ils m'ont données lorsque je les ai rencontrés à Munich et pour l'aide qu'ils m'ont apporté tout au long de ce projet.

Un grand merci aux membres de l'équipe 6 du CR2TI pour leur aide durant cette thèse. Merci en particulier à Cynthia et Julie pour leur aide lors de la préparation de mes librairies d'ARN et de CHIP-seq, mais aussi aux autres membres de l'équipe qui m'ont, par leurs questions lors de mes présentations, aidé à améliorer mon travail.

Je remercie également les membres de l'open-space du deuxième étage. Merci à Sumeyye, Raphaëlle, Amandine, Simon, Julie pour la bonne humeur générale qu'ils ont permis durant ces années de thèse. De façon plus générale, je remercie tous ceux qui m'ont soutenu durant ce projet. Un grand merci donc à ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et maintenu motivé durant cette thèse.

Liste des abréviations

AA: apprentissage automatique, en anglais, Machine Learning

Ac: anticorps

ACP: analyse en composantes principales

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

Ag: antigène

AJP: American Journal of Psychiatry

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNnc: ARN non-codants

ARNPII: ARN polymérase II

ARNr: ARN ribosomique

ARNt: ARN de transfert

BHE: Barrière Hémato-Encéphalique

BM: Biomarqueur

CD: cellules dendritiques

CE: cellules endothéliales

CGM: Charge Globale de Morbidité

ChIP: immunoprécipitation de la chromatine

CIM: Classification Internationale des Maladies

CLI: cellules lymphoïdes innées

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CP: Composante Principale

CR2TI: Center for Research in Transplantation and Translational Immunology

DAMP: Motifs moléculaires associés au danger, en anglais, Damage Associated Molecular Pattern

DK: Dichotomie Kraepelinienne

DM: Dépression Majeure

DSM: Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, et des troubles psychiatriques

DZNE: German Center for Neurodegenerative Diseases

EGF: Échelle d'Évaluation Globale du Fonctionnement, en anglais Global Assessment of Functioning

ENCODE: Encyclopédie des éléments de l'ADN

EVCI: Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité

FT: Facteur de Transcription

GABA: acide γ -aminobutyrique, gamma-aminobutyric acid en anglais

GO: ontologie des gènes

GSEA: analyses d'enrichissement d'un ensemble de gènes

GWAS: Etude d'association pangénomique, en anglais Genome-Wide Association Study

HapMap: projet Haplotype Map

HAT: histones acétyltransférases

HDAC: histones désacétylases

HHS: Hypothalamo-Hypophyso-Sorrélien

HSV: Herpes Simplex Virus

IPPG: Institute of Psychiatric Phenomics and Genomics

LB: Lymphocyte B

LCR: liquide céphalo rachidien

LT: Lymphocyte T

miARN: micro-ARN

NGS: Séquençage de Nouvelle Génération, en anglais, Next-Generation Sequencing

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OPCRIT: liste de contrôle des critères opérationnels, en anglais, operational criteria checklist

PANSS: échelle des symptômes positif et négatifs ou en anglais: Positive and Negative Syndrome Scale

PBMC: Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique

PGC: Psychiatric Genomics Consortium

PGH: Projet Génome Humain

PI: privilège immunitaire

PIC: complexe de pré-initiation

PRS: Score de Risque Polygénique

PSN: Polymorphisme d'un Seul Nucléotide

qPCR: quantitative Réaction de polymérisation en chaîne, en anglais (Polymerase Chain Reaction)

RISC: RNA-Induced Silencing complex

RNA-seq: séquençage d'ARN

SCZ: Schizophrénie

SI: Système Immunitaire

SNC: Système Nerveux Central

TB: Troubles Bipolaire

TLR: Récepteurs de type Toll, and anglais, Toll-like Receptor

TPS: Troubles Psychiatriques Sévères

TSCZA: Troubles Schizo-Affectifs

TSS: site d'initiation de la transcription

TWAS: Etude d'association à l'échelle du transcriptome, en anglais, Transcriptome-Wide Association Study

WMHSI: World Mental Health Survey Initiative

YMRS: échelle d'évaluation de la manie de Young ou en anglais; Young Mania Rating Scale

Liste des illustrations

Figure 1: Représentation des différents niveaux de compactage de l'ADN (Fyodorov et al., 2017 ⁹⁾).....	17
Figure 2: Initiation de la transcription dans les cellules eucaryotes	21
Figure 3: Schéma représentant de façon simplifié les cycles de l'humeur lors de troubles bipolaires	30
Figure 4: Anatomie du système nerveux central. Localisation du SNC (encéphale et moelle épinière) dans le corps humain (A), représentation graphique de l'encéphale (B), et représentation graphique de la barrière hémato-encéphalique (C).	38
Figure 5: Représentation graphique de l'organisation des méninges (Rua & McGavern, 2018 ⁹⁵⁾)	40
Figure 6: Représentation graphique simplifiée du diagnostic des PM étudiées lors de cette thèse.....	49
Figure 7: Distribution des scores de l'échelle Schizo-Bipolaire dans les différents groupes diagnostics (Keshavan et al. 2011) ²¹⁸	54

Préambule

La psychiatrie est actuellement la seule branche de la médecine moderne pour laquelle aucun marqueur biologique mesurable, ou biomarqueur, n'a été identifié et validé pour aider à réaliser le diagnostic. Cela est un problème car les troubles psychiatriques sont des maladies complexes avec des symptômes communs à plusieurs affections et ayant des origines tout aussi complexes, qui sont influencés par des facteurs de risques biologiques et externes. Cela les rend difficile à diagnostiquer correctement, et il reste aujourd'hui encore, un problème concernant des patients qui sont mal, voire pas du tout, diagnostiqués et ne reçoivent pas de traitement adéquat.

Pourtant, des mécanismes d'interaction entre le Système Nerveux Central (SNC) et le Système Immunitaire (SI) ont été identifiés il y a plusieurs années. Cela indique qu'il serait possible de mesurer la présence de symptômes psychiatriques dans le sang à l'aide de biomarqueurs. J'émetts l'hypothèse qu'il est possible d'identifier des biomarqueurs de la sévérité de ces troubles en étudiant les cellules immunitaires présentes dans le sang. Pour cela, j'ai étudié deux stratégies. La première consiste à regrouper plusieurs troubles psychiatriques similaires en termes de symptômes et de sévérités en groupes diagnostiques élargies pour réduire le chevauchement des symptômes. La seconde méthode que j'ai essayée consiste à utiliser des données longitudinales d'une cohorte pour réaliser une classification des patients selon la sévérité de leurs symptômes, indépendamment du diagnostic qu'ils ont reçu. J'ai ensuite comparé les données omiques de ces groupes à ma disposition pour identifier des biomarqueurs de la sévérité des troubles mentaux.

L'objectif de cette thèse étant d'identifier des biomarqueurs de ces troubles, il me semble nécessaire de commencer l'introduction par une description des mécanismes cellulaires permettant de réguler l'expression des gènes. Je continuerai par une description des troubles psychiatriques étudiés durant cette thèse, et l'importance d'identifier des biomarqueurs. Je me pencherai ensuite sur l'état actuel de la classification des troubles psychiatriques et je justifierai que le lien entre les SNC et SI devrait permettre l'identification de biomarqueurs de la sévérité des troubles mentaux qui impactent de manière significative et durable le fonctionnement quotidien d'un

individu. Parmi ces troubles, que je vais appeler les Troubles Psychiatriques Sévères (TPS) dans le reste de ce document, l'inclus la Schizophrénie (SCZ), les Troubles Bipolaire (TB), les Troubles Schizo-Affectifs (TSCZA), et la Dépression Majeure (DM). Enfin, je présenterai les résultats de mon étude sur les participants de la cohorte en psychiatrie PsyCourse au cours du projet MulioBio dans lequel s'inscrit cette thèse.

1. Introduction

1.1 Chapitre 1: Description des approches omiques

1.1.1 Les sciences omiques et leurs intérêts pour l'immunologie

Le terme “omique” est utilisé pour décrire les différents niveaux biologiques de la machinerie cellulaire, ainsi que les disciplines qui les étudient. Il regroupe plusieurs disciplines qui correspondent à l'étude d'un ensemble précis de molécules biologiques dans le sang ou les tissus d'un être vivant et qui participent à leurs structures et leurs fonctions, tel que l'Acide Désoxyribonucléique (ADN), l'Acide Ribonucléique (ARN), et les protéines. Les noms de ces disciplines finissent par un suffixe “-ome” et un préfixe qui est utilisé pour décrire le type de molécule étudié par la discipline. Ainsi, on parle de “génomome” pour l'étude de la séquence de l'ADN, de “transcriptome” pour l'étude des ARN, et de “protéome” pour l'étude des protéines. On parle aussi de “smallRNAome” lorsque l'on étudie les petits ARN non-codants (ARNnc) d'une taille inférieure à 30 nucléotides tels que les micro-ARN (miARN), les ARN de transfert (ARNt), ...

L'objectif des analyses omiques est de comprendre comment les molécules que le domaine étudié regroupe influencent un phénotype. Les résultats d'analyse de différents domaines omiques peuvent-être intégrés pour reconstituer l'état des cellules et tissus et ainsi d'identifier les mécanismes biologiques régissant leurs conditions biologiques. Cela rend possible l'identification des phénomènes biologiques impliqués dans la naissance et la régulation d'une pathologie en comparant des échantillons de donneurs sains et de patients. Par exemple, des miARN et des facteurs de l'inflammation tels que la protéine C réactive et l'IL-6, ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés dans le sang de patients atteints de SCZ, de TB, ou encore de DM par rapport à des échantillons d'individus sans TPS¹⁻⁴. Dans le reste de ce chapitre, je vais décrire ces différents niveaux biologiques que j'ai eu l'occasion d'analyser et les techniques que j'ai utilisées.

1.1.2 Historique des différents omiques

1.1.2.1 Modèle fondamental de la biologie moléculaire

En 1953, James D. Watson et Francis H. Crick ont publié un article révélant la structure en double hélice de l'ADN⁵. Quatre ans plus tard, en 1957, Francis H. Crick a présenté les bases du modèle fondamental de la biologie moléculaire. Son modèle permet de représenter le rôle biologique et les interactions entre l'ADN, l'ARN, et les protéines. Bien qu'il soit amélioré au fil du temps, il est encore très largement utilisé pour expliquer les bases de la biologie. Brièvement, l'ADN se reproduit fidèlement lors de sa "*réplication*", se transcrit en ARN durant sa "*transcription*", pouvant ou non être traduits en protéines via la "*traduction*". Ces protéines ont différentes actions biologiques (structure des cellules, communication intra- et extra-cellulaire, participation aux procédés biologiques tels que la transcription, ...). Au fil du temps, ce modèle a été enrichi par d'autres découvertes scientifiques importantes, notamment, la réplication semi-conservative de l'ARN en 1958, ou la rétrotranscription de l'ARN en ADN en 1970^{6,7}.

Aujourd'hui, ce modèle considère que l'ADN est une macromolécule localisée dans le noyau des cellules (eucaryotes) qui contient l'information génétique d'un organisme sous la forme de séquences nucléotidique. L'ADN est transcrit en ARN lors d'un processus nommé réplication ou il est copié à l'identique lors de la division cellulaire. Il existe différents types d'ARN. Les ARN messager (ARNm) sont traduits en protéines tandis que les autres types d'ARN, dits non codants, jouent des rôles de régulations tel que la dégradation d'autres ARN pour les miARN ou ils ont un rôle dans divers processus biologiques tel que la traduction pour les ARNt qui permettent la correspondance entre l'ARNm et les acides aminés qui composent les protéines. Les protéines sont des macromolécules biologiques qui ont diverses fonctions sur la structure, la mobilité et la communication cellulaires. Certaines protéines peuvent avoir un effet sur la régulation de l'expression des gènes. Par exemples, des protéines nommées Facteur de Transcription (FT) peuvent reconnaître une séquence spécifique de l'ADN et s'y lier pour initier la transcription d'un gène, d'autres protéines peuvent catalyser des modifications réversibles de l'ADN, sans modifier sa séquence. Ces modifications que l'on nomme les modifications épigénétiques peuvent avoir selon leurs type un effet inhibiteur

(méthylation des îlots CpG) ou activateur (acétylation de la lysine 27 de l’histone 3) sur la transcription des gènes.

1.1.2.2 Génome et génomique

Le génome humain correspond à l’ensemble de l’information génétique d’un individu codée dans son ADN. Cet ADN, correspond à environ 3 milliards de paires de bases nucléotidiques contenues dans 23 paires de chromosomes. Il est compacté dans le noyau des cellules en formant une structure nommée chromatine dont l’unité de base, le nucléosome, est composé d’un octamère de protéines, les histones, autour duquel environ 147 paires de bases d’ADN viennent s’enrouler ([Figure 1](#)). Les histones sont des protéines divisées en deux classes, les histones centrales, dites de cœur (H2A, H2B, H3, H4) qui forment un complexe protéique au centre du nucléosome, et les histones de liaison (H1) qui permettent de fixer l’ADN aux autres histones. Cette compaction de l’ADN permet d’éviter qu’il soit endommagé, ainsi que de réguler sa réplication et la transcription des gènes en ARN.

L’étude du génome est nommée “génomique”. Elle se divise en deux branches, la génomique structurelle qui consiste à décrire la structure et la séquence de l’ADN et la génomique fonctionnelle dont l’intérêt est de déterminer la fonction de la séquence d’ADN et l’expression des gènes en caractérisant les ARN et les protéines. La génomique est importante pour l’étude des TPS car les Etude d’association pangénomique, en anglais Genome-Wide Association Study (GWAS) ont mis en évidence un lien entre des mutations du génomes et certaines maladies psychiatriques tel que la SCZ ou encore les TB.

Cette étude du génome est possible grâce à l’automatisation de la méthode de séquençage Sanger développée en 1977 qui a permis le séquençage de plusieurs génomes dont celui de l’humain avec en 2003 l’achèvement du Projet Génome Humain (PGH). Ce succès a été possible grâce au développement à partir des années 2000 de nouvelles méthodes de séquençage automatisées, dites de “haut débit” ou Séquençage de Nouvelle Génération, en anglais, Next-Generation Sequencing (NGS) permettant de séquencer un nombre important échantillons à un faible coût. Le séquençage NGS a permis avec de séquencer de façon massive des individus et d’analyser leurs génomes et de réaliser de nouvelles analyses telles que les GWAS QUI ont ainsi permises

d'identifier des liens entre les variations de la séquence d'un gène et un phénotype. Ces méthodes ont également rendu possible d'autres projets tel que l'Encyclopédie des éléments de l'ADN (ENCODE) visant à identifier les éléments fonctionnels du génome humain. On compte également le projet Haplotype Map (HapMap) qui débute en 2002, dont l'objectif est d'identifier et de cartographier les variations génétiques tels que les Polymorphisme d'un Seul Nucléotide (PSN) ou les petites insertion ou délétion de séquence (indel) dans la séquence de référence du projet HGP. Le projet 1000 génomes initié en 2008, a permis d'identifier les variants les moins fréquents du génome humain. L'ensemble de ces projets a contribué à l'obtention d'une cartographie précise du génome humain. Ce qui permet d'observer que seulement 1 à 2% du génome code pour des protéines. Plusieurs découvertes tel que celle de l'opéron lactose en 1961 par Jacob et Monod⁸ ont montrées que certaines séquences contenues dans la partie non codante du génome, jouent un rôle de régulation de la transcription des gènes. D'autre mécanismes de régulations dépendent de l'épigénome.

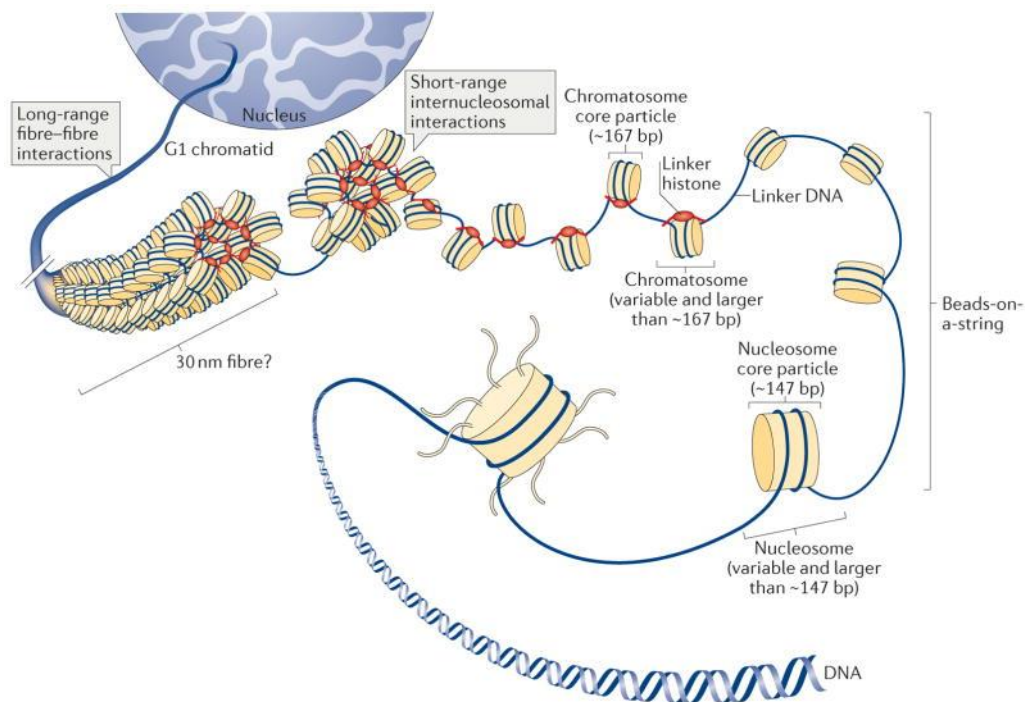


Figure 1: Représentation des différents niveaux de compactage de l'ADN (Fyodorov et al., 2017²)

1.1.2.3 Epigénome et épigénétique

1.1.2.3.1 Définition générales de l'épigénome et rôle

L'épigénome correspond à l'ensemble des modifications réversibles de l'ADN qui ne modifient pas sa séquence. Ces modifications jouent un rôle de régulation de la transcription des gènes. Elles peuvent prendre la forme de modifications post-traductionnelles des histones ou encore d'une méthylation des bases nucléotidiques qui composent la séquence de l'ADN. Dans ce deuxième cas, on parle également de méthylome. L'épigénétique est l'étude de l'ensemble de ces marques.

1.1.2.3.2 Méthylation des îlots CpG

Les îlots CpG sont des régions de l'ADN constituées des deux nucléotides *cytosine* et *guanine*. L'abréviation CpG signifie "5'-Cytosine-phosphate-Guanine-3'" et est utilisée pour indiquer que les deux bases sont sur le même brin d'ADN et se suivent. La méthylation de la cytosine en 5-Méthylcytosine est catalysée par des ADN-méthyltransférases et a pour rôle la répression de la transcription des gènes¹⁰.

La technique la plus souvent employée pour étudier la méthylation de l'ADN, consiste à utiliser des sondes à ADN. Brièvement, l'ADN à analyser est traité avec du Bisulfite. Ce produit convertit les bases *cytosines* (C) non méthylées en bases *uraciles* (U). L'ADN est

ensuite amplifié et fragmenter avant d'être hybridé aux sondes à ADN sur une plaque. Les sondes sont des fragments d'ADN synthétiques, créés de façon à pouvoir se lier de façon spécifique à une région du génome (codante ou non). De plus, certaines sondes ne peuvent se lier qu'à la version méthylées d'une région tandis qu'une autre sonde ne peut que se lier à la version non méthylées. Cela permet de quantifier la proportion de méthylation à un site donné.

Le rôle de la méthylation de l'ADN dans le développement des maladies psychiatrique est peu connu mais une étude a montré une forte altération du méthylome entre des patients atteint de schizophrénie et des individus contrôles¹¹

1.1.2.3.3 Acétylation des histones

Certaines modifications épigénétiques n'affectent pas les bases nucléotidiques qui composent l'ADN mais correspondent à des modifications post-traductionnelles des histones. Durant cette thèse, je me suis intéressé à la modification H3K27ac, l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 qui correspond à l'ajout d'un groupement "acétyle" sur la lysine 27 de l'histone H3. Cette modification a été décrite pour la première fois en 1964¹². Elle est catalysée par des histones acétyltransférases (HAT), qui ajoute un groupement acétyle aux histones, et des histones désacétylases (HDAC) qui éliminent ce groupement acétyle. Elle est localisée au niveau des "enhancers" (amplificateurs) actifs, des régions de l'ADN pouvant être reconnues et fixées par des protéines, les FT.

L'acétylation des histones permet un remodelage de la chromatine en réduisant la charge des histones, donc leur affinité avec l'ADN. La décondensation de la chromatine permet alors une fixation des FT, qui peuvent alors initier et stimuler la transcription des gènes. En aidant, par exemple, à la formation du complexe de l'ARN Polymérase II. Ainsi, contrairement à la méthylation des îlots CpG, cette modification épigénétique est associé à une activation de la transcription des gènes.

L'étude de l'acétylation des histones se fait après une technique de séquençage nommée immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) qui consiste à utiliser un anticorps ciblant la modification épigénétique ciblée pour faire précipiter des brins d'ADN préalablement fragmentés par sonication ou par digestion enzymatique. Cela

permet de les isoler et de les séquencer. Les séquences obtenues sont ensuite alignées au génome de référence de l'espèce étudiée et des méthodes statistiques permettent de comparer les échantillons immunoprécipités à un background sans précipitation ce qui permet d'identifier des pics enrichis, correspondant à des zones de fixation de l'anticorps et donc à la présence de la marque étudiée.

L'étude des marques épigénétique a montré que ce type de modification à un rôle dans de nombreuses maladies tels que des maladies inflammatoires, mais également les TPS^{13,14}. Par exemple le gène RELN qui module la plasticité synaptique est connu pour être moins exprimé chez les patients atteint de la SCZ et son promoteur est situé dans un îlots CpG. Des études ont montré une augmentation de la méthylation de l'ADN avec une diminution de l'acétylation des histones^{13,15,16} au niveau de son promoteur. Ces modifications épigénétiques indiquent une régulation de l'expression du gène RELN à un niveau pré-transcriptionnel en lien avec la présence de la SCZ. D'autre études ont identifié des liens entre des marques épigénétiques et d'autres TPS comme les DM et les TB^{17,18}. L'épigénome peut donc moduler l'expression des gènes et influencer le phénotype des TPS.

1.1.2.4 Transcriptome

Le transcriptome d'un organisme correspond donc à l'ensemble des molécules d'ARN produites à partir de son génome. Cela inclut plusieurs types d'ARN tel que les ARNm qui codent pour des protéines et les petits ARN (20 à 30 nucléotides) non codants (miARN, ARNt, ARN ribosomique (ARNr)). Ces petits ARN sont regroupés dans un sous-ensemble du transcriptome que l'on nomme smallRNAome.

La transcription des gènes en ARN à lieu dans les régions ouverte de la chromatine (euchromatine) via la liaison de l'enzyme TFIID qui reconnaît et se lie à la séquence de la TATA box au niveau du promoteur. Elle induit un changement de conformation de l'ADN permettant le recrutement des enzymes TFIIA et TFIIB qui stabilisent l'interaction entre le complexe et l'ADN. TFIIB recrute ensuite la sous-unité TFIIIF et l'ARN polymérase II (ARNPII) puis les sous-unités TFIIIE et TFIIH. Le complexe Mediator vient alors se mettre en contact avec l'ARNPII pour former un complexe de pré-initiation (PIC) qui commence à ouvrir les deux brins de l'ADN. C'est ce que l'on nomme l'initiation de la transcription. L'ARNPII se déplace ensuite sur le brin d'ADN auquel elle est liée dans le

sens 3'→5' et synthétise progressivement l'ARN complémentaire à cet ADN. Cette étape est l'élongation de la transcription. Certaines séquences de l'ADN, telles que le signal de polyadénylation (AAUAAA), permettent ensuite de mettre fin à la transcription (étape de terminaison). L'ARN subit alors des modifications post-transcriptionnelles, nommées "maturation". Pour les ARNm, cela inclut la polyadénylation de l'extrémité 3' et l'épissage des séquences ne codant pas pour des protéines (intron). Les précurseurs des miARN se recroisent sur eux-mêmes dans le noyau de la cellule pour former des pri-miARN, qui ont une structure tige-boucle qui est ensuite reconnue et clivée en un pré-miARN intermédiaire par un complexe formé des protéines *Drosha* et *Pasha*. Les pré-miARN sont ensuite exportés dans le cytosol des cellules où ils sont reconnus et clivés par la protéine *Dicer* qui libère un duplex de miARN mature. L'un des brins du duplex va alors interagir avec une protéine de la famille Argonaute pour former un "complexe de silençage" induit par l'ARN ou RNA-Induced Silencing complex (RISC) en anglais.

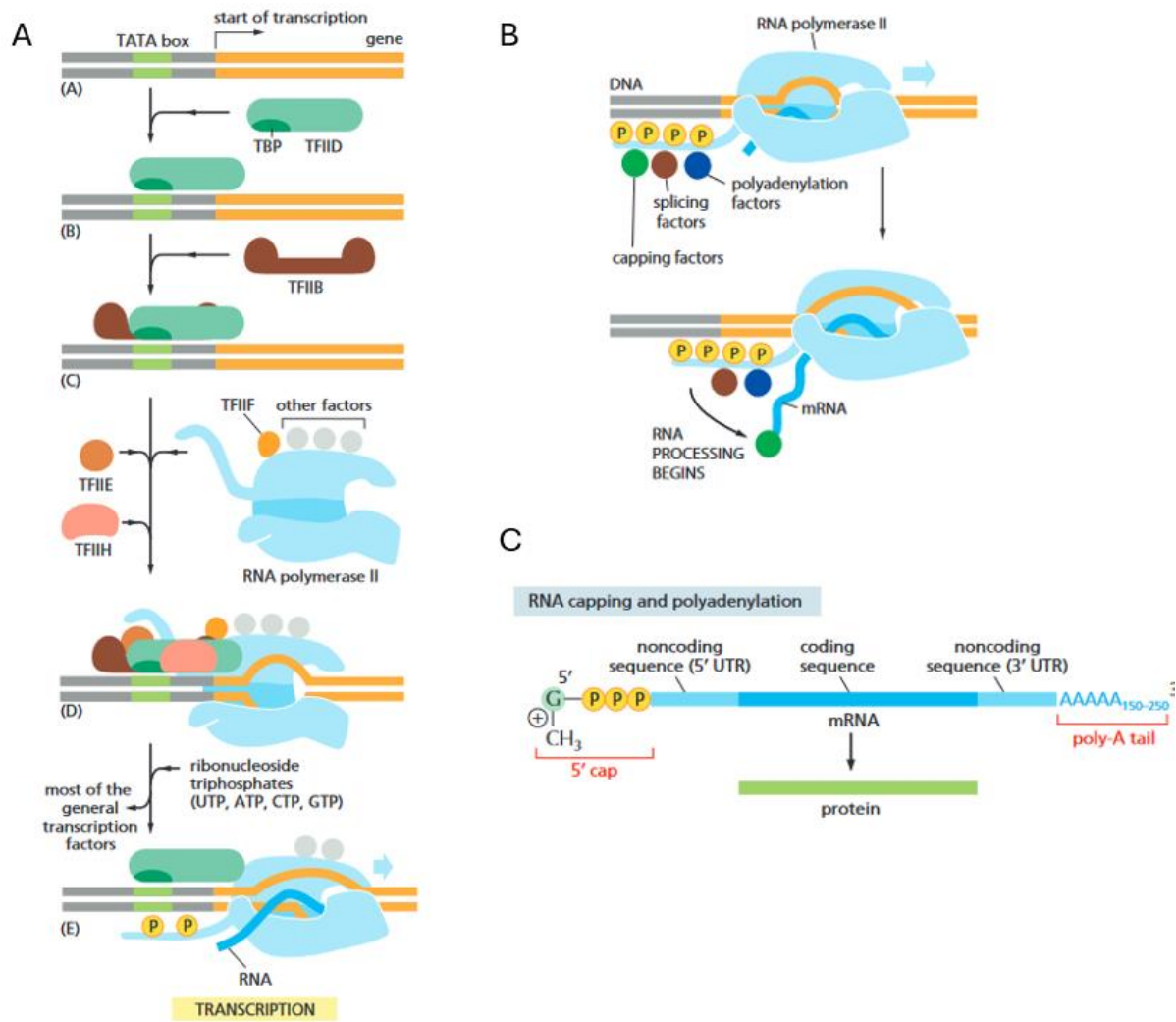


Figure 2: Initiation de la transcription dans les cellules eucaryotes

Les différents types d'ARN vont avoir différents rôles. Les ARNm servent d'intermédiaire pour la production de protéines. Les miARN ont un rôle de régulation. Leurs séquences permettent aux complexes RISC auxquels ils sont liés de reconnaître de façon spécifique des ARN et de les cliver. Les ARNt participent à la traduction des ARNm en transportant les acides aminés dont sont composées les protéines.

Plusieurs techniques permettent de quantifier et d'analyser le transcriptome. Les plus utilisées aujourd'hui sont les puces à ARN, la quantitative Réaction de polymérisation en chaîne, en anglais (Polymerase Chain Reaction) (qPCR), et le séquençage d'ARN (RNA-seq). Les puces à ARN utilisent des sondes fixées à une plaque et permettent d'étudier un ensemble connu d'ARN. La qPCR, amplifie de façon ciblée un ARN pour le quantifier. Le RNA-seq convertit les ARN en ADN complémentaire (ADNc) avec des séquences adaptatrices par leurs extrémités. Ces ADNc sont ensuite amplifiés par une

réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avant d'être séquencées. Le RNA-seq permet d'avoir une plus grande résolution que les deux autres techniques avec le séquençage de l'ensemble des ARN du tissu étudié mais l'analyse est plus complexe, son coût est plus élevé et un biais peut être introduit lors de la réaction d'amplification car certaines séquences d'ARN sont amplifiées de façon préférentielle. Le séquençage peut se faire sur des fragments longs pour étudier l'épissage alternatif des ARN ou sur des fragments courts (25 à 400 paires de bases) pour quantifier l'expression des gènes.

Durant cette thèse, j'ai opté pour la deuxième méthode. Plus exactement, j'ai séquençé à la fois des ARNm et des miARN et je les ai alignés sur le génome de référence de l'Homo Sapiens (hg38) pour compter les *séquences (reads) alignés* et créer une matrice d'expression. Une analyse en composantes principales (ACP) a permis de visualiser les profils d'expression des individus étudiés et si ces profils étaient corrélés avec certaines covariables tel que l'âge et le sexe des individus ou encore les lots de séquençage des échantillons. Le package DESeq2 (R) a ensuite été utilisé pour normaliser la matrice de comptes et créer un modèle prenant en compte les covariables qu'il était nécessaire d'ajuster. Ce modèle a ensuite été utilisé pour identifier des ARN différentiellement exprimés entre nos conditions d'intérêt. Dans le cas des miARN j'ai utilisé mirDIP, une base de données en ligne pour identifier les cibles des miARN de notre jeu de données¹⁹.

Pour donner un sens à ces listes d'ARNm différentiellement exprimés ou étant la cible de miARN différentiellement exprimés, j'ai réalisé des analyses d'ontologie des gènes (GO) et des analyses d'enrichissement d'un ensemble de gènes (GSEA). Ces analyses permettent d'identifier un enrichissement des gènes associés à une fonction ou d'une voie biologique parmi une liste de gènes. Elles diffèrent par le fait que les GO nécessitent que l'on indique un ensemble de gènes (différentiellement exprimés) et un background (arrière-plan) correspondant à l'ensemble des gènes exprimés par le tissu étudié. L'algorithme vérifie si les gènes d'une voie biologique est sur-représenté dans le set de gènes par rapport à l'ensemble des gènes exprimés. GSEA cherche à répondre à la même question mais au lieu de demander un ensemble précis de gènes, cette analyse utilise l'ensemble des gènes exprimés après les avoir classés selon si le gène est plus exprimé dans une condition que dans l'autre. L'algorithme de GSEA vérifie les

gènes un par un, en partant du mieux classé au moins bien classé et il vérifie si ces gènes font partie d'une voie ou d'une fonction biologique pour calculer un score d'enrichissement.

1.1.2.5 Protéome

L'ensemble des techniques de séquençage de l'ARN permettent d'obtenir une idée globale des gènes exprimés dans les cellules. Cependant, il ne faut pas oublier que si les ARNnc tel que les miARN ont des rôles biologiques directs, les ARNm sont des molécules intermédiaires pour la synthèse de macromolécules composées d'acide aminés, les protéines.

Ce procédé, nommé traduction, est réalisé via une correspondance entre des triplets de nucléotides (reconnue par des ARNt) qui compose l'ARN et les acides aminés qui composent les protéines. Il est réalisé grâce à un complexe ribonucléique (composé d'ARN et de protéines), appelé le ribosome.

Les protéines sont des acteurs clés de l'organisme. Elles sont impliquées dans la structure (par exemple, le cytosquelette, le collagène), la mobilité (actine, myosine), et la communication (ligand et récepteurs) cellulaire, ainsi que dans le transport (par exemple, des canaux transmembranaires tel que les canaux ioniques) intra- et extra-cellulaire des molécules biologiques. Certaines protéines jouent des rôles de chaperon (facilite la maturation des protéines).

La protéomique correspond à l'étude de l'expression des protéines, de leurs structures et de leurs fonctions. Il peut s'agir d'étudier la structure des protéines (séquence et modifications post-traductionnelles) et des complexes protéiques (composition). Ou également de quantifier la présence des protéines dans un tissu. Lors de cette thèse, je me suis contenté comme pour les ARN, de quantifier les protéines du sérum sanguin. Pour cela, j'ai utilisé la technologie Olink qui consiste à utiliser des anticorps spécifiques à certaines protéines couplées à des oligonucléotides²⁰. Ces anticorps et oligonucléotides fonctionnent par paires. Si les deux paires d'anticorps se fixent sur la même protéine, les séquences de leurs oligonucléotides peuvent s'hybrider et être séquencer. Cela diminue les risques d'immunité croisée. Une fois le séquençage réalisé, il devient possible de quantifier de façon précise la présence des protéines

d'intérêts dans différents échantillons de sérum et de réaliser des tests statistiques pour comparer ces niveaux d'expression et identifier des protéines liées à un phénotype.

1.1.3 Composition cellulaire

L'étude des proportions cellulaires d'un échantillon ne correspond pas à un domaine omique à proprement parlé mais elle n'en est pas moins importante. Chaque type de cellule possède un rôle précis dans l'organisme, ils ont des profils d'expression des gènes spécifiques, et leurs proportions varient selon l'état du SI. Par exemple, les Lymphocyte T (LT) CD8+ éliminent les cellules infectées par des virus et le SI active leur prolifération en cas d'infection virale. L'étude des proportions cellulaires est donc utile pour comprendre comment l'organisme réagit à une maladie.

La cytométrie en flux est une technique qui permet de détecter et de mesurer les caractéristiques des cellules. Brièvement, les cellules d'un échantillon sont marquées ou non par des anticorps couplés à des fluorochromes et spécifiques de protéines exprimées à la surface des populations cellulaires étudiées, les clusters de différenciations. Un système fluide amène les cellules une à une devant un laser qui stimule les fluorochromes couplés aux anticorps. Le spectre d'émission est ensuite mesuré et analysé pour identifier les clusters de différenciations exprimés par la cellule. Chaque type cellulaire possède un profil d'expression différent ce qui permet de quantifier les différents types cellulaires de l'échantillon analysé. Cette quantification est importante car différents types cellulaires n'ont pas le même rôle et ne vont pas avoir un profil d'expression génique identique. Dans le cas d'analyse en bulk ou les échantillons contiennent plusieurs types cellulaires, il est utile de connaître les proportions cellulaires et de les inclure dans les modèles comparant les échantillons pour compenser des biais de composition cellulaire et améliorer la sensibilité statistique.

1.1.4 Analyses multiomiques

Lors de cette thèse, j'ai utilisé une approche multiomique. J'ai étudié un ensemble de données biologique d'une même cohorte correspondant à de multiples "omes". Je ne compte pas m'étendre dans ce chapitre sur ces analyses. Il s'agira du sujet de la Section

Résultats ([Section 3](#)). J'ai cependant l'intention d'expliquer pourquoi j'ai choisi cette approche.

Les différents "omes" représentent chacun un niveau de régulation de l'expression des gènes. Par exemple, une mutation d'un gène codant pour une protéine peut empêcher l'expression de cette protéine en insérant un codon non-sens précoce dans sa séquence, terminant de façon précoce la traduction de l'ARNm. D'autres mutations géniques peuvent ne pas empêcher la production de la protéine mais peuvent la rendre non fonctionnelle. Le séquençage des ARN reste le moyen le plus simple pour quantifier l'ensemble des gènes transcrit dans un échantillon biologique et donc d'estimer la composition du protéome. Cependant, il est possible que les ARN produits par la transcription soient dégradés par des miARN avant d'être traduits. Il est donc intéressant de pouvoir quantifier directement les protéines.

En caractérisant simultanément les différents niveaux biologiques, je peux les étudier conjointement. Il devient possible par exemple de corrélérer le niveau d'expression des protéines fonctionnelles avec les ARN quantifiés. Les quantifications des miARN et des autres ARN peuvent également être corrélées pour étudier les mécanismes de dégradations des ARNm et ARNnc par les miARN. Le fait d'avoir à disposition les génotypes et transcriptomes des mêmes individus au sein d'un groupe d'individus permet de réaliser une Etude d'association à l'échelle du transcriptome, en anglais, Transcriptome-Wide Association Study (TWAS). Cette analyse, décrite en 2016 par Gusev et al., combine le génome et le transcriptome d'un groupe d'individu avec des fichiers résumant les résultats de GWAS pour identifier des gènes dont l'expression, médiée par des éléments cis-régulateurs (PSN), est associé avec un phénotype²¹.

Les études multiomiques permettent donc de mieux caractériser les mécanismes biologiques sous-jacent au phénotype étudié. Cela m'a été utile lors de cette thèse car les TPS étudiées sont des maladies complexes qui sont causés par de multiple facteurs de risques ayant individuellement un effet faible. Une caractérisation exhaustive augmente la probabilité d'identifier les différents mécanismes à l'origine de ces maladies.

1.2 Chapitre 2: Description des troubles psychiatriques sévères

1.2.1 Définition globale

Le terme de “psychose” est utilisé en psychiatrie pour désigner un trouble ou condition anormale de l’esprit d’un individu. Parmi ces troubles, il y a des troubles émotionnels avec une prédominance des symptômes affectifs (dépression majeure, bipolarité) dits troubles de l’humeur (également appelés les troubles thymiques ou troubles affectifs), et des troubles, dit psychotiques, avec une prévalence de signes psychotiques (idées délirantes, hallucination) qui ne sont pas nécessairement accompagnés de trouble de l’humeurs. On parle dans ce deuxième cas, de trouble du spectre de la SCZ. Certains troubles, et en particulier les TSCZA, ont un phénotype alternant entre symptômes thymiques et symptômes psychotiques isolés.

Aujourd’hui, la 5^{ème} édition du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, et des troubles psychiatriques (DSM), le manuel le plus utilisé pour diagnostiquer les troubles mentaux, dénombre près de 300 maladies différentes réparties en multiples catégories. Lors de cette thèse, je me suis focalisé sur les TPS qui correspondent aux troubles mentaux les plus fréquents et sévères tel que les TB, la DM, la SCZ, ou encore les TSCZA. La Charge Globale de Morbidité (CGM) ou Global Burden of Disease en anglais, établie en 2019 indique que les troubles mentaux restent parmi les 10 causes principales de morbidité et que leurs prévalences augmentent dramatiquement depuis 1990 malgré l’augmentation du nombre de traitements et de leurs efficacités²²⁻²⁴.

Cette situation est préoccupante, et peut être en partie expliquée par le fait que certains patients reçoivent un diagnostic erroné et n’obtiennent pas de traitement adapté. En effet, le diagnostic d’une maladie psychiatrique chez un individu est actuellement entièrement basé sur la présence des symptômes psychiatriques du patient et de leurs intensités. Cela fait de la psychiatrie, la seule branche de la médecine moderne à ne pas utiliser de biomarqueurs, des caractéristiques biologiques pouvant-être détectées et quantifiées, pour réaliser un diagnostic. Cette situation est problématique car les maladies psychiatriques sont complexes tant pour leurs symptômes que pour leurs origines. Ainsi, des troubles différents peuvent avoir un ou plusieurs symptômes en communs. Un exemple de cela, est le fait que même si les TB et la SCZ ont été classées

dans des catégories différentes par Emil Kraepelin, il avait noté le fait que ces deux troubles pouvaient partager des symptômes tels que des hallucinations, des délusions, ou encore des modifications de l'humeur²⁵. Le diagnostic dépend donc entièrement de l'évaluation du patient par son clinicien à la suite d'un entretien. Cela rend le diagnostic difficile, d'autant que certains patients hésitent à parler de leurs symptômes pour diverses raisons tels que la peur des préjugés, le fait qu'ils considèrent leur maladie comme une faiblesse, des pressions sociétales, ou encore parce qu'ils ne reconnaissent pas eux-mêmes leurs symptômes. De plus, certains symptômes plus évidents peuvent n'apparaître que plus tard dans l'évolution de ces troubles. Par exemple, les individus schizophrènes peuvent être atteints en premier de symptômes négatifs tels qu'un émoussement émotionnel avant l'apparition d'éléments délirants ou hallucinatoires²⁶. Cela augmente le risque d'un diagnostic erroné, voir, d'une absence de diagnostic.

Ce manque de biomarqueur a longtemps été justifié par le fait que le cerveau est l'organe le plus complexe et le plus difficile d'accès du corps humain, le fait que les troubles mentaux sont causés par des interactions complexes entre des facteurs génétiques et biologiques et l'expérience personnelle (traumatisme de l'enfance, stress, infections prénatale, ...), ou encore le fait que système diagnostic actuel n'est pas adapté à la recherche scientifique.

1.2.2 Les troubles de l'humeur

Les troubles de l'humeur ou les troubles thymiques correspondent à un ensemble de TPS dont les symptômes consistent principalement à une dérégulation significative de l'humeur au cours de phase dépressives ou maniaques. Ces phases peuvent être accompagnées ou non de symptômes psychotiques tels que des hallucinations. Dans cette thèse, je me suis concentré sur les TPS que sont les TB de type I et II, ainsi que la DM.

1.2.2.1 La dépression majeure

Selon la cinquième édition du DSM²⁷, la DM peuvent être diagnostiquée si un individu présente au moins cinq symptômes parmi les suivants :

- Humeur dépressive durant une majeure partie de la journée (sensation de tristesse, de vide, perte d'espoir)
- Anhédonie (perte de la capacité de ressentir des émotions positives)
- Perte ou gain significatif de poids alors que l'individu ne suis pas un régime, et n'a pas de modification de son appétit
- Perte ou gain d'appétit presque chaque jour
- Sentiments de culpabilité ou d'inutilité
- Absence et perte d'énergie
- Changements d'appétit
- Manque de concentration
- Troubles psychomoteurs (retard ou agitation) observables par d'autres personnes que le patient
- Troubles du sommeil
- Pensées suicidaires

Cette maladie est caractérisée par des épisodes d'au moins deux semaines au cours desquels, les symptômes décrits précédemment sont exprimés presque tous les jours. Il est également possible que le patient puisse subir des symptômes psychotiques (idées délirantes ou hallucinations) pendant les épisodes dépressifs. Sa prévalence au cours de la vie varie de façon importante selon les pays mais elle est comprise entre 15-18%²⁸. En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé la DM comme étant la troisième cause de morbidité dans le monde. Les DM peuvent être diagnostiquées à n'importe quel âge mais il y a une augmentation du risque lors de l'adolescence²⁹.

Les médications des DM incluent des entretiens avec des psychothérapeutes (psychothérapie), la pharmacologie avec la prescription d'antidépresseurs, et la neurostimulation, l'électroconvulsivothérapie peut être utilisée pour les formes les plus graves de DM. Cette thérapie se pratique sous anesthésie générale, et consiste à appliquer un faible courant électrique sur le cuir chevelu ou les tempes du patient pour

induire une crise convulsive contrôlée. Le mécanisme d'action de l'électroconvulsivothérapie reste flou mais des études récentes indiquent qu'elle permettrait une réduction des connexions cérébrales étant elles-mêmes associée à une réduction significative des symptômes dépressifs^{30,31}. Pour les formes modérées et sévères, le traitement pharmacologique est recommandé. Il peut être combiné avec la psychothérapie pour augmenter l'efficacité du traitement³².

1.2.2.2 Les troubles bipolaires

D'après la cinquième édition du DSM²⁹, les TB sont des troubles de l'humeur caractérisés par des cycles de manie ou d'hypomanie alternant avec des épisodes dépressifs. Les épisodes de manie ont une durée d'au moins une semaine durant laquelle, l'humeur des individus est anormalement élevée, ce que peut se traduire par une augmentation du niveau d'activité de l'individu et de son irritabilité, des sensations d'euphorie, une diminution du besoin de dormir ou du besoin de se nourrir. Les épisodes d'hypomanie partagent les symptômes des épisodes maniaques mais de façon moins sévère et qui ont une durée plus courte (4 jours au minimum). Si les épisodes maniaques peuvent-être accompagnés de symptômes psychotiques, tels que des idées délirantes ou des hallucinations, ce n'est pas le cas des épisodes hypomaniaques. Les symptômes ne doivent pas être attribuable à une substance.

Les TB peuvent être classés en plusieurs catégories. Les TB de type I sont caractérisés par au moins un épisode maniaque qui a été précédé ou suivi par un épisode hypomaniaque ou un épisode de dépression majeure. Ces troubles apparaissent vers l'âge de 18 ans en moyenne. Les TB de type II sont caractérisés par au moins un épisode hypomaniaque avec un épisode de dépression majeure, et une absence d'épisode maniaque ([Figure 3](#)). Ce second type de TB commence en moyenne vers l'âge de 20 ans.

Comme pour les patients atteints de DM, les individus bipolaires peuvent avoir des symptômes psychotiques pendant les épisodes maniaques et les épisodes dépressifs. Les symptômes psychotiques les plus courants dans des idées délirantes congruentes à l'humeur (idées de grandeur en phase maniaque ou idées de ruine voire négation du corps en phase dépressive) mais d'autres symptômes psychotiques tels que des hallucinations peuvent également être présents.

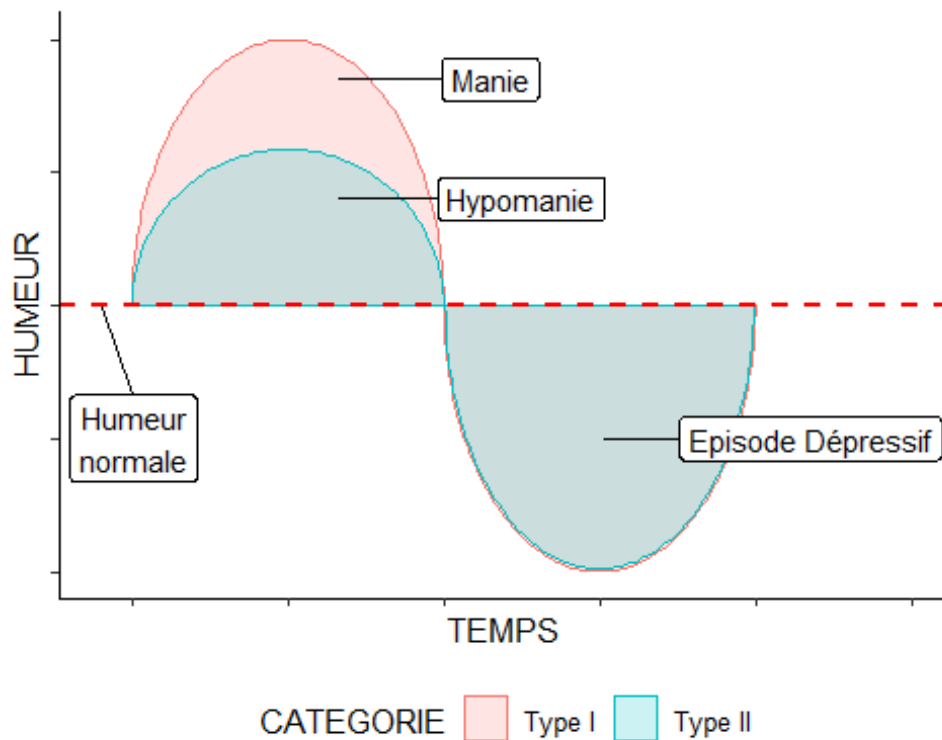


Figure 3: Schéma représentant de façon simplifié les cycles de l'humeur lors de troubles bipolaires

D'après l'enquête mondiale sur la santé mentale (World Mental Health Survey) de l'OMS³³, la prévalence globale au cours de la vie des TB est de 0.6% pour le type I, 0.4% pour le type II et 2.4% pour le type III (cyclothymie et induction des symptômes par des substances tels que les antidépresseurs). Les TB sont responsables de la perte de plus d'Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité (EVCI) que toutes les formes de cancer ou que d'autres pathologies mentales telles que l'épilepsie ou la maladie d'Alzheimer. Cela est causé par une forte association au risque de suicide et à des comorbidités addictives très fréquentes³⁴.

La façon dont les TB sont traités dépend du type de trouble. Les épisodes maniaques sont considérés comme des urgences médicales nécessitant une hospitalisation. En revanche, les épisodes hypomaniaques sont moins sévères et ne nécessitent pas forcément d'hospitalisation. Les traitements ont pour objectifs de stabiliser l'humeur des patients. Comme pour la DM, les traitements consistent en de la psychothérapie couplée à une médication basée sur des stabilisateurs de l'humeur (aussi connus sous les noms de thymorégulateur ou de psychorégulateurs) tel que le lithium ou le Valproate.

1.2.3 Les troubles psychotiques

Les troubles psychotiques sont des maladies mentales dont les symptômes regroupent principalement des troubles psychotiques, c'est à dire, des symptômes qui correspondent à des hallucinations ou des idées délirantes, souvent accompagné d'anomalies cognitives, émotionnelles et comportementales qui ont pour conséquence de complexifier la différenciation de ce qui est réel ou non par le patient. Dans cette thèse, je me suis concentré sur deux TPS parmi ces troubles, la SCZ, et les TSCZA.

1.2.3.1 La schizophrénie

La SCZ, est selon la 5^{ème} édition du DSM, diagnostiquée si un individu présente une phase active de symptômes d'une période d'un mois ou moins durant laquelle le patient exprime au moins deux symptômes parmi des idées délirantes, des hallucinations, une désorganisation de la pensée ou du comportement, des symptômes négatifs tels qu'une diminution de l'expression des émotions. L'un de ces symptômes doit correspondre à des idées délirantes, des hallucinations ou la désorganisation de la pensée³⁵. Pour que le diagnostic de la SCZ soit établi, il est également nécessaire que le patient présente une diminution du fonctionnement émotionnel, cognitif, et/ou comportemental. Il ne doit pas y avoir d'épisode dépressif durant cette phase active. S'il y a des symptômes de manie durant, ils doivent être présent seulement pendant une petite fraction de la durée totale de la phase active. Les symptômes ne doivent pas être attribuables à une substance (médicale, ...) ou à une autre condition médicale et des signes continus de ces symptômes doivent persister pendant au moins 6 mois.

De façon générale, les symptômes de la SCZ peuvent être classés dans trois catégories :

- Les symptômes positifs correspondant à un excès ou une distorsion des fonctions normales tels que les idées délirantes, les hallucinations, ...
- Les symptômes négatifs correspondant à une diminution ou une perte de fonctions tel qu'un manque de spontanéité, ou un retrait affectif ou social, ...
- Syndrome de désorganisation incluant l'anxiété, le manque d'attention ou de jugement, les sentiments de culpabilité, ...

Le diagnostic de ces symptômes est réalisé à l'aide de l'échelle des symptômes positif et négatifs ou en anglais: Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS).

Il est arrivé que des patients soient diagnostiqués comme schizophrène alors qu'ils étaient atteints de DM ou de TB car ces troubles peuvent également être accompagnés d'idées délirantes ou d'hallucination durant les épisodes dépressifs, maniaques, ou hypomaniaques³⁶. Cela a d'ailleurs conduit à la création d'une nouvelle catégorie de diagnostics, les TSCZA en 1933³⁷. Selon le DSM, le diagnostic dépend alors de la temporalité entre les symptômes psychotiques et les symptômes thymiques. Si les symptômes psychotiques ne sont présents que lors des phases de manie ou de dépression, alors le diagnostic correspond à un TB ou de la DM avec des caractéristiques psychotiques. Dans le cas contraire, si les symptômes thymiques sont présents pendant la majorité de la durée totale des phases actives alors le patient reçoit un diagnostic de TSCZA. Si les symptômes affectifs ne sont présents que pendant une durée mineure de la phase active, alors la SCZ est diagnostiquée.

La prévalence de la SCZ varie selon les pays et les populations entre 0.3% à 0.7% selon les pays. Certaines études l'évaluent entre 1 à 2% de la population mondiale. La SCZ émerge en général entre la fin de l'adolescence et le milieu de la trentaine.

Les traitements des patients schizophrènes consistent en un mélange de médication basé sur des neuroleptiques (antipsychotiques) qui diminuent la fréquence et l'intensité des symptômes positifs et de psychothérapie pour traiter les symptômes négatifs et généraux. Malgré l'existence de médicaments, entre 20 à 50% des individus schizophrènes continue à présenter des symptômes même après avoir consommé des neuroleptiques³⁸. L'électroconvulsivothérapie peut être utilisée en derniers recours si les patients présentent une résistance aux neuroleptiques.

Il convient d'indiquer que contrairement à une idée reçue, les agressions volontaires commises par des individus atteints de la SCZ sont rares, au contraire, ces personnes sont plus souvent victimes de violences en comparaison avec la population générale³⁹. Ce stigmatisme est un problème car il "encourage" les individus schizophrènes à se replier sur eux-mêmes, voir à arrêter de prendre leurs médicaments par crainte de l'opinion d'autrui concernant leurs conditions^{40,41}.

1.2.3.2 Les troubles Schizo-affectifs

Selon la 5^{ème} édition du DSM, les TSCZA sont diagnostiqués lorsqu'un individu présente pendant une période non-interrompue à la fois une phase active de la schizophrénie en même temps qu'un épisode thymique (dépression ou manie)³⁵. Le patient doit également présenter des symptômes d'hallucination ou des idées délirantes pendant au moins deux semaines pendant l'absence d'épisode dépressif ou maniaque pour s'assurer que le patient n'est pas atteint de DM ou TB avec des caractéristiques psychotiques. De plus, pour faire une distinction entre les TSCZA et la SCZ, des symptômes répondant aux critères d'un épisode thymique doivent avoir lieu pendant la majeure partie de la durée totale des phases actives et résiduelle des TSCZA.

La prévalence des TSCZA est estimée à 0.3% de la population mondiale avec une incidence plus élevée chez les femmes. Ces troubles apparaissent en général vers l'âge de 20 ans.

De façon similaire aux autres TPS, les TSCZA sont traités avec de la psychothérapie couplée à une médication dépendant des symptômes exprimés. Des neuroleptiques sont utilisés pour diminuer les symptômes positifs, des antidépresseurs sont prescrits si les patients présentent un épisode dépressif, tandis que des thymorégulateurs ou des antipsychotiques sont utilisés si les patients ont un épisode maniaque. De façon similaire à la SCZ, l'électroconvulsivothérapie peut être utilisée en derniers recours si les patients présentent une résistance aux autres traitements.

1.2.4 Etiologie des troubles psychiatriques sévères

1.2.4.1 Les causes génétiques

Les origines des troubles mentaux ont été liées à plusieurs causes biologiques. Des études de jumeaux, des études familiales et des GWAS ont permis de montrer une forte héritabilité génétique de ces troubles, et d'identifier de nombreux PSN associés à divers troubles^{42,43}. Cela a conduit à utiliser les résultats des GWAS pour calculer des Score de Risque Polygénique (PRS) dans l'objectif d'évaluer le risque génétique d'un individu d'être atteint d'une TPS. Actuellement, les PRS sont utilisés dans le cadre de la recherche scientifique. Leur utilisation dans le cadre de diagnostics cliniques doit encore être évaluée par des études cliniques⁴⁴. Cependant, il est probable que

l'utilisation des PRS sur le diagnostic des TPS soit peu utile. Certains troubles tels que la SCZ et les TB partagent de nombreux facteurs de risques génétiques au point qu'ils ne montrent pas de différences significatives que ce soit pour les PRS de la SCZ ou ceux des TB⁴⁵. En effet, les études familiales montrent qu'il y a une augmentation de la prévalence de la SCZ et des TB chez les parents au premier degré des patients atteints de l'un ou l'autre de ces troubles, indiquant des facteurs de risques génétiques communs aux deux TPS⁴⁶. La comparaison des GWAS confirme l'existence de ces facteurs de risques génétiques communs et spécifiques à l'origine des TPS, ce qui suppose des mécanismes communs à l'origine des TPS notamment la SCZ et les TB⁴⁶⁻⁴⁹.

1.2.4.2 Les causes non-génétiques

De nombreuses études ont montrées un lien de cause à effet de facteurs environnementaux vis-à-vis des TPS. Ces facteurs peuvent correspondre à des évènements prénataux (complications obstétriques, infection virales, stress maternel et malnutrition), l'environnement de l'individu pendant son enfance (traumatisme crânien, abus, ...) ou lors du reste de sa vie (consommation de drogue, urbanité, instabilité familiale, stress due à un emploi, ...)⁵⁰⁻⁵².

Par exemples, un lien a été identifié entre les TPS et des évènements de stress pour les patients. Ces évènements peuvent être liés à des symptômes négatifs (e.g. symptômes de la dépression) ou positifs (e.g. symptômes de manie ou d'hypomanie)⁵³⁻⁵⁷. Il est cependant difficile d'identifier la nature exacte de cette relation car ces évènements peuvent-être à la fois les causes, des facteurs aggravants, ou encore des résultats des TPS. Il est donc nécessaire de prendre en compte la temporalité de ces évènements par rapport à l'apparition des symptômes⁵⁸.

L'exposition à des substances toxiques comme l'alcool ou des drogues récréatives (cannabis, nicotine, ...) a également été associé aux TPS. Le Cannabis est l'une des drogues récréatives les plus étudiés et une positive association avec le risque de TPS a été documenté⁵⁹. Une étude a estimé que la consommation de Cannabis double le risque de développer une TPS⁶⁰. Un lien a également été identifié entre l'exposition à la nicotine et la SCZ. Les études sur le sujet montrent que de nombreux gènes associés à la SCZ sont impliqués dans l'addiction à la nicotine. De plus, une consommation importante de tabac est associée à une augmentation du risque de TPS et les individus

qui ont commencés à fumer avant l'âge de 13 ans ont davantage de risque de développer une TPS^{61,62}. Pendant plusieurs décennies, il y a eu une hypothèse décrivant le tabagisme non pas comme une cause mais comme une conséquence des TPS, due à une automédication basée sur les effets de la nicotine sur le cerveau. Cependant, plusieurs études ont montré que cette hypothèse d'automédication ne permet pas suffisante pour expliquer cette association⁶¹.

Un lien avec le SI a également été démontré. Par exemple, des études familiales montrent qu'il y a une augmentation du risque des TPS et en particulier la SCZ à la suite d'infection virale pendant la grossesse et/ou la naissance. Certaines études ont étudié une dérégulation du SI chez les patients atteints de TPS avec une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (dont l'IL-2, l'IL-6, le TNF α) dans le sang d'environ 40% des patients atteints de SCZ ou TB⁶³⁻⁶⁶. De plus, 20 à 50% des patients recevant des traitements chroniques d'interféron- α dans le cadre du traitement d'un cancer ou d'une maladie chronique développent des symptômes dépressifs⁶⁷. Des épisodes maniaques peuvent également être causés par l'administration de corticostéroïdes⁶⁸.

1.2.5 Une étiologie commune des troubles psychiatriques sévères

Dans l'ensemble, les facteurs associés au développement des TPS sont nombreux et ont un faible effet individuel. Ils ne sont pas liés à un trouble spécifique et leurs effets individuels sur le risque de développer une TPS est faible. Cela rend difficile d'expliquer leurs liens avec les TPS. Certains facteurs peuvent être à la fois des facteurs de risques, tout comme ils peuvent être des conséquences des TPS ou de facteurs génétiques communs (e.g. l'addiction à la nicotine). De plus, ces facteurs de risques ne sont pas spécifiques à un trouble psychiatrique précis. Il est donc difficile d'identifier le lien de cause à effet exact. Cela a sans nul doute contribué à l'absence de biomarqueurs des TPS. Un modèle crédible a été énoncé par *Murray et al.* dans leur article paru en 2004 où ils avancent que certains gènes prédisposent les individus aux troubles mentaux en général et que certains gènes tels que ceux impliqués dans le développement nerveux, ainsi que des facteurs non-biologiques, tels qu'une influence du SI, peuvent ensuite avoir un effet, prédisposant l'individu vers un phénotype thymique (TB, DM) ou vers un phénotype psychotique (SCZ, et TSCZA)⁶⁹. Ce modèle propose donc une origine commune aux différentes TPS et donne une explication à l'orientation des phénotypes

de sévérités. Ce modèle semble confirmé par des études telles que celle de Cardno et Owen en 2014 qui comparent des GWAS pour identifier un chevauchement des facteurs de risques génétiques entre les TB, la SCZ, et les TSCZA⁴⁷.

1.3 Chapitre 3: Les interactions neuro-immunes

1.3.1 Anatomie du système nerveux

1.3.1.1 Système nerveux central (SNC)

Comme je viens de l'indiquer dans le chapitre précédent ([Section 1.2](#)), les TPS correspondent à des ensembles de symptômes relatifs à des troubles de la pensée. Ces troubles sont donc liés au SNC qui régule les fonctions cognitives. Ce lien entre le SNC et les TPS a notamment été démontré par des associations entre la présence de troubles similaires aux TPS et des lésions ou des tumeurs cérébrales^{70,71}.

Le SNC est composé de l'encéphale, et de la moelle épinière, aussi connue sous le nom de moelle spinale. L'encéphale est lui-même composé de quatre structures qui correspondent au télencéphale, au diencephale, au tronc cérébral, et au cervelet. La moelle épinière correspond à la partie du SNC qui prolonge la moelle allongée (Medulla Oblongata) du tronc cérébral dans le canal rachidien formé le long de la colonne vertébrale. Elle est composée des nerfs spinaux, aussi appelés les nerfs rachidiens ([Figure 4 A](#)). Le télencéphale correspond aux hémisphères cérébraux. Le diencephale est composé du thalamus, de l'hypothalamus, et de l'épithalamus. Il est situé entre le télencéphale et le mésencéphale, une partie du tronc cérébral. Le cervelet, correspond à une structure repliée sur elle-même à l'arrière du tronc cérébral. Le terme de cerveau peut dans son sens le plus large s'appliquer à l'ensemble de l'encéphale, au prosencéphale (également appelé, le cerveau antérieur) une structure formée par le télencéphale et le diencephale, ou au télencéphale seul ([Figure 4 B](#))^{72,73}. L'encéphale est vascularisé par l'artère vertébrale et l'artère carotide interne. Cela permet un apport en glucose et en oxygène nécessaire pour le fonctionnement du SNC⁷⁴.

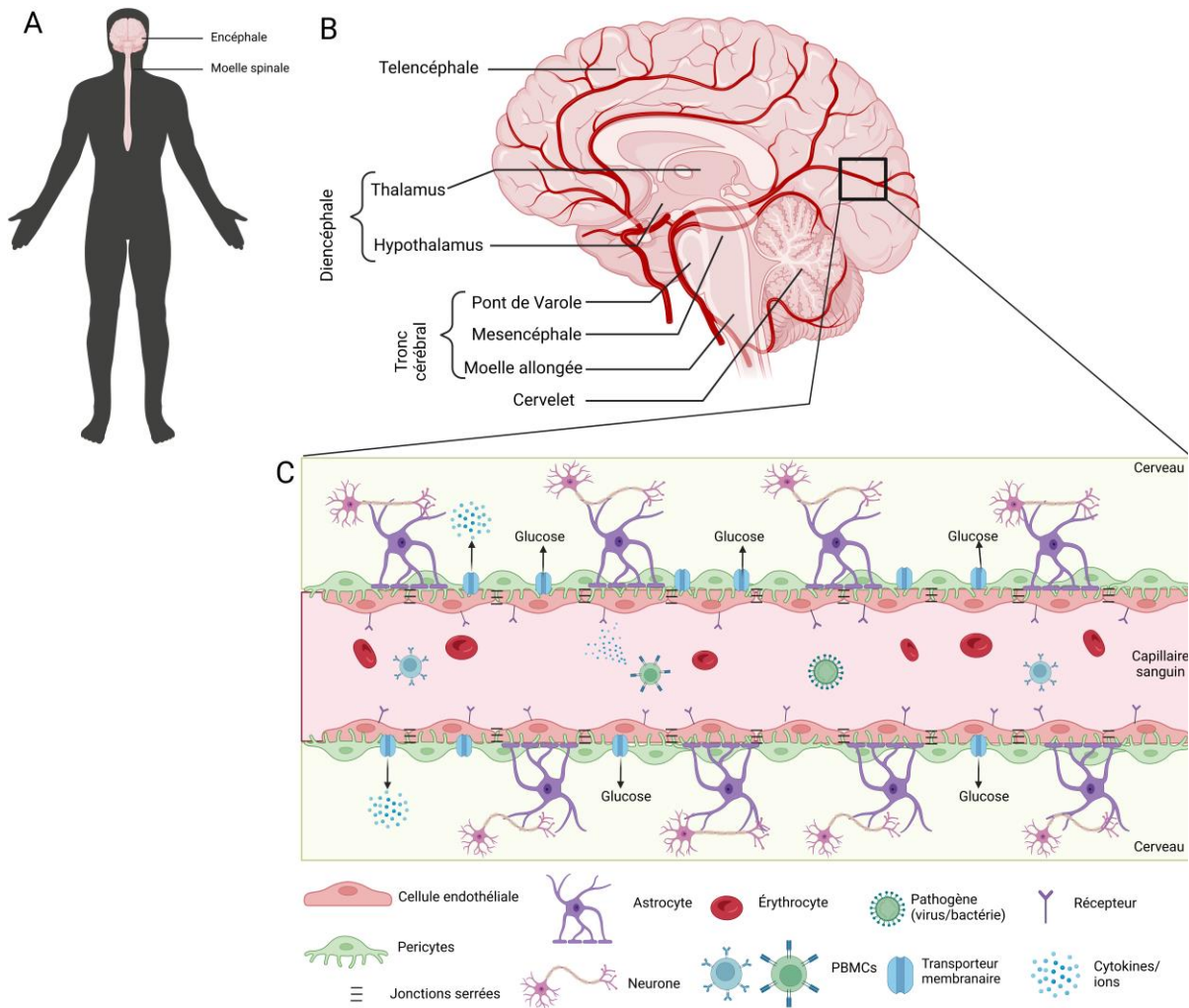


Figure 4: Anatomie du système nerveux central. Localisation du SNC (encéphale et moelle épinière) dans le corps humain (A), représentation graphique de l'encéphale (B), et représentation graphique de la barrière hémato-encéphalique (C).

Les différents composants de l'encéphale ont des rôles spécifiques. Le tronc cérébral en tant que prolongation de la moelle épinière dans l'encéphale, permet de transférer des informations entre l'encéphale et le reste du corps, tandis que le cervelet est associé au contrôle des activités motrices et cognitive^{75,76}. Des dysfonctionnements du cervelet ont été associés à des problèmes cognitifs chez des patients atteints de SCZ tandis que des lésions du tronc cérébral ont été liées à des symptômes dépressif et des hallucinations⁷⁷⁻⁷⁹. Le diencephale relaie des informations entre le tronc cérébral et le télencéphale, il régule également les activités du système hormonal et du système nerveux autonome, ainsi que le rythme circadien^{80,81}. Le télencéphale permet le traitement des informations sensorielles telles que la vision, l'audition, le touché, le goût, et l'olfaction. Il contrôle également les capacités d'un individu à apprendre, mémoriser, et communiquer, des capacités qui sont altérées par les TPS⁸²⁻⁸⁵.

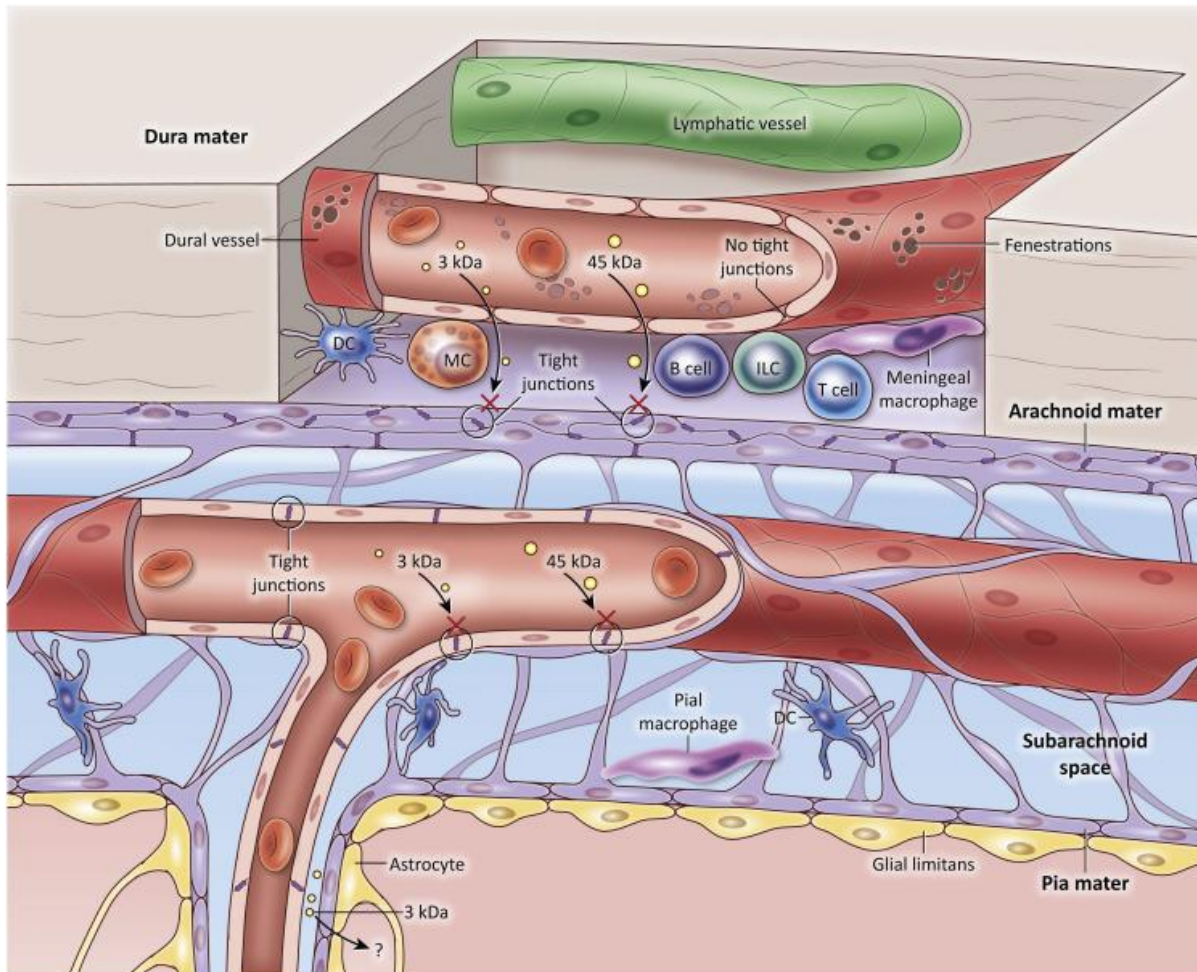
L'encéphale possède un système ventriculaire correspondant à quatre cavités interconnectées entre elles. Ce système inclus deux ventricules latéraux situés dans les hémisphères cérébraux du télencéphale, un troisième ventricule dans le diencephale, et un quatrième ventricule dans le rhombencéphale (également appelé le cerveau postérieur, il est composé du cervelet, du point de Varole, et de la moelle allongée)⁸⁶. Dans chaque ventricule, un ensemble de capillaires sanguins et d'épendymocytes (des cellules gliales présentes dans le cerveau) forment des plexus que l'on nomme choroïdes. Les épendymocytes des plexus choroïdes sécrètent un liquide biologique, le liquide céphalo rachidien (LCR), également connu sous le nom de liquide cérébro-spinal⁸⁷. Anatomiquement, le SNC est protégé par les méninges, le LCR et la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).

1.3.1.2 Protection du SNC par les méninges

L'ensemble du SNC est enveloppé par les méninges, un ensemble de membranes de tissus conjonctif qui recouvrent l'encéphale et la moelle spinale. Jusqu'en 2023, l'existence de trois membranes était connue. On les nomme de la plus externe à la plus interne, la *Dure-mère*, l'*Arachnoïde*, et la *Pie-mère*. Ces membranes constituent la barrière protectrice la plus externe de l'encéphale. La dure-mère est la couche la plus épaisse. Elle est innervée par les artères méningées permettant un apport sanguin essentiel pour maintenir les fonctions des méninges. L'arachnoïde n'est pas vascularisée. Un article publié en 2023, révèle l'existence d'une quatrième membrane entre l'arachnoïde et la pie-mère. Cette quatrième membrane a été baptisée Subarachnoid Lymphatic-like Membrane (SLYM)⁸⁸. Le LCR, est stocké au niveau du système ventriculaire et de l'espace sous-arachnoïdien entre l'arachnoïde et la pie-mère⁸⁷. Il est séparé du système circulatoire par les plexus choroïdes et l'arachnoïde^{89,90}.

La Dure-mère est la membrane la plus résistante des méninges. Couplé au LCR, cela permet aux méninges d'offrir une protection physique au SNC en l'ancrant aux os l'entourant, en le stabilisant et en amortissant les chocs qu'il subit. Le LCR permet également le transport d'hormone⁹¹, de nutriments⁹², de neurotransmetteurs⁹³, d'anticorps et de cellules immunitaires telles que des lymphocytes⁹⁴. Il permet également l'élimination des déchets biologiques qui s'accumulent dans le SNC. Les cellules composant l'arachnoïde ont des jonctions serrées qui filtrent le transport des

molécules comme la BHE⁹⁵. En revanche, bien que non vascularisé, l'arachnoïde permet le passage de cellules immunitaires des capillaires de la dure-mère à l'espace subarachnoïdien contribuant à une réponse immunitaire en cas d'infection ou de neuro-inflammation (Figure 5)^{96,97}.



Trends in Molecular Medicin

Figure 5: Représentation graphique de l'organisation des méninges (Rua & McGavern, 2018⁹⁵)

1.3.1.3 Régulation des échanges entre le SNC et le système circulatoire par la Barrière Hémato-Encéphalique

La BHE est une membrane semi-perméable qui entoure les vaisseaux sanguins de l'encéphale, les séparant ainsi des neurones. De la phase luminale dirigée vers les capillaires à la phase abluminale dirigée vers les neurones, la BHE est composée de cellules endothéliales (CE) formant un endothélium qui tapissent les capillaires, d'une lame basale, les péricytes, et enfin, les astrocytes (Figure 4 C)⁹⁸.

Les CE de la BHE sont différentes des CE périphériques dans leur morphologie et leur fonction. Elles ne sont pas fenestrées et sont reliées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes limitant un transfert passif et rapide entre le système circulatoire et le SNC⁹⁹. Elles expriment peu de molécules d'adhésion des leucocytes à leurs membranes qui est également chargée négativement. Cela limite l'entrée des cellules immunitaire dans le SNC^{100,101}. Les CE du SNC possèdent environ 10% de mitochondrie de plus que les CE des capillaires périphériques et elles expriment des transporteurs membranaires spécifiques aux fonctions du SNC ce qui leurs permettent de réguler l'homéostasie de ce dernier^{102,103}.

La lame basale est un assemblage de protéines et de glycoprotéine extracellulaire, composée majoritairement de collagène IV. Elle entoure les CE. Elle sert de support aux CE et aux péricytes^{104,105}.

Les péricytes entourent les capillaires sur la face abluminale (du côté du SNC) des cellules endothéliales. Les péricytes et les CE sont généralement séparés par la lame basale commune mais ils peuvent également être en contact direct^{106,107}. Les péricytes régulent la différenciation des CE et ils ont une des capacités contractiles leurs permettant de moduler le flux sanguin des capillaires^{108,109}. Les péricytes du SNC peuvent également migrer à distance des CE pour éliminer des débris neuronaux en agissant comme des macrophages¹¹⁰.

Les astrocytes sont des cellules gliales présentent dans le SNC. Il s'agit du type cellulaire le plus abondant dans le cerveau. Il a une forme étoilée avec des pieds astrocytaires qui recouvrent les capillaires sanguins¹¹¹. Les CE et les astrocytes se régulent l'un et l'autres. Les astrocytes peuvent ajuster la perméabilité de l'endothélium tandis que les CE sont impliquées dans la différenciation des astrocytes via la sécrétion de facteur inhibiteur de la leucémie, l'apport de nutriment aux neurones, et leurs protections en générant une gaine de myéline¹¹²⁻¹¹⁴.

Avec une taille estimée entre 12 et 18 m² pour un adulte, la BHE est considérée comme étant la plus grande interface entre le sang et le cerveau¹¹⁵. La majorité des capillaires de l'encéphale sont isolé du système circulatoire par la BHE, à l'exception des organes circumventriculaires situés dans la paroi du système ventriculaire et dont les fonctions

sensorielles ou de sécrétion d'hormones nécessitent un contact direct avec le sang (Figure 4 C)¹¹⁶. La BHE contrôle la plupart des échanges entre le système circulatoire et le SNC grâce aux jonctions serrées des CE, qui ne permettent une diffusion passive seulement pour les molécules de moins de 400 Da, et des transporteurs moléculaires spécifiques. Cela permet de maintenir l'homéostasie du cerveau, d'assurer sa nutrition, et de le protéger contre des neurotoxines présentes dans le sang¹¹⁷⁻¹¹⁹. La BHE participent également à l'élimination de neurotransmetteurs et d'autres déchets biologiques produits par l'activité du SNC¹²⁰. Cela permet de maintenir l'homéostasie du SNC et donc la survie et le fonctionnement des neurones. D'un autre côté, la BHE représente le plus grand obstacle pour l'administration de médicaments destinés au SNC^{117,121}.

1.3.2 La notion de privilège immunitaire

1.3.2.1 Définition et origines

Une notion de privilège immunitaire (PI) a été proposée après l'observation que des greffons placés dans le parenchyme cérébral peuvent survivre plus longtemps que des greffons situés dans des tissus périphériques^{122,123}. Ce PI était justifié par :

1. L'absence perçue d'un drainage lymphatique des antigènes du SNC permettant l'activation des cellules immunitaires¹²⁴.
2. Une expression limitée des Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I dans le parenchyme cérébral^{125,126}.
3. La présence de barrière biologique entre le SNC et le reste du corps permettant de maintenir un micro-environnement spécifique et nécessaire au fonctionnement du SNC:
 1. La BHE.
 2. L'épithélium de l'arachnoïde qui n'est pas vascularisée.
 3. Une troisième barrière formée par les CE du plexus choroïde séparant le sang du LCR¹²⁷.

4. Le faible nombre de cellules immunitaires classiques (cellules T ou cellule B) dans le SNC lorsqu'on le compare aux organes périphériques¹²⁸.

L'ensemble de ces éléments à contribuer à laisser penser que le SNC et le SI sont largement indépendants l'un de l'autre.

1.3.2.2 Evolution du concept de privilège immunitaire

Ce concept a cependant évolué ces dernières décennies avec notamment:

1. L'identification du système lymphatique du SNC dans les méninges¹²⁴.
2. L'étude des cellules gliales telles que les astrocytes, les microglies qui ont le rôle de macrophage dans le SNC, et les oligodendrocytes qui avec les microglies orchestrent une réponse inflammatoire dans des conditions neuropathologiques¹²⁹⁻¹³⁴.
3. L'identification d'interaction entre le SI et le SNC. Un exemple de cela est le réflexe inflammatoire. Des cytokines sont produites par des cellules immunitaires activées et vont stimuler le SNC via les nerfs vagues afférents. En réponse, le SNC active les nerfs spléniques qui libèrent un neurotransmetteur, la noradrénaline. Cette molécule va être captée par les cellules LT CD4+ qui vont à leur tour libérer de l'acétylcholine et cette dernière molécule va à son tour être captée par les cellules immunitaires pour diminuer l'inflammation^{135,136}.
4. La découverte du fait que la perméabilité de la BHE est augmentée lors des épisodes de neuro-inflammation¹³⁷⁻¹³⁹.

Aujourd'hui, il est admis que le SNC et le SI communiquent entre-eux et s'influencent mutuellement. L'étude des microglies, les cellules immunitaires résidentes du cerveau, a montré que le SNC possède une réponse immunitaire spécialisée¹⁴⁰. Si les méninges participent à la séparation du SNC et du système circulatoire, elles permettent également une surveillance du SNC par le SI. La dure-mère et la pie-mère contiennent des cellules immunitaires, dont des macrophages, ces neutrophiles, des cellules dendritiques (CD), des cellules lymphoïdes innées (CLI), des LT CD8+, et des LT CD4+^{95,141}. Le système lymphatique des méninges participe à cette surveillance en drainant le LCR vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds où les antigènes

présents dans le LCR peuvent être présentés à des cellules immunitaires telles que des LT ou des Lymphocytes B (LB). Cette présentation peut alors provoquer une réponse immunitaire si nécessaire^{124,142,143}.

De nombreuses études ont montré une augmentation de la perméabilité de la BHE causée par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les cellules gliales et les neurones lors d'épisodes inflammatoires:

- Le $TNF\alpha$ produit par les microglies, les astrocytes et les neurones¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.
- L' $IL-1\beta$ sécrétés par les astrocytes¹⁴⁷
- L' $IL-6$ produit par les microglies, les astrocytes, les CE¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.
- L' $INF\gamma$ produits par les cellules gliales et les neurones^{151,152}.

Les neurones possèdent des récepteurs spécifiques à ces cytokines¹⁵³⁻¹⁵⁶. Certaines d'entre elles sont produites en quantité réduites dans le SNC et sont essentielles pour les fonctions neuronales tel que la formation et le maintien des synapses¹⁵³. De plus, des études précédentes ont révélées qu'une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (dont l' $IL-1$, l' $IL-6$, et le $TNF\alpha$) dans le sang de patients atteints de SCZ¹⁵⁷. Cela montre l'influence du SI sur les fonctions neuronales. La sécrétion de ces cytokines augmente lors de réactions inflammatoires suivant maladies et blessures causant une neurodégénération¹⁵⁸⁻¹⁶³. En plus d'être une conséquence de la neuro-inflammation, l'augmentation de la perméabilité de la BHE peut l'aggraver en permettant le passage du sang au SNC de cytokines pro-inflammatoires et de cellules immunitaires¹⁶⁴.

Outre le fait que les cellules du SNC possèdent des récepteurs des cytokines pro-inflammatoires, les Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique (PBMC) expriment des récepteurs des neurotransmetteurs dont la dopamine, la norépinephrine, et l'acétylcholine qui peuvent réguler l'activité et la différenciation des leukocytes¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Les organes lymphoïdes sont innervés par le système nerveux autonome permettant de réguler le SI au niveau d'un organe précis^{136,169,170}. De plus, des études ont montrées que l'infiltration dans le parenchyme du SNC de cellules immunitaires comme les LT est cruciale pour prévenir et éliminer les infections du SNC. Cette infiltration peut

cependant provoquer une neuro-inflammation affectant les capacités cognitives^{171,172}. Il a été établi que l'infiltration des LT est guidé par les cellules gliales et les cellules myéloïdes résidant dans le parenchyme du SNC¹⁷³.

Il a également été montré que l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HHS) permettent au SNC et au SI de s'influencer mutuellement¹³⁶. L'axe HHS peut être activé par des cytokines produite par le SI ce qui permet à ce dernier d'influencer le SNC et ses fonctions cognitives et mémorielles¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Tandis que le SNC peut provoquer via l'hypothalamus la production de glucocorticoïde par cet axe pour influencer le SI^{177,178}.

Ces informations ont fait évoluer le concept de privilège immunitaire du SNC. Si à l'origine ce concept représentait une séparation totale des interactions entre le SI et le SNC, il correspond aujourd'hui au fait que si le SNC possède des mécanismes permettant de limiter le contact et l'activité du SI, les deux systèmes ne sont complètement isolés l'un de l'autre. Le SNC présente une forme régulée de surveillance immunitaire impliquant les méninges, leurs systèmes de drainage lymphatique, et la BHE. De plus, les deux systèmes se régulent mutuellement¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Si cela permet de protéger le SNC en temps normal, un emballement du SI peut causer une inflammation chronique du SNC qui affecte les capacités cognitives des patients, et pourrait participer à la genèse de troubles psychiatriques^{182,183}

1.3.3 Troubles psychiatriques et système immunitaire

1.3.3.1 Les troubles psychiatriques ont également été associées à une dérégulation du système immunitaire

Comme je l'ai décrit dans le chapitre 2 ([Section 1.2.4.2](#)), la dérégulation du SI est un acteur important de l'étiologie des TPS. Les TPS sont aujourd'hui reconnues comme des maladies neuro-immunes avec un dysfonctionnement du SI tout au long de la vie des patients¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Ce dysfonctionnement du SI participe au développement chez ces patients de maladies auto-immunes et de syndromes métaboliques qui participe à la surmortalité liée aux TPS¹⁸⁷⁻¹⁹⁰.

1.3.3.2 Hypothèse de l'origine neuro-immunologique des troubles psychiatriques

Les TPS sont marquées par une augmentation de cytokines pro-inflammatoires et d'autre marqueurs de l'inflammation comme la protéine C réactive dans le sang

d'environ 40% des patients atteints de TPS^{65,66}. De plus, 20 à 50% des patients recevant des traitement chroniques d'interféron- α dans le cadre du traitement d'un cancer ou d'une maladie chronique développent des symptômes dépressifs⁶⁷.

Cette inflammation chronique peut alors affecter le SNC de plusieurs façons qui ont été résumés par Robert Dantzer dans un article paru en 2008¹³⁵:

1. Par l'activation de nerfs sensoriels par des cytokines et des Motifs moléculaires associés au danger, en anglais, Damage Associated Molecular Pattern (DAMP)^{191,192}.
2. En stimulant la production de cytokines pro-inflammatoire par des cellules immunitaires résidant dans les organes circumventriculaires¹⁹³. Ces organes ne sont pas limités par la BHE. Les cytokines peuvent donc être diffuser dans le cerveau¹⁹⁴.
3. La BHE peut également servir de point d'entrée de ces cytokines dans le cerveau, soit par l'utilisation de transporteurs ou par la perméabilisation de la BHE comme je l'ai montré précédemment ([Section 1.3.2.2](#))¹⁹⁵.

L'entrée de ces cytokines dans le cerveau stimule les cellules gliales provoquant une neuro-inflammation. Il a été montré que l'activation des microglies joue un rôle dans le développement et l'aggravation des déficiences cognitives de la SCZ ou encore avec le taux de suicide des individus atteints de TB¹⁹⁶⁻¹⁹⁹. Bien que le rôle des cellules gliales ne soit pas tout à fait compris, il est probable que leurs activations dans un contexte de neuro-inflammation a pour conséquence une dérégulation de certains neurotransmetteurs, un excès de l'élagage synaptique, et une diminution de la myélination des neurones réduisant la matière blanche du cerveau^{196,200}.

1.4 Chapitre 4: La recherche de biomarqueurs en psychiatrie

1.4.1 Des biomarqueurs des troubles mentaux ont déjà été proposés

Le sang permet le transport de nombreuses cellules du SI et de leurs médiateurs tels que les cytokines. Il reflète donc les dysfonctionnements des processus systémiques comme l'inflammation ou les altérations métaboliques. Compte tenu de l'ensemble des données disponibles aujourd'hui qui indiquent que le SI et les TPS sont liés et le fait que les PBMC peuvent être obtenue facilement à partir du sang des patients, l'évaluation des dérégulations de ces cellules chez les patients atteints de TPS représente une méthode attractive pour identifier des biomarqueurs périphériques des TPS.

De nombreuses études ont déjà proposés des biomarqueurs à partir de l'étude des PBMC ou de cerveaux post-mortem. Un exemple de cela, concerne les miARN. Comme je l'ai indiqué précédemment ([Section 1.1.2.4](#)), ces molécules sont d'importants régulateurs post-traductionnels qui influencent sur l'expression des gènes. Une revue non-exhaustive de la littérature indique que 345 miARN ont déjà été associés à différentes TPS incluant la SCZ, les TB, ou la DM à partir de l'étude du sang ou de cerveau post-mortem^{1-3,201}.

Certaines molécules pro-inflammatoires tel que les cytokines IL-1 β , IL-6, IL-22, le TNF α , et l'IFN γ ont également été associées à des TPS et notamment la SCZ dans de nombreuses études²⁰²⁻²⁰⁷.

1.4.2 Absence de biomarqueur validé

Ces molécules identifiées comme étant des biomarqueurs sont cependant à prendre avec précaution. Certaines études identifient des molécules comme étant dérégulés d'une certaine façon alors que d'autres études étudiant le même type de patients et le même type d'échantillon, n'identifient pas les mêmes molécules ou alors n'identifient pas la dérégulation de ces biomarqueurs dans le même sens. De plus, certaines molécules sont identifiées comme étant dérégulées de la même façon pour des TPS différents²⁰². Cela empêche la validation de ces biomarqueurs et leur utilisation clinique.

Aujourd'hui encore, la psychiatrie reste une branche de la médecine moderne qui n'utilise pas de biomarqueurs pour réaliser ou confirmer un diagnostic. L'identification des troubles psychiatriques dont un individu peut être atteint, est réalisé uniquement sur le recueil d'anamnèse des patients et sur des critères cliniques à partir desquels le clinicien réalise ses diagnostics. Ces critères peuvent-être des critères sémiologiques (identification de symptômes exprimés par les patients), des critères d'évolution temporelles, des critères fonctionnels (répercussion psycho-sociale des symptômes), et l'élimination d'un diagnostic dû par exemple à la présence ou l'absence de symptômes spécifiques à certains troubles ([Figure 6](#)). Cela implique que les patients participent de façon active à leurs diagnostics et qu'ils permettent aux cliniciens de détecter suffisamment de symptômes pour identifier les TPS correctement selon système de classification qu'ils utilisent dont le DSM, publié par l'*Association Américaine de Psychiatrie*, ou la Classification Internationale des Maladies (CIM), publiée par l'OMS ([Section 1.2](#))²⁰⁸.

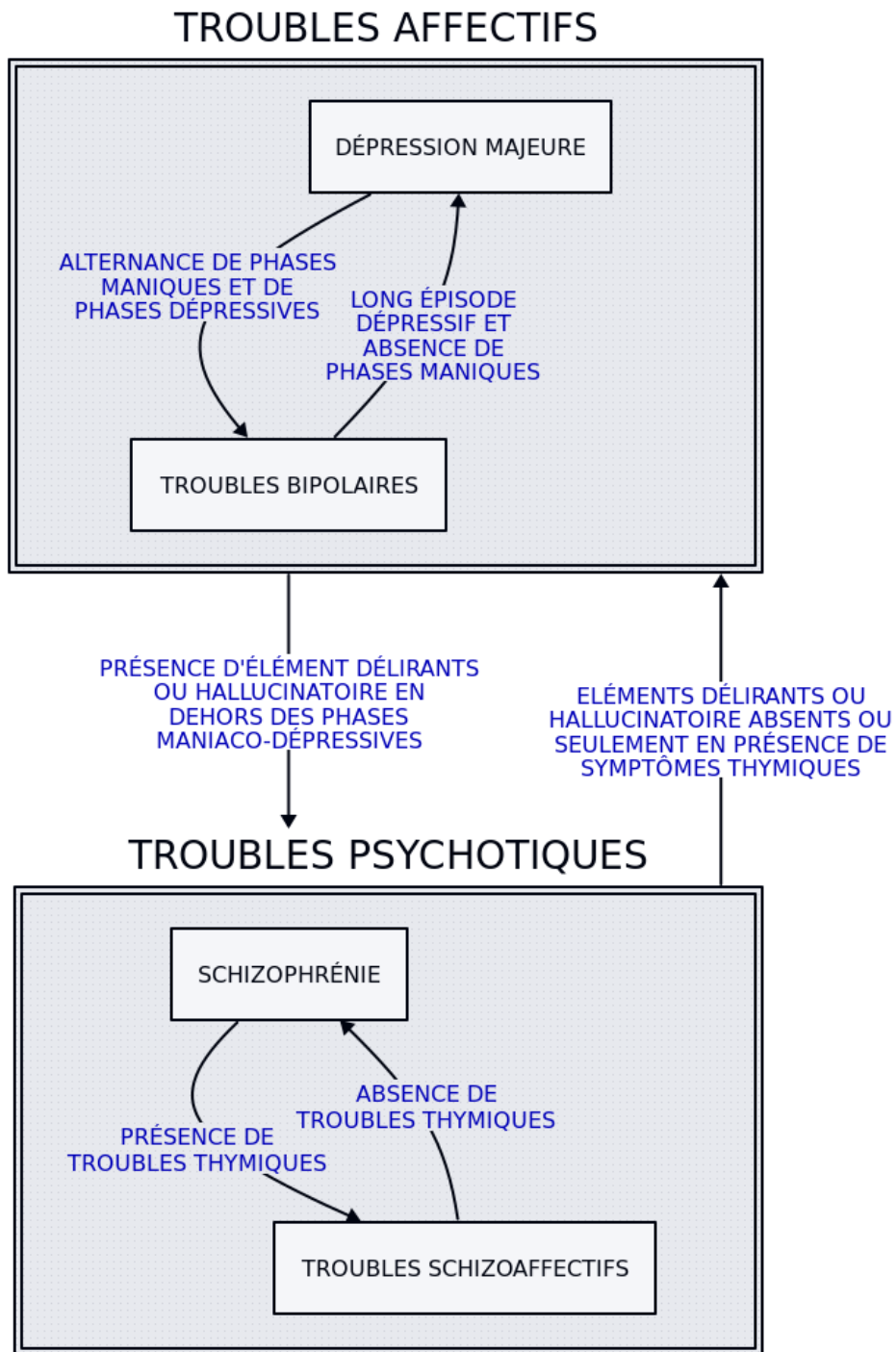


Figure 6: Représentation graphique simplifiée du diagnostic des PM étudiées lors de cette thèse

1.4.3 La classification des troubles psychiatriques est un frein pour l'identification de biomarqueur

1.4.3.1 Définition de la dichotomie kraepelinienne

Alors que les premières mentions des maladies psychiatriques remontent à l'antiquité avec Hippocrate en Grèce Antique qui suggère plusieurs maladies mentales dont la mélancolie, la classification actuelle des TPS est relativement récente. Les premières tentatives pour standardiser les diagnostics et classer les patients selon leurs symptômes commencent lors du XIX^{ème} siècle à cause du besoin des autorités d'établir des statistiques pouvant être déclarées. Il y a notamment eu une tentative par le bureau de recensement des Etats-Unis en 1880 de classer les patients selon le type des maladies mentales mais leur classification n'a pas reçu de consensus. C'est dans ce contexte que la Dichotomie Kraepelinienne (DK) est proposée en 1899 par Emil Kraepelin. Emil Kraepelin propose de séparer les TPS en deux groupes de maladies en se basant sur la progression et l'issue des troubles mentaux, et notamment, la diminution des capacités cognitives avec un premier groupe avec des symptômes chroniques conduisant à une détérioration systématique de la cognition, qu'il nomme les "démences précoces" (SCZ) et un second groupe avec des symptômes périodiques qui mène à une perte de capacité relative moins forte, les "psychoses maniaco-dépressives" (TB). Cette classification a été rapidement adoptée pour la simplicité par laquelle elle permet de prendre en charge les patients, et forme la base des systèmes diagnostics utilisés actuellement en ayant inspiré la CIM (aujourd'hui à sa 10^{ème} édition) et le DSM. De plus, les classifications cliniques actuelles continuent, comme la DK, à décrire les TPS comme des catégories "exclusives".

1.4.3.2 Remise en cause du modèle dichotomique

Bien que les modèles catégoriels des troubles de la personnalité soient utiles pour poser un diagnostic et délivrer un traitement adéquat, Certaines recherches remettent en cause la DK et les classifications qui sont basées dessus. La complexité des troubles psychiatriques rend difficile l'utilisation d'une classification basée sur des catégories strictes car comme je l'ai indiqué précédemment, des symptômes et des facteurs de risques sont communs aux différents troubles psychiatriques. Couplé au fait que le

diagnostic est principalement basé sur le recueil d'anamnèses, cela contribue à des retards, voire à des erreurs de diagnostic.

Ainsi, la DK, et les systèmes de classification fondés dessus, ont été remis en cause une première fois en 1933 via la création d'une nouvelle catégorie de patients, les TSCZA, pour décrire les patients à la fois eu un épisode thymique comme pour les TB et des symptômes de la SCZ tel que des hallucinations, ou des idées délirantes³⁷. Cette expansion de catégorie est telle que des soixante diagnostics décrit dans la première édition du DSM. Cette classification est passée à presque 300 troubles mentaux différents dans l'actuelle cinquième édition. D'un point de vue clinique, cette complexité peut rendre le diagnostic difficile. Par exemple, bien qu'il soit connu qu'un patient atteint de TB peut avoir des symptômes psychotiques tel que des hallucinations ou des troubles de la pensée lors des phase maniaques et dépressives de sa maladie. Ces patients avec des TB doivent alors être distingués des patients schizophrènes par la présence de symptômes thymiques concomitants, et des patients atteints de TSCZA par le fait qu'ils n'ont pas de symptômes psychotiques en dehors des phases maniques ou dépressives. Cependant, la mention de ces symptômes psychotiques à un clinicien diminue de façon significative la probabilité d'être diagnostiqué comme étant atteint de TB, les cliniciens diagnostiquent alors davantage un trouble psychotique tel que la SCZ ou les TSCZA^{36,209}. Il est également fréquent qu'un patient atteint de SCZ développe un épisode dépressif majeur au début de la pathologie et qu'il soit diagnostiqué comme souffrant de TB ou de TSCZA^{26,210,211}. De plus, de multiples découvertes scientifiques remet en cause la proposition de la DK que les troubles psychotiques et les troubles thymiques sont des troubles différents. Ainsi, comme je l'ai spécifié dans le chapitre 2 ([Section 1.2.4.1](#)), les études de jumeaux et les GWAS ont montré l'existence de risques génétiques communs et spécifiques entre la SCZ et les TB⁶⁹. Outre les facteurs de risques et les symptômes, même les traitements en psychiatrie sont davantage utilisés pour traiter des dimensions de symptômes plutôt que des catégories de troubles psychotiques. Par exemple, les antidépresseurs sont utilisés pour traiter non seulement la DM, mais aussi de nombreux autres troubles comme les troubles obsessionnel compulsifs, le stress post-traumatique, et les troubles de l'anxiété^{212,213}.

Les antipsychotiques peuvent être également prescrits pour plusieurs types de troubles mentaux dont la SCZ, les TB, et aussi certains troubles de la personnalité²¹⁴. Plus inquiétant encore, certains patients qui ont reçu le même diagnostic de SCZ ne répondent pas de la même façon aux traitements montrant que des différences persistent même au sein d'un même diagnostic. Certains patients continuent à exprimer des symptômes chroniques tandis que d'autres patients se rétablissent complètement²¹⁵. Cela suggère un problème d'homogénéité de certaines catégories.

L'ensemble de ces informations indiquent que les TPS partagent de nombreux facteurs de risques et symptômes et sont liées génétiquement et biologiquement. Cela contredit la DK qui déclare que les troubles psychotiques sont complètement séparés des troubles thymiques. Il apparaît donc nécessaire de prendre en compte ces facteurs communs et de les étudier conjointement. Cependant, de nombreuses études sur les troubles mentaux continuent à s'intéresser de façon spécifique à un seul trouble tel que la SCZ ou les TB. Cela est probablement l'une des causes empêchant l'identification des mécanismes biologiques sous-jacents des TPS. La raison de cette individualisation dans la recherche scientifique est largement due à la façon dont les TPS sont cliniquement diagnostiquées aujourd'hui.

1.4.4 Utilisation de modèles dimensionnels

1.4.4.1 Définition des modèles dimensionnels

Pour répondre à cette remise en cause des classifications héritées de la DK, des tentatives ont été réalisées pour utiliser des modèles dimensionnels qui devraient permettre de mieux traiter les patients et de mieux étudier les TPS. L'ambition de ces modèles est de s'affranchir des problèmes causés par les modèles catégoriels tel que le DSM en ne se basant que sur les symptômes et leurs intensités pour grader les patients sans les classer dans des groupes figés. Cela permettrait en théorie une amélioration de la prise en charge et des traitements en indiquant si les patients présentent des symptômes psychotiques tel que des hallucinations ou encore des symptômes thymiques (manie ou dépression) tout en graduant leurs intensités. Ces modèles devraient également améliorer la recherche scientifique. En effet, alors que les TPS partagent à la fois des facteurs de risques, des symptômes et des mécanismes

biologiques sous-jacents, les modèles catégoriels et leurs diagnostics mutuellement exclusifs ayant été notés comme étant des freins à la recherches scientifiques^{216,217}.

Ainsi, Keshavan et al., ont en 2011 créé un modèle dimensionnel pour évaluer les symptômes des troubles schizophrènes et bipolaires et le comparer au modèle catégoriel de la quatrième édition du DSM²¹⁸. Leur modèle évalue sur une échelle schizo-bipolaire de dix points trois éléments de ces troubles:

1. La proportion de psychose sans symptômes affectif en proportion de la durée totale de la maladie.
2. La présence de symptômes maniaques en proportion de la durée totale de la maladie.
3. Le type prédominant des symptômes thymiques (maniaques ou dépressifs) lorsqu'ils sont présent.

Les deux premiers points ont été utilisés pour évaluer la proportion de TPS non affectifs et les symptômes maniaques car ces deux éléments sont importants pour le diagnostic des TSCZA dans le DSM. Le troisième point a été inclus pour évaluer si les symptômes thymiques étaient davantage des symptômes de manie que des symptômes dépressifs, ou inversement. Keshavan et al. ont additionné la somme de ces trois éléments et obtenus une échelle allant de 0 à 9. Ils ont alors observé qu'un nombre important de patients bipolaires (score de 0 à 1, N=165) et schizophrènes (score de 8-9, N=256) se trouve aux extrémités de leur modèle tandis que des patients atteints de TSCZA, mais aussi de TB, ou de SCZ (N=341, 45% de leurs échantillons) ont des scores moyens (Figure 7). Leur modèle montre peu de chevauchement entre les troubles bipolaires et schizophrènes qui sont aux extrémités du spectre schizoaffectif. Il apparait que leur modèle obtient des résultats similaires ou du moins corrélés avec ceux des diagnostics réalisés avec le DSM. Cependant, leur modèle ne montre pas de séparation claire entre les différentes catégories du DSM ce qui suggère encore une fois, une distribution non catégorielle des symptômes thymiques et psychotiques chez les patients atteints de TPS.

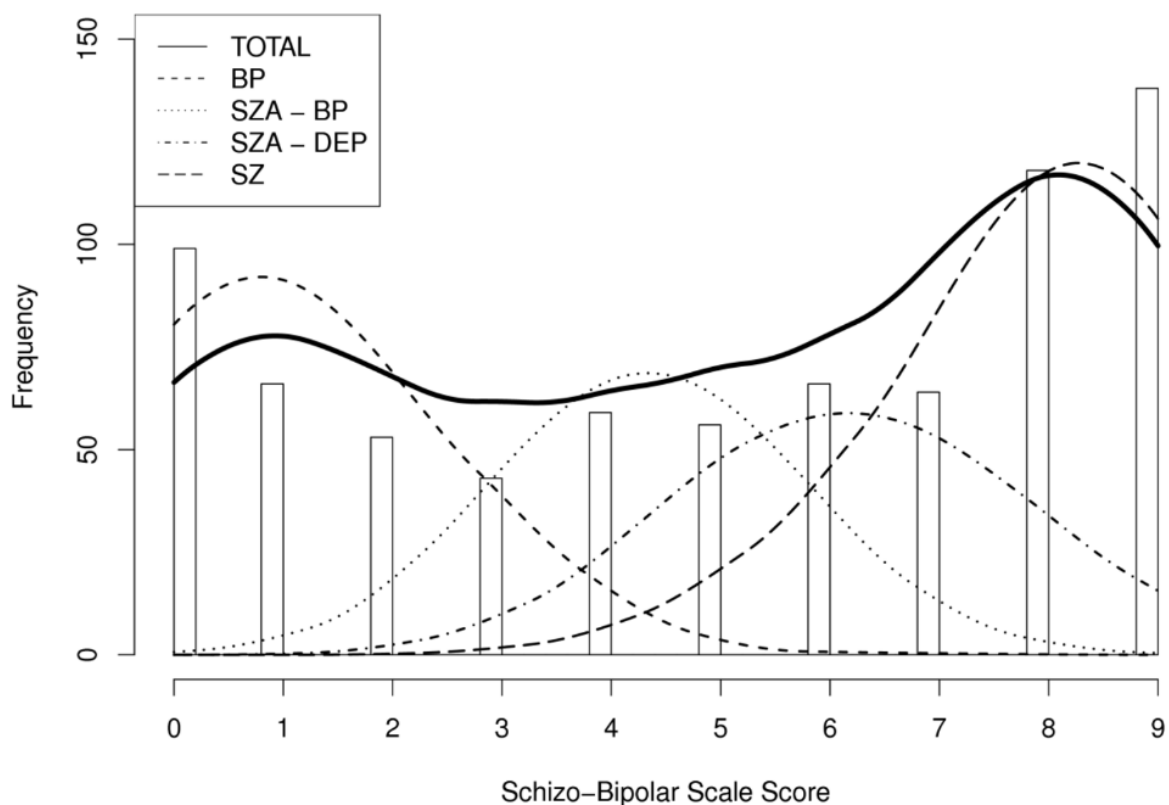


Figure 7: Distribution des scores de l'échelle Schizo-Bipolaire dans les différents groupes diagnostics (Keshavan et al. 2011)²¹⁸

Un autre modèle similaire a été créé par Möller et al. à partir d'une cohorte allemande de patients hospitalisés. Ce modèle utilise des échelles de sévérités comme le PANSS ou l'Échelle d'Évaluation Globale du Fonctionnement, en anglais Global Assessment of Functioning (EGF), qui sont utilisées par les cliniciens pour réaliser des diagnostics, comme dimensions représentant un type de symptôme et sa sévérité. Des analyses de régression logistiques ont ensuite été réalisées pour comparer ces dimensions à la classification selon le CIM²¹⁹.

On observe que les deux modèles bien que visant le même spectre n'utilise pas les mêmes échelles de sévérité, ni de méthode similaire. En revanche, ces modèles dimensionnels sont similaires dans le sens où deux critères ont été pris en compte dans leurs formations, le type de symptômes évalués et la sévérité de ces symptômes. Ils sont également similaires par le fait que les patients ne sont pas classés dans des catégories strictes permettant d'affiner et de personnaliser la prise en charge de ces patients. On peut également citer les modèles de classification RDoC et HiTOP ont également été proposés en se basant sur les symptômes et facteurs de risques

communs aux troubles psychiatriques, pour permettre de résoudre les problèmes liés à l'hétérogénéité de la classification catégorique actuelle^{220,221}. Ces modèles sont cependant toujours en train d'évoluer et leurs utilités par rapport au DSM est toujours en train d'être évalués.

1.4.4.2 Comparaison avec les modèles catégoriels

Dans l'ensemble, ces modèles dimensionnels n'offrent pas forcément de meilleures capacités prédictives que les modèles catégoriels pour un nombre important de patients qui peuvent être classés dans les catégories SCZ et TB du DSM ou de la CIM. Cependant, ce type de modèle présente un intérêt pour les patients atteints de troubles qui ne rentrent pas dans ces catégories mais ont un phénotype entre les deux comme les patients TSCZA. Ces modèles y parviennent en indiquant de manière plus nuancée et précise les symptômes évalués et leurs sévérités^{218,219}. Par exemple, le modèle schizo-affectif de *Keshavan et al.* indique la proportion et la gravité des symptômes thymiques et des symptômes psychotiques²¹⁸. Ces modèles sont de plus soutenus par des données empiriques qui prouvent leur validité et leur pertinence par rapport aux symptômes qu'ils évaluent. Il est probable que, d'un point de vue clinique, les deux types de modèles, catégorique et dimensionnel, soient corrects et puissent se compléter pour améliorer la prise en charge des patients, les modèles dimensionnels permettant d'affiner le diagnostic des modèles catégoriels comme le DSM et en réduisant la stigmatisation qui accompagne certains diagnostics^{41,222}.

Ces modèles présentent cependant certains désavantages pour une utilisation clinique. Outre le fait que leur utilisation nécessitera de former les cliniciens à l'utilisation de ces modèles, il sera plus difficile d'expliquer aux patients les résultats de leurs évaluations avec ce type de modèle. En effet, les modèles catégoriels sont compris et reconnus par le grand public et permettent aux patients d'avoir une idée claire de leurs états de santé tandis qu'ils pourraient avoir plus de mal à comprendre ce type de modèle dimensionnel. De plus, si les modèles dimensionnels pourraient à terme permettre une personnalisation des traitements en les adaptant à l'ensemble des symptômes des patients, il reste à définir des seuils d'interventions clairs tandis que les catégories du DSM disposent déjà de protocoles de traitements^{222,223}.

1.4.4.3 Avantage des modèles dimensionnels pour la recherche

Les modèles dimensionnels représentent également un outil intéressant pour la recherche scientifique. Ils permettent de s'affranchir des catégories cliniques actuelles qui ont été identifiées comme étant un frein pour la recherche^{216,217}. Ils réalisent cela en fournissant des données plus riches et détaillées sur la sévérité des symptômes et en permettant une validation transnosographique.

En revanche, ils présentent également plusieurs inconvénients. Le premier étant la multiplicité des hypothèses suivant le nombre de dimensions étudiées. Le second correspond à la standardisation des mesures servant à créer les modèles. Différentes échelles de symptômes peuvent être utilisées dans différentes régions du monde. De plus, certaines différences culturelles peuvent influencer l'évaluation des symptômes²²⁴.

2. Objectifs de la thèse: Le projet MulioBio

2.1 Hypothèse

Aujourd'hui, il est clair que les méthodes de diagnostic héritées de la DK sont des freins pour la recherche de biomarqueurs. Les troubles mentaux présentent tant de chevauchement de symptômes et de facteurs de risques qu'il est difficile de valider un biomarqueur représentant une catégorie du DSM. Pourtant, les liens entre le SNC, les TPS, et le SI indiquent que ces biomarqueurs pourraient exister même s'ils n'ont pas encore été validés.

En se basant sur ces informations, l'hypothèse initiale de mon travail de thèse est qu'il est plus probable d'identifier des biomarqueurs en stratifiant les individus étudiés selon la sévérité de leurs phénotypes et non selon les diagnostics qui leurs ont été attribués. Cela devrait permettre l'identification de biomarqueurs transdiagnostiques liés à la sévérité des symptômes dans le sang des patients.

L'identification de ces biomarqueurs de sévérité dans le sang est cruciale pour plusieurs raisons. La première est que les biomarqueurs de la sévérité permettront d'évaluer la progression des TPS et la réponse des patients aux traitements. Les patients avec les symptômes les plus sévères étant plus susceptibles de répondre à certains antipsychotiques que d'autres²²⁵. Ceci est particulièrement important pour les troubles psychiatriques où la sévérité des symptômes est corrélée avec une déficience fonctionnelle et la qualité de vie amoindrie des patients²²⁶. Les différents TPS ayant de nombreux points communs, l'identification de biomarqueurs de la sévérité permettrait de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ces symptômes et des mécanismes à l'œuvre dans les TPS. Ces biomarqueurs pourraient également permettre d'améliorer la prise en charge des patients en adaptant les traitements suivant l'évolution de la sévérité observée par les cliniciens et mesurée avec les biomarqueurs. Le fait d'identifier ces biomarqueurs dans le sang est aussi un avantage pour une utilisation clinique car les prélèvements sanguins sont peu invasifs, et peuvent être analysés facilement à l'aide des technologies actuelles ([Section 1.1.2.2](#)). De plus, ce type de prélèvements est réalisé en pratique courante pour s'assurer de l'absence de

comorbidités organiques et de l'absence de contre-indication et de la tolérance aux traitements.

2.2 Description de l'étude PsyCourse

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai collaboré avec l'Institute of Psychiatric Phenomics and Genomics (IPPG) localisé à Munich en Allemagne pour accéder à des données et des échantillons de la cohorte PsyCourse. La cohorte PsyCourse est composée d'individus allemands, et a été créée par *Thomas G. Schulze*, le directeur de l'IPPG. Cette cohorte est composée d'environ 450 individus neurotypiques et de plus de 1300 patients atteints de différentes TPS, dont les TB, la DM, la SCZ, et les TSCZA. L'avantage de cette cohorte est qu'elle est liée à une étude du même nom²²⁷. Lors de cette étude, les participants ont assisté à jusqu'à quatre visites durant lesquelles leurs symptômes et leurs sévérités ont été mesurés de façon intensive à l'aide d'échelles d'évaluation psychiatrique, de questionnaires, et de tests cognitifs. Un diagnostic a été réalisé durant la première visite en se basant sur le DSM. De plus, des échantillons biologiques de sang veineux ont également été prélevés à chaque visite permettant d'obtenir de l'ADN, de l'ARN, et du sérum afin d'effectuer des analyses scientifiques ultérieures. Parmi ces analyses, un génotypage des participants, ainsi qu'une quantification des miARN ont déjà été réalisés avec des échantillons de la première visite de l'étude PsyCourse par l'IPPG et le German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), un autre laboratoire allemands localisé à Göttingen et dirigé par André Fischer, qui a quantifié les miARN des participants de l'étude PsyCourse. Les participants ont été recontactés durant ma thèse ce qui a permis d'obtenir les échantillons d'une cinquantaine d'entre eux 10 après l'étude PsyCourse.

2.3 Description des projets auxquels j'ai participé durant ma thèse

Mon travail de thèse a été organisé autour de deux projets. Le premier a consisté à regrouper les patients selon la similarité de leurs diagnostics réalisés à partir du DSM pour former deux groupes de patients élargis correspondant aux:

1. Troubles du spectre de la SCZ (individus diagnostiqués avec de la SCZ ou des TSCZA)

2. Troubles de l'humeur (individus diagnostiqués avec des TB ou une DM)

3. Individus neurotypiques

Ces groupes ont été formés en se basant sur les classifications partagées par ces maladies et leurs symptômes communs. J'ai ensuite réalisé une analyse du miRNAome de ces individus pour identifier des signatures spécifiques à chaque groupe. Les résultats de ce projet ont été présentés dans un article soumis à *Molecular Psychiatry* le 17 Avril 2024 et actuellement en révision par l'éditeur²²⁸.

Le second projet a eu pour ambition d'identifier des biomarqueurs de la sévérité des TPS. Pour réaliser cela, j'ai utilisé les phénotypes collectés durant l'étude PsyCourse pour classer en deux groupes 452 patients, qui ont participé à l'étude, selon la sévérité de leurs symptômes mesuré aux quatre visites de l'étude. J'ai ensuite utilisé les variables collectées durant l'étude PsyCourse réalisé des analyses pour comparer les protéomes, méthylomes, et miRNAomes de ces deux groupes pour identifier des signatures de gènes liées à la sévérité des TPS.

J'ai également participé durant ma première année de thèse à un 3^{ème} projet qui n'est pas lié à mon sujet de thèse, mais au projet général de l'équipe 6 du CR2TI (les interactions hôte-pathogènes dans les poumons) dont je fais partie. Lors de ce projet, j'ai réalisé une analyse de co-expression des ARNm qui, couplée à des analyses du protéomes, et de l'épigénome réalisée par d'autres membres de l'équipe 6, a permise l'identification d'une programmation des monocytes observée après une lésion cérébrale qui est associé à un risque de réactivation du Herpes Simplex Virus (HSV) et d'invalidité 6 mois après le traumatisme cérébral. Le PDF de cet article est disponible en annexe ([Section 4.1](#)).

3. Résultats

3.1 Projet n°1: L'analyse intégrative des profils d'expression des miARN révèle des mécanismes moléculaires distincts et communs sous-jacents aux troubles psychiatriques sévères

L'article intitulé [Integrative Analysis of miRNA Expression Profiles Reveals Distinct and Common Molecular Mechanisms Underlying Broad Diagnostic Groups of Severe Mental Disorders](#) a été écrit à partir des résultats de ce projet. Il a été soumis à [Molecular Psychiatry](#) en 2024²²⁸ et il a été mis à jour après avoir été relu par des pairs. J'attends actuellement la décision de l'éditeur concernant sa publication.

Lors ce projet, j'ai regroupé les patients en groupes diagnostiques élargis avec dans un premier groupe "affectif", les individus diagnostiqués avec des TB ou de la DM, et dans un deuxième groupe "psychotique", les patients atteints de SCZ, ou de TSCZA. Il y a plusieurs raisons pour ce regroupement:

1. Cela me permet d'augmenter la puissance statistique de mes analyses en réduisant le nombre de groupes qui doivent être comparés tout en augmentant leurs tailles.
2. Plusieurs études indiquent que les catégories du DSM ne correspondent pas à la biologie des TPS qui s'apparente davantage à un spectre de symptômes avec un chevauchement des symptômes et des facteurs de risques.
3. Les TB et la DM sont similaires dans le sens où la dérégulation de l'humeur est le symptôme principal même si la direction est différente entre les phases de manie des TB et celles de dépression.
4. Les TSCZA et la SCZ sont similaires par le fait que les symptômes psychotiques font partie des symptômes principaux de ces troubles. De plus, ces symptômes psychotiques sont indépendants des symptômes thymiques des patients.

Après avoir formé ces groupes, j'ai étudié l'expression des miARN dans le sang total (quantifié par le DZNE) de ces groupes de patients et d'individus neurotypiques de la

même étude PsyCourse. Pour cela, j'ai identifié des miARN d'intérêts à l'aide de trois analyses. Dans un premier temps j'ai réalisé une analyse d'expression différentielle à l'aide d'un modèle linéaire pour comparer l'expression des miARN des groupes d'individus et identifier des miARN dérégulés entre ces groupes. J'ai ensuite réalisé une TWAS à l'aide des génotypes mesurés par l'IPPG avant le début de ma thèse, et les données publiques de deux GWAS sur la SCZ et les TB, publiée par le Psychiatric Genomics Consortium (PGC). Cela a permis d'identifier des miARN dont la dérégulation de l'expression est liée aux risques génétiques de la SCZ ou des TB. Enfin, dans une troisième analyse, un stagiaire que j'ai encadré a utilisé des techniques d'apprentissage automatique, en anglais, Machine Learning (AA) pour créer un modèle de classification permettant d'identifier les groupes élargis en fonctions de l'expression des miARN. Cette troisième approche a été utilisé pour identifier des miARN pouvant être associé aux TPS d'une façon non linéaire qui peuvent ne pas être détectés par l'analyse d'expression différentielle²²⁹. Les résultats de ces analyses ont été intégrés pour identifier de manière robuste les gènes cibles des miARN qui sont liés aux TPS ainsi que les voies biologiques auxquelles ils appartiennent.

1 Title:

2 Integrative Analysis of miRNA Expression Profiles Reveals Distinct and Common Molecular
3 Mechanisms Underlying Broad Diagnostic Groups of Severe Mental Disorders

4

5 Pierre Solomon^{1*}, Lalit Kaurani^{3*}, Monika Budde^{2*}, Jean-Baptiste Guiné¹, Dennis Manfred
6 Krüger³, Kevin Riquin¹, Tonatiuh Pena³, Susanne Burkhardt³, Cynthia Fourgeux¹, Kristina
7 Adorjan^{2,24}, Maria Heilbronner², Janos L. Kalman², Mojtaba Oraki Kohshour^{2,30}, Sergi Papiol^{2,29},
8 Daniela Reich-Erkelenz², Sabrina K. Schaupp², Eva C. Schulte^{2,26,27}, Fanny Senner^{2,25}, Thomas
9 Vogl², Ion-George Anghelescu⁷, Volker Arolt⁸, Bernhardt T. Baune⁹⁻¹¹, Udo Dannlowski⁸, Detlef
10 E. Dietrich^{12,31}, Andreas J. Fallgatter¹³, Christian Figge¹⁴, Georg Juckel¹⁵, Carsten Konrad¹⁶, Jens
11 Reimer¹⁷, Eva Z. Reininghaus¹⁸, Max Schmauß¹⁹, Carsten Spitzer²⁰, Jens Wiltfang^{5, 21,28}, Jörg
12 Zimmermann²², Anna-Lena Schütz⁴, Farahnaz Sananbenesi⁴, Anne Sauvaget²³, Falkai
13 Peter^{25,29,32}, Thomas G. Schulze^{2,32-34}, André Fischer^{3,4,5,6#}, Urs Heilbronner^{2#}, Jeremie
14 Poschmann^{1,35,#}

15

16 Affiliations:

17 ¹Nantes Université, CHU-Nantes, INSERM, Center for Research in Transplantation and
18 Translational Immunology, UMR 1064, 44000, Nantes, France.

19 ²Institute of Psychiatric Phenomics and Genomics (IPPG), LMU University Hospital, LMU
20 Munich, Munich, Germany

21 ³German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Department for Epigenetics and
22 Systems Medicine in Neurodegenerative Diseases, Department of Psychiatry and
23 Psychotherapy, University Medical Center Göttingen, Göttingen 37075, Germany

24 ⁴Research Group for Genome Dynamics in Brain Diseases, German Center for Neurodegenerative
25 Diseases, Göttingen, Germany

26 ⁵Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Göttingen, Göttingen
27 37075, Germany

28 ⁶Cluster of Excellence "Multiscale Bioimaging: from Molecular Machines to Networks of Excitable Cells"
29 (MBExC), University of Göttingen, Germany

30 ⁷Department of Psychiatry and Psychotherapy, Mental Health Institute Berlin, Berlin, 14050,
31 Germany

32 ⁸Institute for Translational Psychiatry, University of Münster, Münster, 48149, Germany

33 ⁹Department of Psychiatry, University of Münster, Münster, 48149, Germany

34 ¹⁰Department of Psychiatry, University of Melbourne, Melbourne, Australia

35 ¹¹Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, Parkville,
36 Australia

37 ¹²AMEOS Clinical Center Hildesheim, Hildesheim, 31135, Germany

38 ¹³Department of Psychiatry and Psychotherapy, Tübingen Center for Mental Health (TüCMH),
39 University of Tübingen, Tübingen, 72076, Germany; German Center for Mental Health (DZPG),
40 partner site Tübingen, Germany

41 ¹⁴Karl-Jaspers Clinic, European Medical School Oldenburg-Groningen, Oldenburg, 26160,
42 Germany

43 ¹⁵Department of Psychiatry, Ruhr University Bochum, LWL University Hospital, Bochum, 44791,
44 Germany

45 ¹⁶Department of Psychiatry and Psychotherapy, Agaplesion Diakonieklinikum, Rotenburg,
46 27356, Germany

47 ¹⁷Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Hamburg-Eppendorf,
48 Hamburg, 20246, Germany

49 ¹⁸Division of Psychiatry and Psychotherapeutic Medicine, Research Unit for Bipolar Affective
50 Disorder, Medical University of Graz, Graz, 8036, Austria

51 ¹⁹Clinic for Psychiatry, Psychotherapy and Psychosomatics, Augsburg University, Medical
52 Faculty, Bezirkskrankenhaus Augsburg, Augsburg, 86156, Germany
53 ²⁰Department of Psychosomatic Medicine and Psychotherapy, University Medical Center
54 Rostock, Rostock, 18147, Germany
55 ²¹German Center for Neurodegenerative Disease (DZNE), Göttingen, 37075, Germany
56 ²²Psychiatrieverbund Oldenburger Land GMBH, Karl-Jaspers-Klinik, Bad Zwischenahn, 26160,
57 Germany
58 ²³Nantes Université, CHU Nantes, Movement – Interactions – Performance, MIP, UR 4334,
59 Nantes, France.
60 ²⁴University Hospital of Psychiatry and Psychotherapy, University of Bern, Bern, Switzerland
61 ²⁵Department of Psychiatry and Psychotherapy, LMU University Hospital, LMU Munich, Munich,
62 80336, Germany
63 ²⁶Institute of Human Genetics, University Hospital, Faculty of Medicine, University of Bonn,
64 Bonn, Germany
65 ²⁷Department of Psychiatry, University Hospital, Faculty of Medicine, University of Bonn, Bonn,
66 Germany
67 ²⁸Neurosciences and Signaling Group, Institute of Biomedicine (iBiMED), Department of Medical
68 Sciences, University of Aveiro, Aveiro, Portugal
69 ²⁹Max Planck Institute of Psychiatry, 80804 Munich, Germany
70 ³⁰Department of Immunology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical
71 Sciences, Ahvaz, Iran
72 ³¹Center for Systems Neuroscience Hannover, Hannover, 30559, Germany
73 ³²DZPG (German Center for Mental Health), partner site Munich/Augsburg
74 ³³Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Johns Hopkins University School of
75 Medicine, Baltimore, MD, USA
76 ³⁴Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Johns Hopkins University School of
77 Medicine, Baltimore, MD, USA
78 ³⁵correspondence should be addressed to jeremie.poschmann@univ-nantes.fr
79
80 * These authors contributed equally
81 # These authors directed the study
82

83 **Abstract**

84 Micro RNAs (miRNAs) play a crucial role as regulators of various biological processes and have
85 been implicated in the pathogenesis of mental disorders such as schizophrenia and bipolar
86 disorders. In this study, we investigate the expression patterns of miRNAs in the PsyCourse Study
87 (n=1,786), contrasting three broad diagnostic groups: Psychotic (Schizophrenia-spectrum
88 disorders), Affective (Bipolar Disorder I, II and recurrent Depression), and neurotypic healthy
89 individuals. Through comprehensive analyses, including differential miRNA expression, miRNA
90 transcriptome-wide association study (TWAS), and predictive modelling, we identified multiple
91 miRNAs unique to Psychotic and Affective groups as well as shared by both. Furthermore, we
92 performed integrative analysis to identify the target genes of the dysregulated miRNAs and
93 elucidate their potential roles in psychosis. Our findings reveal significant alterations of multiple
94 miRNAs such as miR-584-3p and miR-99b-5p across the studied diagnostic groups, highlighting

95 their role as molecular correlates. Additionally, the miRNA TWAS analysis discovered previously
96 known and novel genetically dysregulated miRNAs confirming the relevance in the etiology of the
97 diagnostic groups. Importantly, novel factors and putative molecular mechanisms underlying
98 these groups were uncovered through the integration of miRNA-target gene interactions. This
99 comprehensive investigation provides valuable insights into the molecular underpinnings of
100 severe mental disorders, shedding light on the complex regulatory networks involving miRNAs.

101

102 **Introduction:**

103 Psychiatric disorders, such as schizophrenia (SCZ), major depressive disorders (MDD), schizo-
104 affective disorder (SCZA) and bipolar disorders (BD), represent a formidable challenge to both
105 clinicians and researchers due to their complex and multifaceted nature. Even though there are
106 different categorical diagnoses in the diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM)¹
107 these conditions often share common symptoms and characteristics. For example, patients with
108 BD often present psychotic symptoms such as delusions and hallucinations, and are often
109 misdiagnosed with a diagnosis from the schizophrenia-spectrum². It is also frequent for patient
110 with SCZ to develop a major depressive episode in the early course of the disease and be
111 misdiagnosed as having BD, SCZA or MDD³⁻⁵. Given that these disorders share several common
112 risk factors⁶⁻⁸ the distinction between MDD with psychotic features and BD can be quite subtle.
113 This is because individuals with MDD who experience psychotic symptoms are at a higher risk of
114 eventually developing BD compared to those who do not experience psychotic symptoms⁹.
115 Understanding the shared environmental and biological risk factors and the underlying molecular
116 mechanisms contributing to these disorders would be helpful for enhancing the diagnosis
117 accuracy, the effectiveness of treatment, and ultimately, for improving the quality-of-life of affected
118 individuals by these conditions. The genetic architecture of categorically defined mental disorders
119 has been increasingly characterized in the past decades. Evidence stems from twin and familial
120 studies^{10,11} and large consortia such as the Psychiatric Genomics Consortium (PCG) which
121 identified and replicated both common and rare genetic variation^{12,13}. For SCZ there are currently,
122 according to the PCG, 270 independent genetic loci associated with this disorder¹³. Similarly for

123 BD 64 independent loci have been previously described to be associated with the disease, as
124 discovered by genome-wide association studies (GWAS)¹².

125 Among the myriad of molecular players implicated in this intricate web of causation, microRNAs
126 (miRNAs) have emerged as key regulators of various biological processes including the immune
127 system that was previously associated with mental disorders^{14–17}. MiRNAs are small non-coding
128 RNA molecules that post-transcriptionally modulate gene expression, and their dysregulation has
129 been increasingly linked to psychiatric disorders^{18,19}. Schizophrenia-spectrum disorders and
130 affective disorders, such as BD and MDD, have been the focus of intensive research efforts to
131 elucidate the role of miRNAs in their pathophysiology and to identify biomarkers which could be
132 predictive of disease state^{20–25}. It is possible that some of the miRNA expression alterations may
133 be partially mediated by genetic variation i.e. expression quantitative trait loci (eQTLs)^{26,27}. An
134 eQTL, is a specific genetic variant or locus in the genome associated with variations in the
135 expression levels of one or more genes. eQTLs are important as they shed light on how genetic
136 variations can impact the regulation of gene expression, contributing to variations in phenotypes,
137 susceptibility to diseases, and potential associations, particularly with psychiatric disorders in this
138 context. Another possible mechanism of phenotypic expression of genotypes is via mRNA-related
139 single nucleotide polymorphisms (miRSNPs), which are genetic variations occurring within
140 miRNA genes or their target sites, potentially affecting miRNA biogenesis and function²⁸. These
141 variations can modulate miRNA–mRNA interactions and have been implicated in the
142 pathogenesis of various diseases, including Schizophrenia²⁹.

143 In this study, we focused on circulating miRNAs within the context of psychiatric disorders,
144 drawing on data from the PsyCourse Study³⁰, which is a transdiagnostic study of more than 450
145 neurotypic individuals and over 1300 participants with major psychiatric disorders such as SCZ,
146 SCZA, recurrent MDD, and BD. In the PsyCourse Study all participants underwent an initial
147 diagnostic evaluation and blood samples were collected to genotype the participants and
148 sequence their smallRNAome. The extensive data collection, deep phenotyping and the study's
149 transdiagnostic approach make it well-suited for the identification of molecular correlates
150 associated with mental disorders. With the aim to identify common molecular mechanisms

151 underlying psychiatric disorders we analyzed miRNA expression patterns across three broad
152 diagnostic groups: Psychotic disorders (encompassing schizophrenia-spectrum disorders),
153 Affective disorders (including BD I and II, as well as MDD), and neurotypic (i.e. healthy)
154 individuals. By employing a comprehensive array of analytical techniques, including differential
155 miRNA expression, miRNA transcriptome-wide association studies (TWAS, and predictive
156 modeling, we identified specific miRNAs that characterize these broad diagnostic groups. Our
157 findings not only underscore significant alterations in multiple miRNAs, revealing common and
158 specific molecular pathway alterations across the broad diagnostic groups but also highlight their
159 relevance in psychiatric disorders.

160

161 **Methods**

162 **The PsyCourse Study**

163 Data and samples used for these analyses were obtained from the PsyCourse Study, a
164 longitudinal, multisite, observational transdiagnostic study that was conducted at in Germany and
165 Austria within the frameworks of the Clinical Research Group 241 (KFO241 consortium;
166 www.kfo241.de) and the PsyCourse consortium (www.psycourse.de). The study design has been
167 described in detail elsewhere³⁰ (See supplementary method for more details).

168 **Genotyping and imputation**

169 Individuals were genotyped using samples from the PsyCourse Study. After quality control and
170 SNPs imputation (see supplementary methods) the dataset contained 1600 individuals and
171 7,712,287 SNPs.

172 **miRNA transcriptome**

173 SmallRNAs sequencing and alignment to human genome of the PsyCourse Study has been
174 described previously²⁵

175 QC were realized using FastQC v0.12.1 and miRTrace v1.0.0³¹. Samples that generated
176 warnings when analysed by miRTrace were removed from further analysis. Then, we filtered the

177 miRNAs to keep only those with 5 or more reads on at least half the samples as being expressed.
178 Leaving a total of 495 expressed miRNA and 1476 samples.

179 For validation purposes, we performed transcriptomics on 43 PBMC samples (11 affective, 14
180 Psychotic, 18 controls) collected from recent recruitment of the PsyCourse Study. Assay was
181 carried out as in³².

182 **DGE and TWAS analysis**

183 For our DGE analysis, we divided the samples in two discovery (N=456) and validation (N=1020)
184 sets. the DESeq2 R package was used to identify DE miRNAs between broad diagnosis groups
185 including a “Control” group (neurotypic), the “Affective” group (Type I or Type II BD and MDD),
186 and the “Psychotic” group (SCZ and SCZA).

187 For the TWAS analysis, we used samples for which we had miRNAome and genotype data to
188 realize a discovery (N=402) and a validation TWAS (N=926) using the FUSION software and
189 GWAS summary data of SCZ¹³ and BD¹² downloaded on the PGC consortium. To enhance
190 statistical power and improve expression prediction accuracy, we combined miRNA expression
191 data from both psychotic and affective disorder groups in our TWAS analysis, following the
192 approach of Gusev et al²⁶.

193 For both analyses, we corrected for age, sex, and sequencing batch, we filtered the TWAS models
194 for miRNA with a significant heritability ($p \leq 0.05$) in at least one of the samples, and we defined
195 statistically significant miRNAs as those with $Q\text{-value} \leq 0.05$ and a similar TWAS z-score or a
196 similar log₂ fold change.

197 The TWAS analysis was realized using R3.6.2. All other analysis involving R were performed
198 using R4.2.3.

199 **miRSNP Analysis**

200 To investigate the impact of genetic variations on miRNA–mRNA interactions, we utilized the
201 PolymiRTS Database 3.0²⁸. This database allowed us to identify miRSNPs within the target sites
202 of the significant miRNAs identified in our study.

203 **Machine Learning**

204 NN models were created using the tidymodels (v1.1.1) R packages using miRNAs reads count,
205 age, sex as predicate and broad group as categorical outcome. Supplementary methods for more
206 details.

207 **Result integration**

208 mirDIP was used to obtain high confidence target of the miRNAs. We filtered those target genes
209 to keep only those expressed in whole blood and brain (according to GTEx on 07/2023) and that
210 were targeted by miRNAs identified in at least 2 analyses. We categorised those genes in 3 lists
211 (AFF-specific, PSY-specific, common) according to the analysis in which the miRNA targeting
212 them were identified. Those lists were used as foreground by topGO to identify GO that we
213 clustered using the simplifyEnrichment package (more details in the supplementary methods).

214

215

216 PPI data was obtained from the STRING-database (v12.0) with a confidence score of 0.7. A
217 network was created from all genes contained in the 20 most significant GO. Disconnected nodes
218 were removed from the data. *Igraph* package (v1.5.1) was used to create the PPI for each
219 broadgroup.

220 The most targeted genes (Figure 4L) were obtained by counting the number of miRNAs targeting
221 each gene.

222 **Gene expression validation**

223 We used PBMC transcriptomic data of the PsyCourse Study and asked for post-mortem brain
224 transcriptomic data mRNA from Dorsolateral prefrontal cortex (release 4) and Anterior Cingulate
225 Cortex (release 6) regions to the CommonMind consortium³³. For each dataset, we computed
226 score of expression of each GO cluster of each individual as the mean of the Z-scores of the

227 genes that compose the GO. We used student tests to compare the scores across the different
228 broad diagnostic groups.

229

230 **Results**

231 **Differential miRNA expression across broad diagnostics** 232 **groups**

233 In this study, we aimed to investigate the miRNAome obtained from blood in psychiatric patients
234 and neurotypic individuals. To attain this goal, we stratified the patients following the diagnostic
235 criteria outlined in the DSM-IV, thus forming two broad classes. The initial broad diagnostic group,
236 herein referred to as the “Psychotic” group (PSY, N=545), encompassed patients clinically
237 diagnosed with SCZ or SCZA, as defined by the DSM-IV¹. The other category, the “Affective”
238 group (AFF, N=595), encompassed individuals diagnosed with type-I and type-II BD, or recurrent
239 MDD, as per the diagnostic guidelines outlined in the DSM-IV. These conditions fall under the
240 umbrella of affective disorders. The rationale behind this grouping stems from the shared
241 classification of these conditions as part of the broader schizophrenia spectrum disorders, given
242 their commonalities in core symptomatology. For comparison and to establish a baseline,
243 neurotypic individuals (CTL, N=339) were included as the control group (Table 1). By employing
244 this grouping strategy, our aim was to elucidate molecular signatures and pathways that could
245 underlie psychiatric disorders characterized by distinct (i.e., PSY or AFF) and shared symptoms
246 (common in both). We profiled the miRNA transcriptome across those groups, refining the dataset
247 to 495 expressed miRNAs after excluding low-quality and minimally expressed miRNAs, in 1,476
248 subjects (see Methods, Table I). The number of detected miRNAs was comparable to a previous
249 study that employed also a next generation sequencing (NGS) based quantification³⁴ and to
250 studies using a quantitative RT PCR approach covering all known miRNAs^{35,36}. To our knowledge,
251 with this sample size, our study represents the most comprehensive psychiatric miRNA
252 expression analysis conducted to date^{37,38}.

253 To access miRNA expression variation across the diagnostic groups, we conducted principal
254 component analysis (PCA) (Figure 1A). The first principal component (PC) revealed an
255 association with diagnosis (Wilcoxon rank-sum test p -value=2.2e-16), since CTL and PSY
256 displayed distinct distributions, while the AFF showed an overlap with both. To mitigate potential
257 confounding factors like age, sex, and technical variances from batch effects, we performed
258 additional analyses (Supplementary Figure S1A). Our findings reveal a strong correlation
259 between variance and diagnosis, Global Assessment of Functioning (GAF) scores³⁹, and
260 psychiatric treatment, with age having minimal impact on the observed variation. However, we
261 observed an association between PC1 and sex, prompting us to consider it as a covariate in
262 subsequent analyses. Moreover, we identified a significant link between PC1 and sequencing
263 batch (Supplementary figure S1A). This was likely since in 19 out of 22 sequencing batches, the
264 diagnostic status could not be reliably distinguished from the batch effect, as these batches were
265 prepared separately from control samples (Supplementary Figure S1B). Therefore, to ensure the
266 robustness and reliability of our downstream analyses while minimizing the impact of batch
267 effects, we partitioned the entire dataset into two cohorts. The “discovery” cohort comprised
268 individuals from batches in which CTL individuals were sequenced along with PSY and AFF
269 patients, containing 269 CTL and 187 patients, while the “validation” cohort consisted of 70 CTL
270 and 950 patients that were sequenced separately (Figure 1B). In the subsequent analysis, we
271 always contrasted miRNA expressions consistently present in both the discovery and validation
272 cohorts, aiming to enhance the accuracy of our findings regarding miRNA expression patterns
273 across various diagnostic groups.

274 Next, we carried out differential gene expression (DGE) analysis between each diagnostic group
275 and CTL (see methods). Comparing the PSY group to the CTL group, we identified 125
276 upregulated and 75 downregulated miRNAs at a False Discovery Rate (FDR) threshold (Q -
277 value<0.05). Importantly, these miRNAs displayed significant differences in both the discovery
278 and validation cohorts (Figure 1C, Supplementary Figure 1C). To further validate our findings, we
279 examined whether the shared miRNAs exhibited consistent directional changes between the
280 discovery and validation cohorts (Figure 1D). Next, we compared AFF to CTL and found 34

281 downregulated and 82 upregulated miRNAs which were consistent between the discovery and
282 validation cohorts (Figures 1E and 1F). Interestingly, the overlap of miRNA between PSY and
283 AFF comparisons to CTL was 44.9% (Fisher-exact test, $p\text{-value}=6.4e^{-06}$), while comparison
284 between PSY and AFF revealed only 13 differentially expressed (DE) miRNAs suggesting
285 common molecular alterations associated to both broad diagnostics groups. Notably, miRNA 584-
286 3p and 99b-5p were downregulated in PSY compared to AFF which was also previously reported
287 as downregulated in the blood for patients with SCZ compared to healthy participants in a
288 previous study⁴⁰. Furthermore, leveraging the same small RNA-sequencing dataset, recent
289 research identified miR-99b-5p as a crucial regulator of innate immunity and synaptic plasticity,
290 found to be downregulated in both the blood and brains of patients diagnosed with SCZ²⁵
291 (FIGURE 1G, H).

292 Subsequently, we conducted a comprehensive literature review to ascertain whether the miRNAs
293 identified in this study have been previously documented in relation to psychiatric disorders. For
294 this we used two miRNA-disease association databases^{41,42}, and compiled exhaustive reviews of
295 miRNA associated to psychiatric disorders^{20,21,24,43}. Additionally, we collected references
296 associated with miRNA and either SCZ, BD, or MDD revealing a total of 262 miRNAs reported for
297 psychiatric disorders (Supplementary Table I). We confirmed the existence of 83 miRNAs
298 previously reported associated to psychiatric disorders (Figure 1H, Fisher-exact test, $P\text{-}$
299 $\text{value}=2.2e^{-16}$), indicating that our strategy of discovery and validation was a robust approach to
300 reveal miRNA gene expression changes. Astoundingly, our investigation revealed 108 miRNAs
301 that had not been previously reported in any published psychiatric literature, to the best of our
302 knowledge (Figure 1I, Supplementary Tables II and III).

303 MiRNA TWAS

304 We carried out a miRNA-based TWAS to identify miRNA for which expression dysregulation is
305 associated to genetic risk of SCZ or BD (see Methods). To increase statistical power, we pooled
306 the samples of both broad diagnostic groups and compared them to neurotypic individuals, and
307 associated them separately to SCZ and BD GWAS variants, both diseases which are

308 representative of each of the two broad groups (Table I). Genotyping was carried out and
309 7,712,287 genetic variants were available for downstream analyses after imputation (see
310 Methods). This population was exclusively of Caucasian European descent (Supplementary
311 Figure S2A). To account for the covariates mentioned above, we carefully controlled for age, sex,
312 and batch effects. For the analysis, we utilized the FUSION software²⁶ to compute cis-genetic
313 expression models for miRNAs in both the discovery and validation cohorts. These models
314 enabled us to assess the heritability of each miRNA, indicating whether a specific SNP genetically
315 regulated the expression of that miRNA. We found that in total 218 miRNAs had a valid heritability
316 in at least one of the groups and a heritability $h^2 > 0$ in both groups (Supplementary Table IV,
317 Supplementary Figure S2B). Next we tested these eQTLs for association with SCZ and BD
318 GWAS summary statistics^{12,13}. A portion of the 218 eQTLs could not be linked due to a lack of
319 overlap among the variants in the PsyCourse Study datasets, LD reference panels, and GWAS
320 summary statistics. Consequently, we were able to establish associations with 133 miRNAs for
321 BD and 89 miRNAs for SCZ based on the available GWAS data. In the end, our analysis yielded
322 1 miRNA significant for BD and 8 miRNAs significant for SCZ with TWAS p-values and effect size
323 that remained consistent across both the discovery and validation analyses (Table II, Figure 2B,
324 2C). Finally, we obtained 1 (BD) and 8 (SCZ) miRNAs with a TWAS p-value significant in the
325 discovery and validation analyses (Table II, Figure 2B). It is noteworthy that the effect size
326 consistently exhibited the same direction for these miRNAs (Figure 2C).

327 In general, this TWAS was able to find eQTLs which were in strong LD near 3 GWAS SNPs with
328 genome-wide significance and 17 with significance between 5×10^{-8} and 0.001 (Table II,
329 Supplementary Table VII for R^2 and D'), thus revealing a novel set of candidate miRNA genes
330 associated to SCZ and BP. Of note, we kept -3p and -5p variants of miR-550a as separate miRNA
331 as they were different in terms of expression, best TWAS eQTL, and may target distinct genes
332 (Table II)⁴⁴. We evaluated the eQTL allele frequencies and found no significant differences among
333 the Psychotic, Affective, and Control groups ($p > 0.05$ for all comparisons). This indicates that the
334 allele distributions of the eQTLs are similar across the diagnostic categories (Supplementary
335 Table VI), suggesting that we cannot distinguish eQTLs associated with both PSY and AFF

336 (merged phenotypes) from those specific to either PSY or AFF. Next, we investigated whether
337 these miRNAs had been previously reported by other genetic studies. Indeed, in the SCZ TWAS,
338 miR-4677-3p, and miR-219a-3p had previously been associated with SCZ through
339 GWAS¹³(Table II). For example, the SCZ TWAS linked miR-4677 to the eQTL rs6429422, which
340 exhibited strong linkage disequilibrium (LD) with the SCZ GWAS SNPs rs12138722, rs4658585,
341 and rs4658401 that had a genome wide significant association to SCZ, as previously reported
342 (Figure 2D, Table II)¹³. Interestingly the GWAS reported a genomic locus (located 200kb from
343 those 3 variants) as being associated with the miR-4677 gene.

344 Comparison to the DGE analysis above revealed that 5 out of the 9 miRNAs were also DE,
345 indicating a substantial effect size that further supports their potential causal role in disease
346 etiology (Table II). Interestingly, the DGE analysis revealed that miR-1229-3p identified in the
347 SCZ TWAS was downregulated in the AFF indicating a cross-diagnostic overlap of miRNA
348 dysregulation.

349 Some of the TWAS miRNAs, such as miR-1306-5p and miR-4742-3p, were associated with
350 Autism Spectrum Disorder (ASD) in previous studies⁴⁵⁻⁴⁸. Additionally, miR-550a-5p had been
351 linked to ASD and Alzheimer's disease (AD)⁴⁹. This overlap with other mental and cognitive
352 disorders such as ASD and AD again indicates common underlying molecular dysregulation.

353 Remarkably, all the validated miRNAs were associated with mental disorders in previous non-
354 genetic studies (Table II). For instance, miR-937-3p was also previously associated with BD⁵⁰,
355 and to SCZ with a role in the inhibition of neural development and AMPA receptor-mediated
356 synaptic transmission⁵¹. Among other miRNAs, miR-1306-5p had previously been linked to BD⁵⁰
357 and found to be highly expressed in neurons differentiated from iPS cells⁵². The miRNA 219a-1-
358 3p was upregulated in post-mortem brain of patient with SCZ¹⁸, and 550a-3-5p was upregulated
359 in liver cells after antipsychotic treatments⁵³.

360 In summary, our TWAS analyses unveiled nine genetically controlled miRNAs which exhibit
361 strong LD with GWAS variants, presenting novel candidate causal genes with overlap in other
362 brain disorders.

363 Machine-Learning based classification of broad groups

364 Neural networks (NN), a type of machine learning algorithm enable the identification of miRNAs
365 as predictive markers for disease classification. This approach was used to reveal miRNAs which
366 may be associated with disease state in a non-linear fashion⁵⁴. We note that we did not specifically
367 intend to use this approach for disease prediction. To pinpoint distinctive features separating the
368 patients' groups from CTL (Table I), we divided the samples into training and test sets and
369 assessed the model's performance. Initially, we split both the training and test sets into discovery
370 and validation samples as outlined in Figure 1. However, the model's performance fell short of
371 expectations, likely attributed to the imbalance between patients and controls within the discovery
372 and validation samples, coupled with a smaller training dataset (Supplementary Figure S3A and
373 S3B). To counteract these limitations while safeguarding against batch effects, we ensured an
374 equal split between discovery and validation samples across the training and test sets (Figure
375 3A). We then trained NN models and measured their performances on the test set. The confusion
376 matrix from the test set indicated that the imbalance problem was improved using this strategy
377 (Supplementary Figure S3C). Furthermore, the models' performances were strong for both
378 diagnostic groups as estimated by the Roc-AUC curves (Figure 3C, Accuracy=0.97 for PSY and
379 0.95 for AFF) as well as other performance metrics (Figure 3D). Notably, a Kappa score of 0.84,
380 indicating a robust model with regards to sample imbalance^{55,56}.

381 To confirm that NN were the optimal choice for our classifications, we compared their performance
382 to other common classification models—including Random Forest, K-Nearest Neighbors, Support
383 Vector Machines, and Logistic Regression—using multiple metrics such as accuracy, AUROC,
384 and Cohen's Kappa (Supplementary Figures 3E–F). The NN outperformed the other models
385 across all metrics for both AFF and PSY classifications. Moreover, the NN models exhibited the
386 lowest residuals among all models tested, indicating that they made more accurate predictions
387 (Supplementary Figures 3G–H).

388 To ensure that the NN models did not overfit, we varied the size of the training set and observed
389 the performance on both training and test sets (Supplementary Figure 3I). The performance on
390 the training set remained consistent, while the performance on the test set improved as the

391 training sample size increased. This pattern suggests that our NN models generalized well to
392 unseen data and did not overfit, reinforcing their suitability for our classification tasks.

393 As we achieved robust predictive capabilities in discerning PSY and AFF from CTL subjects in
394 our models, we proceeded to isolate the pertinent features employed in both models (PSY vs CTL
395 and AFF vs CTL), as illustrated in Figure 3E. Among the 20 miRNAs with the highest importance,
396 6 were shared between the 2 models (Figure 3E). Interestingly, for the PSY classification, 10
397 miRNAs were also found in the DGE analysis. In the AFF classification 10 miRNAs were also DE.
398 Nevertheless 6 out of 20 features were not found in the DGE or TWAS analysis indicating that
399 non-linear relationships may further contribute to the identification of disease associated miRNA
400 expression⁵⁴. Interestingly, in both classifications the top feature (mir-223) has been previously
401 described to be altered in the plasma of first episode SCZ patients⁵⁷. Moreover, plasma levels of
402 miR-233 were able to predict the efficacy of electroconvulsive therapy in treatment-resistant
403 patients suffering from MDD²² (Figure 3F). Hence, although half of the identified miRNAs were
404 previously documented or identified through our DGE analysis, we unearthed 20 novel miRNAs,
405 likely owing to non-linear associations. This alternative method employing ML, specifically NN,
406 proves to be a valuable and complementary approach for unveiling potential miRNAs linked to
407 the disease state.

408 Integrative analysis of miRNA alterations by combined target 409 analysis

410 Next, we performed an integrative analysis by combining the miRNA alterations across broad
411 groups and investigated the molecular pathways of the miRNA target genes. The integration of
412 miRNA data was carried out by combining miRNA identified from DGE, TWAS, and NN (Figure
413 4A). For this we identified the high confidence target genes using miRDIP⁴⁴. To ensure biological
414 relevance, only genes expressed either in blood or brain tissues were included in our subsequent
415 analyses²⁷. To further increase the robustness only genes discovered in at least two distinct
416 analyses were then subjected to downstream analysis (Supplementary Figure S4A). We identified
417 1268 target-genes common between PSY and AFF, 1207 PSY-specific and 578 AFF-specific
418 (Supplementary Figure S4). These genes were then separately analyzed by gene ontology (GO)

419 to identify GO which are common or distinct between the broad diagnostic groups. For each
420 condition all GOs significantly enriched (Q-values<0.05) were clustered together, revealing 8
421 distinct GO groups which were notably related to processes of transcription and RNA metabolism,
422 anatomical structure development or cell signaling and regulation (Figure 4C-E). Of note there
423 were also 5 unique GO which did not cluster in a specific GO group.

424 This comprehensive GO analysis revealed significant insights into the molecular underpinnings
425 of affective and psychotic disorders. Notably, the largest cluster predominantly encompassed
426 genes involved in transcriptional regulation and translation (light-green Figure 4C-E).
427 Interestingly, these genes were present in both the “common” gene pool as well as those specific
428 to AFF and PSY. This suggests a shared foundation of pathophysiological alterations across both
429 diagnostic categories, relevant early in embryonic development. The prominence of gene
430 regulatory mechanisms within these common targets implicates the activation of compensatory
431 cellular responses in patients, potentially as an adaptive mechanism to counteract genetic
432 aberrations that may lead to developmental anomalies⁵⁸.

433 To address the relevance of the identified GO clusters, we integrated gene expression data from
434 individuals with BD (47 patients) and SCZ (257 patients) and Controls (284), i.e. representative
435 disease for affective and psychosis, sourced from the anterior cingulate cortex (ACC) and
436 dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC), within the CommonMind Brain Project. This was
437 paralleled by RNA sequencing of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the
438 PsyCourse Study participants, re-contacted for this study (11 AFF, 14 PSY, 18 CTL), facilitating
439 a comprehensive examination of target gene expression across both brain and blood in healthy
440 individuals, as well as those with psychotic or affective disorders.

441 To investigate whether miRNA-regulated gene networks differ between PSY and AFF
442 disorders, we performed gene set enrichment analysis (GSEA) on the target genes of
443 each miRNA identified. Specifically, we focused on the top three enriched gene sets
444 derived from PSY-specific miRNAs. Using gene expression datasets comparing SCZ to
445 controls and BD, we found that the target genes of PSY-specific miRNAs exhibited high

446 normalized enrichment scores (NES) in all three datasets (Figure 4F). In contrast, these
447 genes showed consistently lower NES in the corresponding BD gene expression data.
448 Next, we investigated whether the differential regulation observed for specific miRNAs
449 was consistent across the most prominent miRNAs in each broad group. To do this, we
450 compared the absolute NES for the top 20 PSY-specific and AFF-specific miRNAs in
451 each dataset (DLPFC, ACC, and BLOOD) (Figure 4G). Our analysis revealed that PSY-
452 specific miRNAs consistently displayed higher absolute NES values in PSY analyses,
453 while AFF-specific miRNAs demonstrated stronger enrichment in AFF analyses. This
454 pattern was mostly consistent across the datasets. However, AFF miRNAs in the ACC
455 dataset showed less consistent enrichment, indicating potential region-specific variation
456 in miRNA regulation. These findings highlight the differential roles of miRNA-regulated
457 gene networks between psychotic and affective disorders, emphasizing the importance
458 of considering regional brain variations in miRNA regulation. To determine the presence of
459 altered GO in these groups, we calculated expression scores for target genes, subsequently
460 comparing these scores across the groups using Student T-tests (Figure 4H, $Q\text{-value} < 0.05$). Our
461 findings revealed significant variations in gene expression scores across the tissues examined,
462 for both affective and psychotic disorders. Crucially, our analysis indicated that GO associated
463 with affective disorders were substantially different from those related to psychotic disorders,
464 occurring across various tissues. To further explore these findings, we took advantage of the
465 matched blood samples to integrate miRNA expression with target gene expression through
466 correlation analysis. Specifically, we focused on the relationships between significantly
467 differentially expressed miRNAs and their target genes involved in stress response and lipid
468 metabolism, as these pathways were notably altered in the blood samples. The significant
469 interactions between miRNAs and their target genes are illustrated in the alluvial plots (Figure 4I,
470 left panels). Correlation analyses across PSY, AFF, and CTL groups revealed significant
471 alterations in the expected anticorrelation patterns between miRNAs and their target
472 genes in the PSY and AFF samples (Figure 4I, right panels). Notably, the correlations in

473 PSY and AFF groups were also distinctly different in most cases, suggesting disease-
474 specific regulatory variations between these disorders. In contrast, CTL samples
475 exhibited minimal correlation, indicating a lack of substantial miRNA-mRNA regulatory
476 activity under non-disease conditions. These findings underscore the distinct
477 dysregulation of miRNA-mRNA interactions in stress response and lipid metabolism
478 pathways in psychotic and affective disorders.

479 Our findings revealed significant variations in gene expression scores across the tissues
480 examined, for both affective and psychotic disorders. Crucially, our analysis indicated that GO
481 associated with affective disorders were substantially different from those related to psychotic
482 disorders, occurring across various tissues. This distinction underlines the divergent molecular
483 pathways of each disorder category, suggesting a fundamental genetic and molecular divergence
484 between affective and psychotic conditions.

485 To further elucidate the functional implications of these GO results, we embarked on protein-
486 protein interaction (PPI) network analysis. This analysis aimed to uncover the intricate
487 relationships between miRNA targets at the protein level, thereby shedding light on their roles in
488 essential biological processes. Initially, our focus was on anatomical differentiation, a domain
489 found to be significantly enriched for genes targeted in psychotic disorders, as depicted in Figure
490 D. Remarkably, the resulting PPI networks unveiled robust interaction networks, highlighting the
491 interconnectedness of these target genes (Figure 4J). A notable observation was the
492 predominance of transcription factors within these clusters, marked as squares (42 out of 161
493 nodes, 26%), underscoring the regulatory significance of this gene group. Intriguingly, this cluster
494 was unique to genes commonly or specifically associated with psychosis (denoted by red and
495 blue colors). Differential expression was prominently marked (green outline), revealing a
496 substantial proportion (149 out of 175 genes) of these genes as DE.

497 Parallely, a PPI were generated for the GO term "stress response" which, was predominantly
498 enriched for genes associated with affective disorders (Figure 4K). This distinction underscores
499 a predisposition towards affective traits within this cluster. Again, a significant presence of

500 transcription factors was noted (16 out of 44, 36%), highlighting their pivotal role. This group also
501 exhibited a marked enrichment for DE genes (30 out of 49), likely a consequence of miRNA
502 modifications. These analyses underscore the distinct and specific molecular alterations
503 associated with affective and psychotic disorders driven by miRNAs.

504 Next, we investigated whether miRSNPs are possible contributors to expression variation. To
505 achieve this, we used the PolymiRTS Database 3.0 and found a total of 222 miRSNPs associated
506 with 121 target genes identified in our study. Specifically, we found 12 miRSNPs related to
507 'affective' target genes, 45 miRSNPs associated with 'psychotic' target genes, and 64 miRSNPs
508 linked to 'intersect' target genes (Supplemental Table IX). These miRSNPs may influence the
509 binding efficiency of miRNAs to their targets, potentially contributing to gene expression
510 dysregulation observed in psychiatric disorders.

511 Finally, we embarked on a specialized analysis aimed at pinpointing genes most susceptible to
512 miRNA-mediated regulation. As multiple distinct miRNAs can converge on a single gene target,
513 our analysis sought to uncover genes at the highest risk of miRNA-induced perturbation. By
514 systematically ranking genes based on the quantity of miRNAs targeting them, we unearthed
515 putative disease genes, i.e. genes which are very likely to be perturbed and thus are associated
516 to disease causality. Remarkably, the QKI gene emerged as a prime candidate, being targeted
517 by miRNAs an extraordinary 46 times, suggesting an elevated likelihood of functional disruption.
518 To investigate these findings, we meticulously examined the top 10 genes with the highest miRNA
519 targeting frequency, as illustrated in Figure 4L. This exploration extended to identifying the
520 specific miRNAs involved and their origins—whether they are associated with affective disorders,
521 psychosis, or are common to both. Gene expression analysis in the two brain regions confirms
522 differential expression in 7 out of 10 genes mostly in the DLFP region, whereas none of the genes
523 were DE in blood, indicating regional differences (Figure 4M). Subsequent literature reviews of
524 these genes (Supplementary Table X) unveiled a compelling narrative: most of these genes have
525 established links to psychiatric disorders and developmental processes. For instance, the gene
526 QKI, has been recently implicated in the maturation of astrocytes within the brain—a process
527 integral to the pathophysiology of both affective and psychotic disorders⁵⁹. This finding not only

528 underscores the relevance of these genes in psychiatric conditions but also posits them as highly
529 probable candidate genes. The alteration of these genes through miRNA perturbation is likely to
530 have consequential impacts on disease manifestation and progression. Here we reveal a
531 nuanced layer of genetic regulation within psychiatric disorders, highlighting genes that, due to
532 their high frequency of miRNA targeting, may play pivotal roles in disease aetiology. This insight
533 not only enriches our understanding of the molecular intricacies of psychiatric conditions but also
534 paves the way for future investigations into the therapeutic potential of modulating miRNA-gene
535 interactions.

536 Discussion

537 In our study, we examine the role of miRNAs in gene regulation and their impact on psychiatric
538 disorders, extending the current understanding of their significance. Unlike previous research, we
539 grouped psychiatric conditions into broader diagnostic categories. This approach revealed
540 significant differences and shared miRNA deregulation mechanisms across these categories. Our
541 molecular analysis indicates that such alterations are likely corresponding to cross-diagnostic
542 phenotypic and behavioral similarities among disease categories. Consequently, our results are
543 in line with existing literature but also provide new insights into the molecular mechanisms
544 involved.

545 Notably we confirmed previously described miRNAs but more importantly revealed 108 novel
546 miRNAs, opening new research avenues into the molecular basis of these conditions. The
547 grouping strategy has likely enhanced our ability to detect these additional miRNAs, which may
548 have been missed in more narrowly focused studies. Moreover, our investigation into the effects
549 of diagnostic, demographic, and technical factors (age, sex, and batch effects) on miRNA
550 expression highlighted the importance of controlling for these variables. Additionally, by
551 partitioning our dataset into discovery and validation samples, we solidified the results of our
552 analysis. The novel miRNAs identified represent a significant step forward in understanding the
553 biological processes underlying psychiatric disorders and could potentially serve as predictors of
554 disease progression.

555 The TWAS results contribute further to the genetic foundation underlying psychiatric conditions.
556 By merging samples from both broad diagnostic groups, we increased our total sample
557 size, enabling us to identify nine miRNAs significantly associated with psychiatric
558 disorders. This approach confirmed a complex interplay between disease-associated genetic
559 variation and miRNA expression. The identification of these miRNAs influenced by genetic
560 factors, unveils new candidate causal genes for psychiatric disorders and sheds light on both
561 shared and unique molecular pathways across different conditions. The rationale is that these
562 miRNAs are possibly acting as a molecular bridge, connecting genetic variation to the disease
563 state by modulating gene expression. To our knowledge this is the first miRNA TWAS in the field
564 of psychiatric disorders, marking a milestone in our understanding of these disorders. We also
565 explored the role of miRSNPs in gene regulation and identified 222 miRSNPs within our target
566 genes. These findings underscore the potential significance of miRSNPs in the molecular
567 mechanisms underlying psychiatric disorders. By affecting miRNA–mRNA interactions, miRSNPs
568 may contribute to the dysregulation of gene expression in genes implicated in affective and
569 psychotic disorders. This highlights the importance of considering genetic variations in miRNA
570 target sites when exploring the etiology of these diseases. In our study, we used NN to uncover
571 non-linear relationships between disease states and miRNA expression, thereby identifying
572 additional miRNAs. Due to absence of independent patient samples necessary for the validation
573 of such predictive models herein we did not embark on the predictive nature of the miRNA
574 discovered. However, future research in this direction could provide significant insights into the
575 diagnostic and prognostic potential of miRNAs in psychiatric disorders.

576 As a pivotal outcome of our grouping strategy, we undertook an exhaustive analysis, merging
577 DGE, TWAS, and NN to identify broad group “common” and “distinct” miRNA target genes. These
578 genes underwent rigorous scrutiny through GO analysis, illuminating the intricate molecular
579 pathways implicated in psychiatric disorders. Our findings revealed common and distinct
580 molecular pathways, highlighting both shared and unique processes across PSY and AFF.

581 Further validation of these insights, including the GO findings, was facilitated by transcriptomic
582 analyses of brain and blood samples, augmented by PPI network validation. For example, GO
583 terms related to anatomical development were significantly enriched in the PSY group, echoing
584 neuroimaging studies that suggest structural brain differences indicative of divergent
585 pathophysiological processes in SCZ and BD⁶⁰. Conversely, the AFF group showed a marked
586 enrichment for GO terms associated with stress response, a finding consistent with previous
587 observations in BD patients^{61,62}. Notably, the cellular response to stress, including the response
588 to dexamethasone, emerged as a potential signature, previously explored in the context of
589 depression with psychotic features^{63,64}.

590 The susceptibility of certain target genes to regulation by multiple, distinct miRNAs presents a
591 compelling argument for their consideration as candidate disease genes within psychiatric
592 disorders. Our study's systematic identification of such target genes, such as QKI, which are
593 targeted extensively by miRNAs, highlights their potential importance in the molecular
594 architecture of these conditions. The extraordinary targeting of these genes suggests a
595 heightened likelihood of their involvement in disease-related functional disruptions. This is
596 illustrated by QKI, which is implicated in crucial processes such as astrocyte maturation and thus
597 could be intricately linked to the development and progression of psychiatric disorders^{65,66}. The
598 premise that genes heavily targeted by miRNAs are likely to be disease-modifying is grounded in
599 the understanding of miRNAs as fine-tuners of gene expression. Given their capacity to influence
600 a wide array of pathways, the alteration in expression of these target genes could lead to
601 significant phenotypic effects, potentially contributing to the aetiology of psychiatric conditions.
602 Therefore, the identification of such genes in our study not only enriches the catalogue of potential
603 biomarkers for these disorders but also offers a novel perspective on identifying therapeutic
604 targets. By targeting the miRNA-gene interactions that influence these candidate disease genes,
605 future therapeutic interventions could be designed with greater precision, aiming to rectify the
606 underlying genetic perturbations that contribute to psychiatric disorders.

607 **Limitations and Future Directions**

608 Our study is subject to certain limitations, one being the predominantly European demographic
609 composition of our samples. To enhance the applicability and relevance of our findings across
610 different populations, future studies should incorporate more ethnically and geographically
611 diverse cohorts. Moreover, delving into the functional implications of newly identified miRNAs and
612 their corresponding target genes in the context of psychiatric conditions is essential for bridging
613 the gap between these molecular discoveries and their clinical and therapeutic utilities and issues.
614 For example, we did not extensively examine the specific perturbations in candidate genes, such
615 as QKI and other highly regulated target genes. A notable gap in our research is the lack of
616 investigation into the predictive power of miRNA combinations in identifying disease states,
617 primarily hindered by the absence of independent validation cohorts. This represents a crucial
618 area for future research to explore, as it could significantly advance the field of psychiatric
619 genomics. Addressing this limitation in subsequent research could provide deeper insights into
620 the molecular mechanisms driving psychiatric disorders and identify potential targets for
621 intervention.

622

623 **Author contribution**

624 TGS and PF designed the PsyCourse Study. KA, MB, PF, MH, UH, JLK, MOK, SP, DRE, SKS,
625 ECS, TGS, FS, TV, IGA, VA, BTB, UD, DED, AJF, CF, MJ, GJ, CK, JR, EZR, MS, CS, JW, and
626 JZ contributed to acquisition and/or processing and/or managing of data (phenotype data and/or
627 biological data). LK coordinated the RNA isolation and small-RNA-seq of the entire PsyCourse
628 samples with the help of SB and ALS. DMK and TP contributed to the sequencing design and
629 performed QC analysis. FS and AF planned the sequencing experiments. AS supervised JBG
630 and contributed to manuscript editing. SP carried out the quality control of the genotyping and
631 imputation. PS performed bioinformatics analysis including alignment, DGE, and TWAS
632 analysis. JBG performed ML and graph analysis. PS and JBG generated the figures. JP, UH,
633 and MB designed the study. JP oversaw the bioinformatics analysis and validation experiments.
634 PS, JP, and JBG wrote the article with contribution from SB, AF, TS and UH.

635 All authors contributed to revising and approving the final version of the manuscript.

636

637 **Acknowledgments**

638 This work is part of the MulioBio project funded by a NEURON-ERANET grant (JTC2019) and
639 Pierre Solomon thesis co-funded by the region Pays de la Loire, France (order n°
640 2020_10085). We are most grateful to the Genomics Core Facility GenoA, member of
641 Biogenouest and France Genomique and to the Bioinformatics Core Facility BiRD, member of
642 Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) for the use of
643 their resources and their technical support. Andre Fischer was supported by the DFG (*Deutsche*
644 *Forschungsgemeinschaft*) project 514201724 (FI-981-18), research group KFO241/PsyCourse
645 Fi981-4 and Fi981 11-1, DFG Project priority program 1738, SFB1286 and GRK2824, the BMBF
646 via the *Intergrament project (01ZX1314D)*, the ERA-NET Neuron project EPINEURODEVO, the
647 EU Joint Programme- Neurodegenerative Diseases (JPND) – EPI-3E, Germany's Excellence
648 Strategy - TGS and PF are supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within
649 the framework of the projects www.kfo241.de and www.PsyCourse.de (SCHU 1603/4-1, 5-1, 7-
650 1; FA241/16-1). TGS is further supported by the Dr. Lisa Oehler Foundation (Kassel, Germany),
651 IntegraMent (01ZX1614K), BipoLife (01EE1404H), e:Med Program (01ZX1614K), GEPI-BIOPSY
652 (01EW2005), MulioBio (01EW2009). This work was endorsed by German Center for Mental
653 Health (DZPG; to PF and TGS, FKZ: 01EE2303A, 01EE2303F). Urs Heilbronner was supported
654 by European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (PSY-PGx, grant
655 agreement No 945151) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research
656 Foundation, project number 514201724).EXC 2067/1 390729940. FS was supported by the
657 GoBIO project miRassay from the BMBF.

658 The Genotype-Tissue Expression Project was supported by the Common Fund of the Office of
659 the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and
660 NINDS.

661 Adorjan Kristina, Budde Monika, Falkai Peter, Heilbronner Maria, Heilbronner Urs, Kalman
662 Janos L., Oraki Kohshour Mojtaba; Papiol Sergi, Reich-Erkelenz Daniela, Schaupp Sabrina K.,
663 Schulte Eva C., Schulze Thomas G., Senner Fanny, and Vogl Thomas are part of the
664 PsyCourse core team.

665 Anghelescu Ion-George Arolt Volker, Baune Bernhardt T., Dannlowski Udo, Dietrich Detlef E.,
666 Fallgatter Andreas J. , Figge Christian, Jäger Markus, Juckel Georg, Konrad Carsten, Reimer
667 Jens, Reininghaus Eva Z., Schmauß Max, Spitzer Carsten, Wiltfang Jens, and Zimmermann
668 Jörg represent the clinical centers involved in the recruitment and samples collection of the
669 PsyCourse study.

670 We would like to express our profound gratitude to all study participants without whom this work
671 would not have been possible.

672 **Conflict of interest statement**

673 Two co-authors provide the following financial interest and personal relationships which may be
674 considered as potential competing interests:

675 JW, that organized the PsyCourse recruitment at the Göttingen university medical center,
676 receives consulting fees from Immunogenetics, Noselab, Roboscreen, is member of advisory
677 boards of Abbott, Biogen, Boehringer Ingelheim, Lilly, MSD SHARP DOHME, Roche; received
678 payment for lectures from Beeijing Yibai Science and Technology Ltd., Gloryren, Janssen Cilag,
679 Pfizer, Med Update GmbH, Roche Pharma, Lilly and holds patents PCT/EP 2011 001724 and
680 PCT/EP 2015 052945.

681 PF has been EPA president in 2022 and is a co-editor of the German (DGPPN) schizophrenia
682 treatment guidelines and a co-author of the WFSBP schizophrenia treatment guidelines; he is
683 on the advisory boards and receives speaker fees from Janssen, Lundbeck, Otsuka, Servier
684 and Richter.

685 Table I: Description of the population

686 Table IA: Samples used for the DGE and ML analysis

	Affective (N=302)	Control (N=339)	Psychotic (N=542)	P-value
Sex				
F	302 (50.8%)	205 (60.5%)	218 (40.2%)	<0.001
M	293 (49.2%)	134 (39.5%)	324 (59.8%)	
Age				
Mean (SD)	44.8 (13.4)	37.2 (15.6)	40.7 (12.1)	<0.001
Median [Min, Max]	46.0 [18, 86]	31.0 [18, 77]	41.0 [18, 73]	
Diagnosis				
Bipolar-I Disorder	401 (67.4%)	0 (0%)	0 (0%)	<0.001
Bipolar-II Disorder	99 (16.6%)	0 (0%)	0 (0%)	
Control	0 (0%)	339 (100%)	0 (0%)	
Depression	95 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	
Schizoaffective Disorder	0 (0%)	0 (0%)	93 (17.2%)	
Schizophrenia	0 (0%)	0 (0%)	449 (82.8%)	
Duration of Illness (year)				
Mean (SD)	12.0 (11.0)	NA (NA)	13.0 (10.3)	0.132
Median [Min, Max]	9.00 [0, 53.0]	NA [NA, NA]	11.0 [0, 52.0]	
GAF				
Mean (SD)	60.4 (13.0)	87.5 (7.17)	52.3 (13.4)	<0.001
Median [Min, Max]	600 [20.0, 97.0]	88.0 [62.0, 100]	52.0 [4.00, 90.0]	
PANSS				
Mean (SD)	44.0 (11.9)	32.9 (5.13)	60.4 (20.1)	0.001
Median [Min, Max]	42.0 [30.0, 102]	30.0 [30.0, 63.0]	58.0 [30.0, 141]	
YMRS				
Mean (SD)	3.67 (5.91)	1.25 (2.34)	2.68 (4.41)	<0.001
Median [Min, Max]	1.00 [0, 39.0]	0 [0, 15.0]	1.00 [0, 32.0]	
IDSC				
Mean (SD)	15.4 (12.9)	2.80 (2.94)	12.7 (10.6)	<0.001
Median [Min, Max]	12.0 [0, 63.0]	2.00 [0,18.0]	10.0 [0, 51.0]	

687

688 Table IB: Samples used for the TWAS analysis

	Affective (N=550)	Control (N=299)	Psychotic (N=479)	P-value
Sex				
F	278 (50.5%)	183 (61.2%)	191 (39.9%)	<0.001
M	272 (49.5%)	116 (38.8%)	288 (60.1%)	
Age				
Mean (SD)	45.0 (13.4)	37.9 (15.8)	41.0 (12.1)	0.001
Median [Min, Max]	47.0 [18, 86]	32.0 [18, 77]	42.0 [18, 73]	
Diagnosis				
Bipolar-I Disorder	368 (66.9%)	0 (0%)	0 (0%)	<0.001
Bipolar-II Disorder	92 (16.7%)	0 (0%)	0 (0%)	
Control	0 (0%)	299 (100%)	0 (0%)	
Depression	90 (16.4%)	0 (0%)	0 (0%)	
Schizoaffective Disorder	0 (0%)	0 (0%)	85 (17.7%)	
Schizophrenia	0 (0%)	0 (0%)	394 (82.3%)	
Duration of Illness (year)				
Mean (SD)	11.9 (11.0)	NA (NA)	13.5 (10.4)	0.023
Median [Min, Max]	9.00 [0, 53.0]	NA [NA, NA]	12.0 [0, 52.0]	
GAF				
Mean (SD)	60.5 (13.0)	87.7 (7.21)	53.0 (13.3)	<0.001
Median [Min, Max]	60.0 [20.0, 97.0]	89.0 [62.0, 100]	52.0 [4.00, 90.0]	
PANSS				
Mean (SD)	43.9 (12.0)	33.0 (5.29)	59.6 (20.1)	0.001
Median [Min, Max]	41.0 [30.0, 102]	30.0 [30.0, 63.0]	56.0 [30.0, 141]	
YMRS				
Mean (SD)	3.63 (5.79)	1.30 (2.42)	2.62 (4.38)	<0.001
Median [Min, Max]	1.00 [0, 36.0]	0 [0, 15.0]	1.00 [0, 32.0]	
IDSC				
Mean (SD)	15.2 (12.9)	2.74 (2.96)	12.6 (10.7)	<0.001
Median [Min, Max]	12.0 [0, 63.0]	2.00 [0, 18.0]	10.0 [0, 51.0]	

690 **Table II: Summary of the TWAS results**

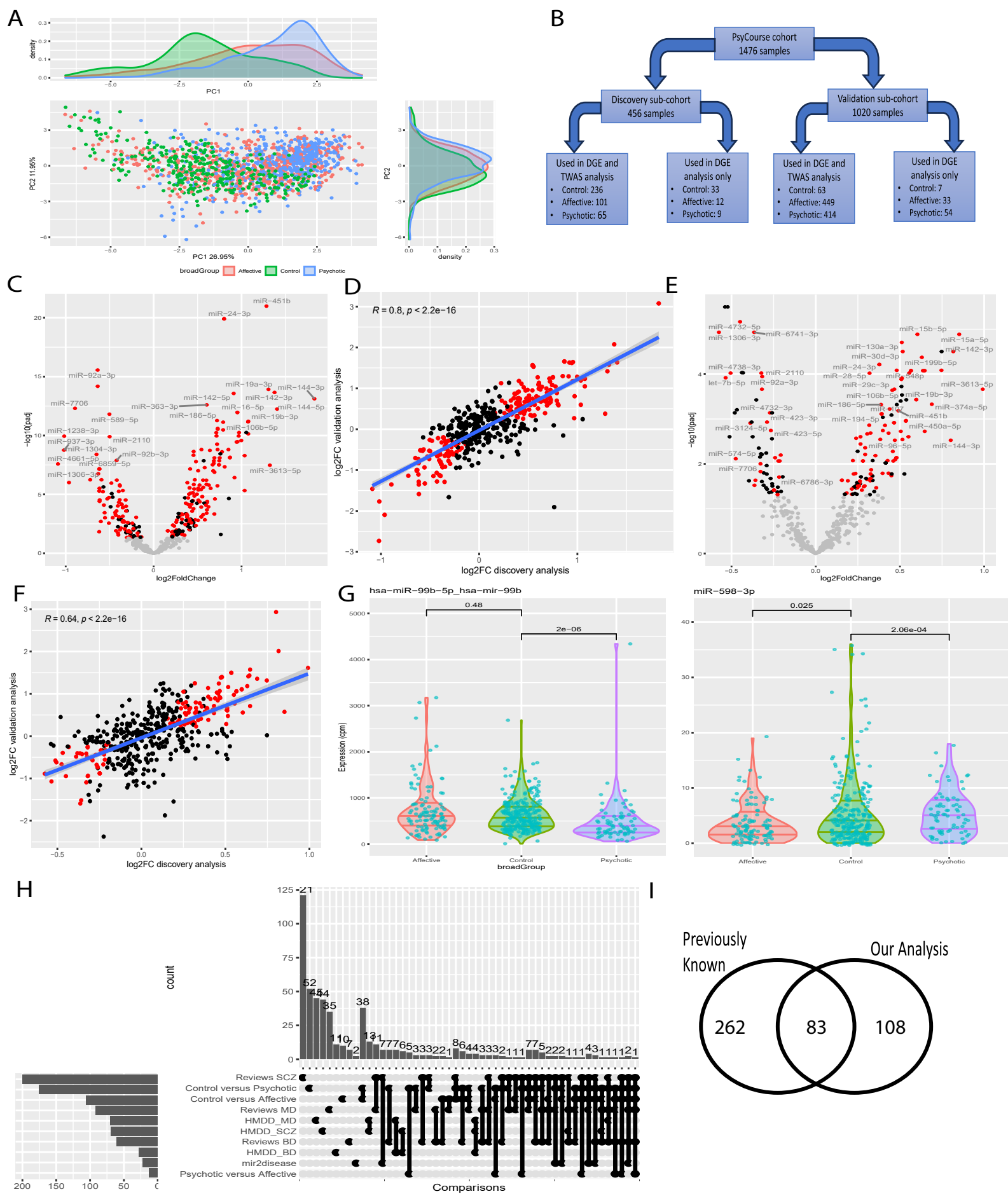
691 Available on the online version only

692 **Figure 1: miRNA dysregulation between broad diagnosis**
693 **groups**

- 694 A) Principal Component Analysis of all individuals in the study and density plots of the PC1
695 and PC2. The colors represent the 3 broad groups (green: control; red: affective; blue;
696 psychotic)
- 697 B) Flowchart describing the samples division in the two discovery and validation samples
698 and the three broad diseases groups that were used for the TWAS and DGE analysis.
- 699 C) Volcano plot representing the adjusted p-value and log₂ fold change of the DGE
700 analysis between the control and psychotic groups in the discovery samples. Colors
701 indicates if the miRNA were found dysregulated (grey: NS, black: dysregulated in the
702 discovery samples but not validated; red: validated)
- 703 D) Scatter plot representing the log₂ fold change in the discovery (x axis) and validation (y
704 axis) analysis comparing the control and the psychotic groups. The miRNAs in red are
705 the one whose dysregulation was validated.
- 706 E) Volcano plot representing the adjusted p-value and log₂ fold change of the DGE
707 analysis between the control and affective groups in the discovery samples. Colors
708 indicates if the miRNA were found dysregulated (grey: NS, black: dysregulated in the
709 discovery sample but not validated; red: validated)
- 710 F) Scatter plot representing the log₂ fold change in the discovery (x axis) and validation (y
711 axis) analysis comparing the control and the affective groups. The miRNAs in red are the
712 one whose dysregulation was validated.
- 713 G) Boxplots of miRNAs expression (CPM) in the 3 broad groups. Comparisons were made
714 using an unpaired Wilcoxon test.
- 715 H) Upset plot representing the overlap between the miRNA we identified, and the ones
716 associated to SCZ, BD, or MD by previous studies.
- 717 I) Venn diagram representing the overlap between the miRNA we identified and those
718 previously identified in other papers.
- 719 J) Boxplot of the 10 genes the most targeted by the identified miRNAs in the ACC and
720 DLPC data of the CommonMind consortium

721

722



723

Figure 2: miRNA TWAS

724

A) Graph representing the strategie of the TWAS analysis.

725

B) Manhattan plot representing the results of the TWAS analysis. The miRNA in red are the ones that were validated (heritability p-value ≤ 0.05 in at least one sample group and that had an adjusted (BH) TWAS p-value ≤ 0.05 in both groups).

726

727

728

C) Scatter plot comparing the TWAS Z-scores of the miRNA in the discovery and validation groups. miRNAs in red are validated. Circles represent miRNA in the BD TWAS, while triangles represent miRNA in the SCZ TWAS.

729

730

731

D) Manhattan plot representing the weights of the snps in the TWAS model of the miRNA miR-4677-3p with his best TWAS eQTL, rs6429422 (red) and the SCZ GWAS significant variant rs61833239 (green) that is in linkage disequilibrium.

732

733

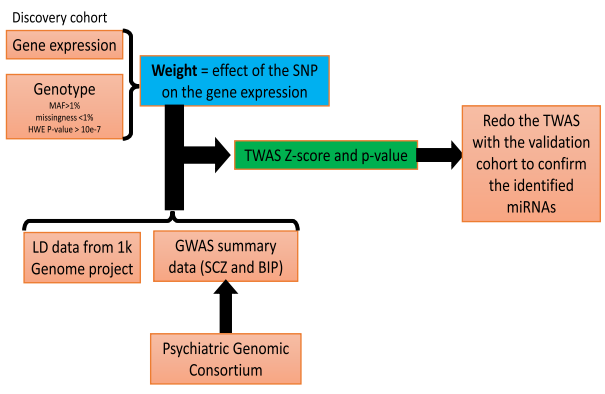
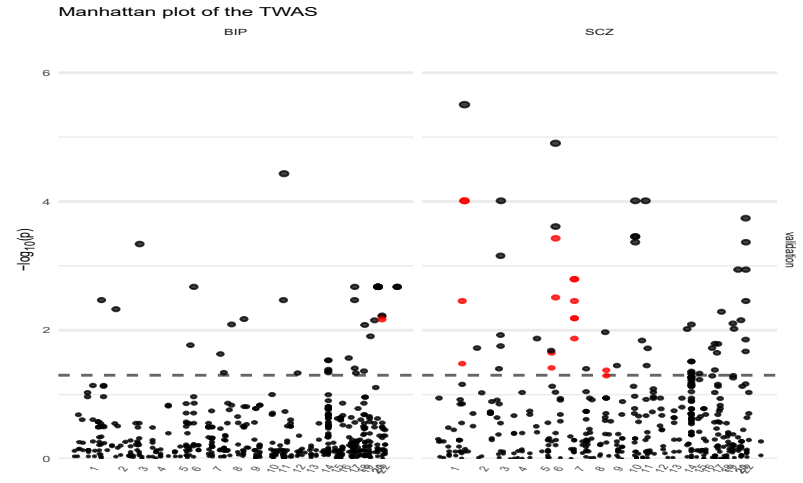
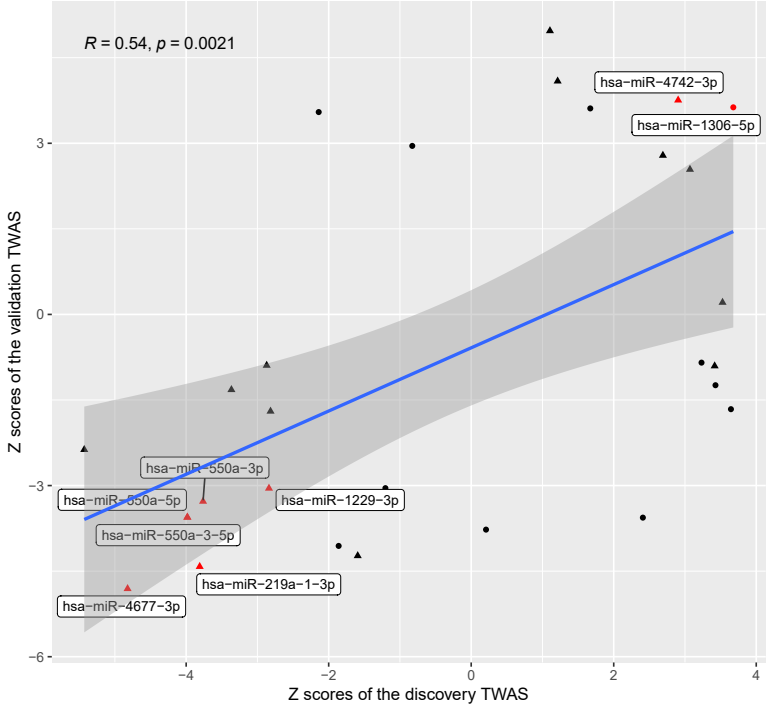
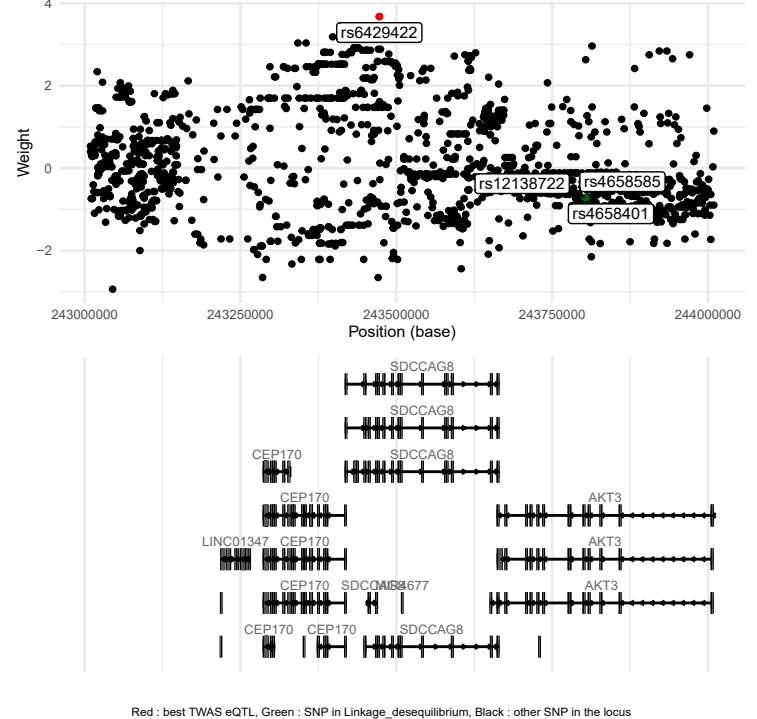
734

E) Boxplot representing the expression (CPM) of the miRNAs miR-1306-5p, miR-1229-3p, miR-4677-3p, and miR-219a-1-3p according to the genotype of their most significant TWAS eQTL in their cis-region.

735

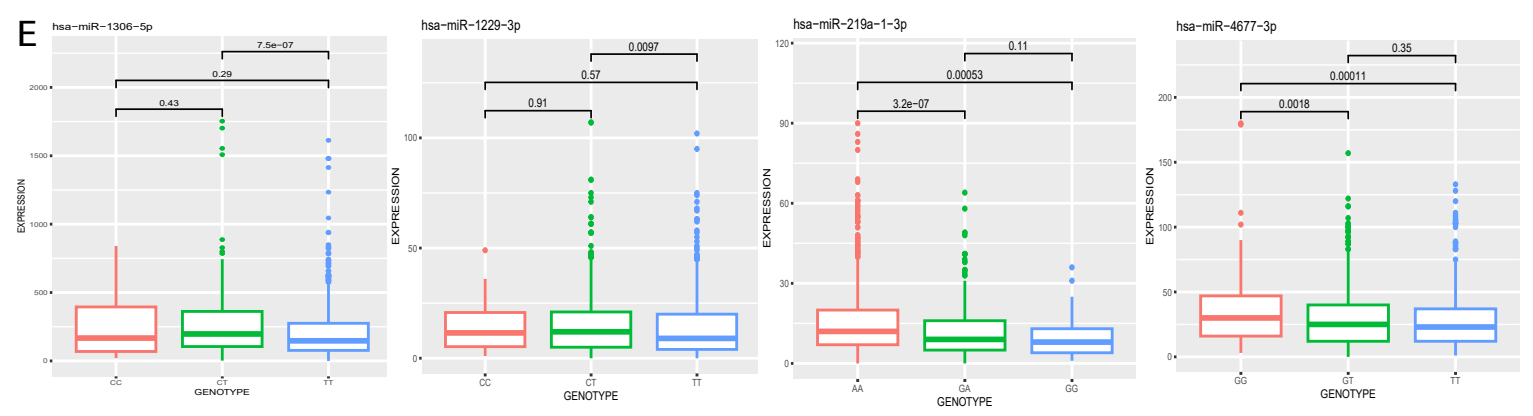
736

737

A**B****C****D**

Red : best TWAS eQTL, Green : SNP in Linkage_desequilibrium, Black : other SNP in the locus

VALIDATED ● FALSE ● TRUE TWAS ● BIP ▲ SCZ

E

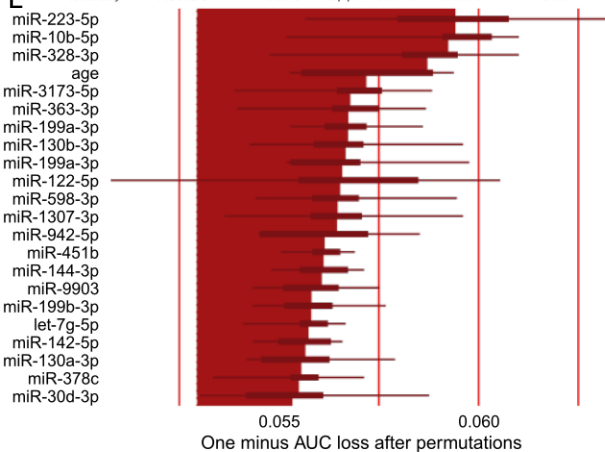
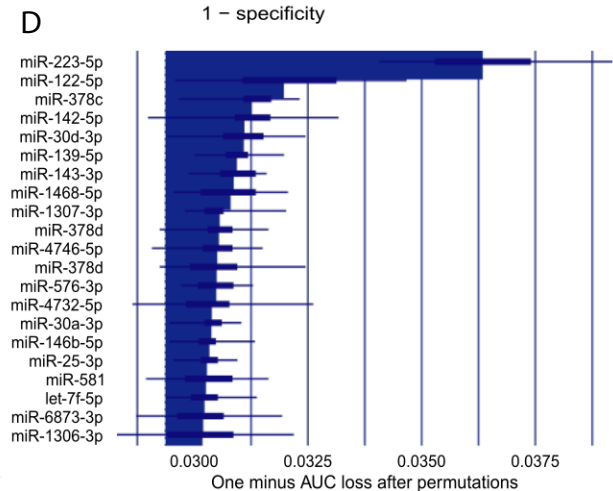
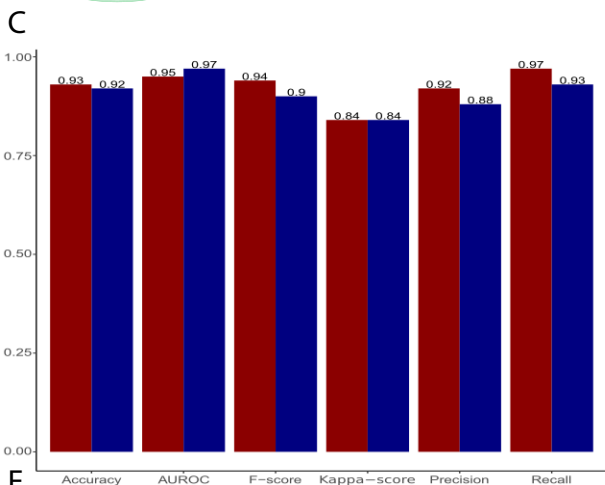
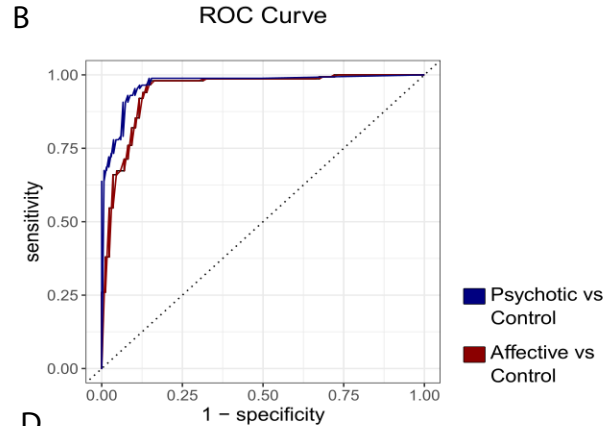
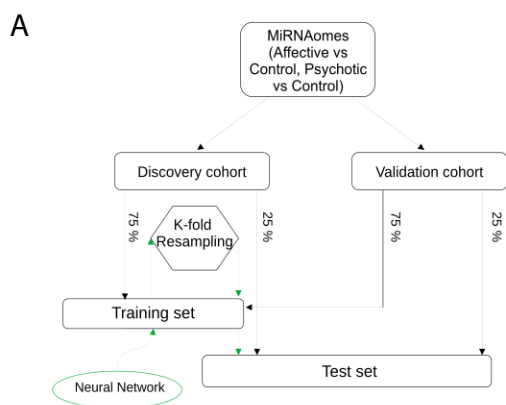
738 **Figure 3: Machine Learning classification**

- 739 A) Flowchart representing the strategy used to train the classification models.
- 740 B) ROC curve of the classification on the test sets for the model comparing psychotic and
741 control group (blue) and the one comparing affective and control groups (red).
- 742 C) Barplot indicating the Accuracy, AUC, F-score, Kappa, Precision, and Recall statistics
743 for the two models.
- 744 D) Barplot representing the importance (as 1-AUC) of the top20 miRNA in the model
745 comparing the psychotic and control groups.
- 746 E) Barplot representing the importance (as 1-AUC) of the top20 miRNA in the model
747 comparing the affective and control groups.

748

749

750



751 Figure 4: Integration

752 (A) Flowchart that describe our methods to validate the miRNAs we identified.

753 (B) Similarity Matrix of the Gene Ontologies).

754 Treemap of representing the Gene Ontologies for the Affective (C), Psychotic (D), and Common
755 (E) sets of miRNAs. The colours represent the GO clusters as defined in the figure 4B.

756 (F) Enrichment plot of the top miRNA of the psychotic GSEA analysis in the DLPC (left), ACC
757 (center), and BLOOD (right) GSEA realized using genes ranked from a control versus psychotic
758 (top) or affective (bottom) DGE analysis in the DLPC

759 (G) Lines chart that represent the NES of the top20 miRNAs in the psychotic (top) and affective
760 (bottom) GSEA of the DLPC (left), ACC (center), and BLOOD (right) tissues. The red lines
761 indicate the miRNA NES in the affective GSEA, while the blue lines correspond to the psychotic
762 GSEA.

763 (H) Scatter plot that indicate the GO clusters that how significant difference between patients
764 (affective, psychotic, all) and healthy controls. The size of the points corresponds to the p-value.
765 The colours represent the GO clusters a defined in the figure 4B.

766 (I) Alluvial plots that represent the miRNAs-mRNA interactions (left) and scatter plot
767 representing those interaction Spearman correlation in blood for the “stress response” (top) and
768 “regulation of lipid metabolic process” GO terms. Only the mRNAs with the lowest correlations
769 are show.

770 (J) Protein-Protein-Interraction network of the “Anatomical Differentiation” cluster of Gene
771 Ontologies.

772 (K) Protein-Protein-Interraction network of the “Stress Response” cluster of Gene Ontologies.

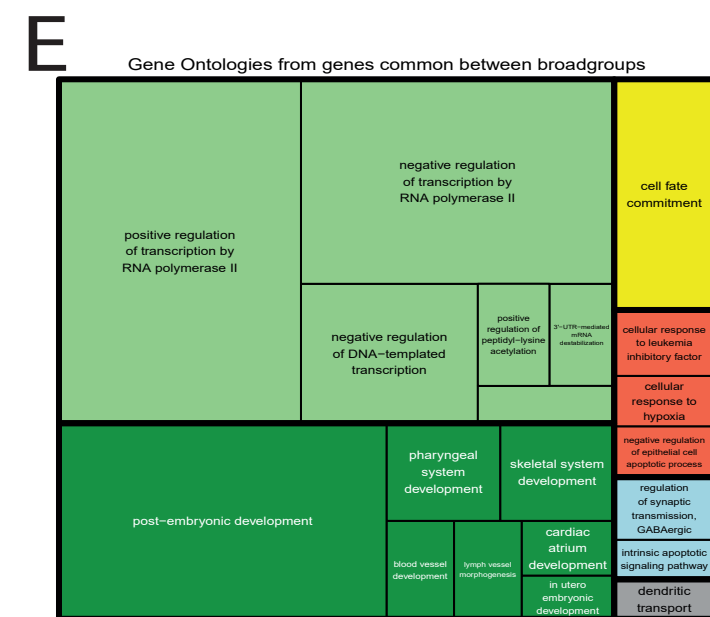
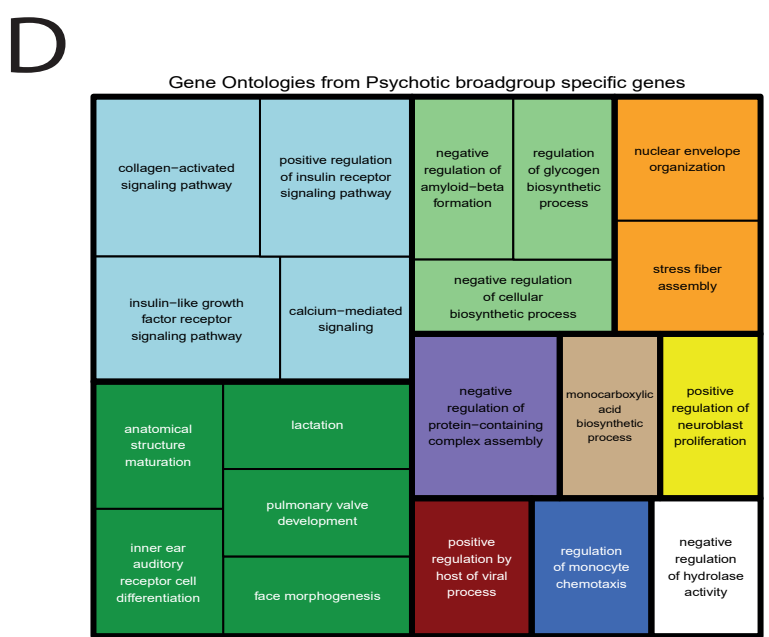
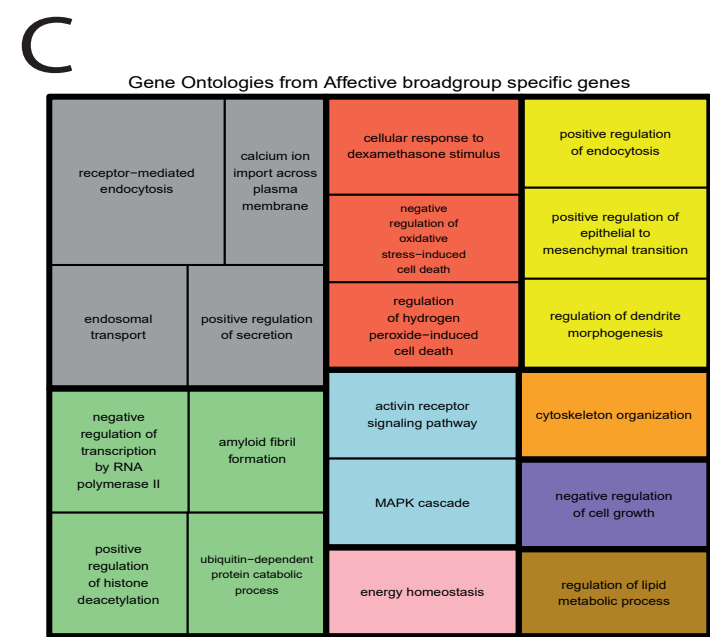
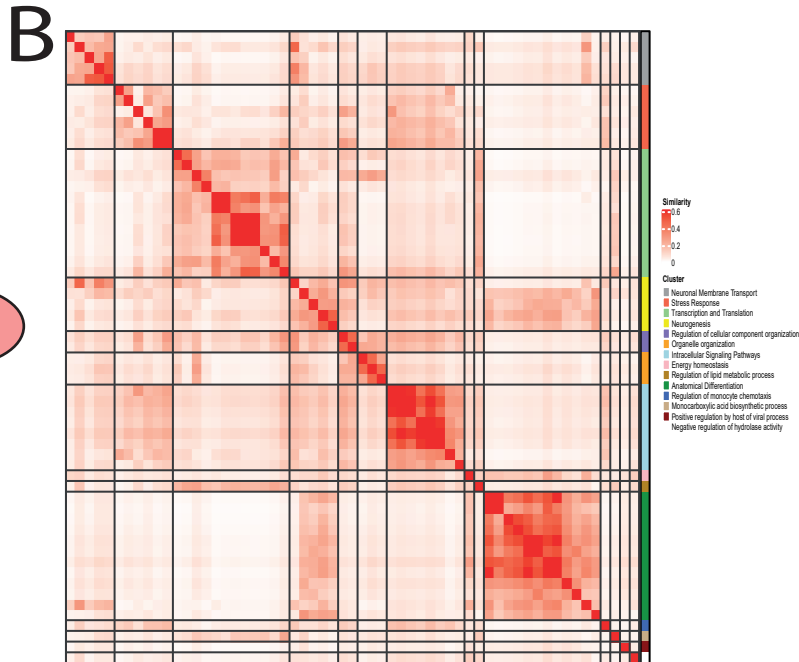
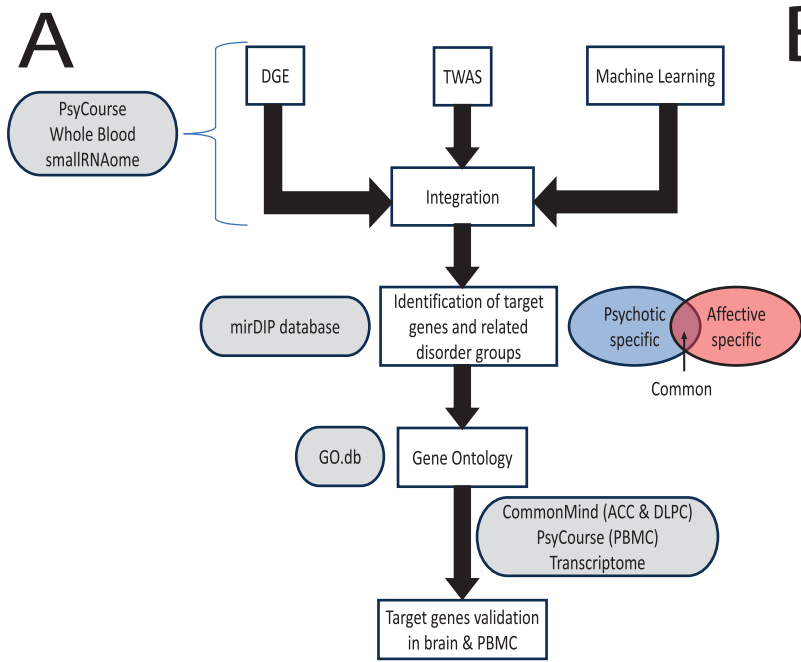
773 (L) Circos-plot representing the 10 most targeted miRNA and the miRNAs that target them. The
774 lines colours represent the sets to which the miRNAs are part of (red = affective only, violet =
775 intersect, blue = psychotic only).

776 (M) Boxplot of the 10 most targeted genes' expression in ACC and DLPC brain regions. Stars
777 indicate significance P-values (*0.05; ** 0.01; *** 0.001.).

778

779

780



T

SCZ vs Control

BD vs Control

G

ID

ID

ID

ANALYSE

AFF GSEA

PSY GSEA

-log10(padj)

3.0

3.5

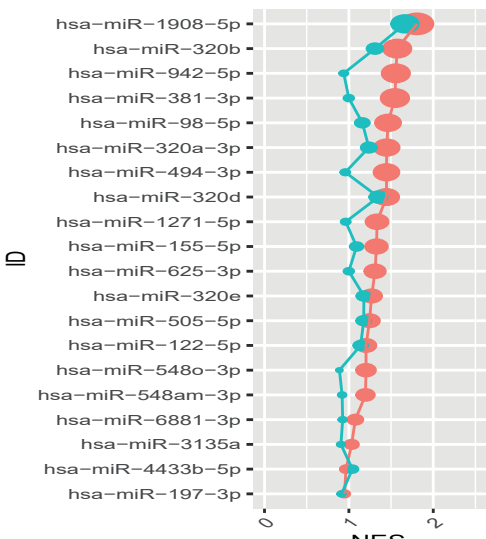
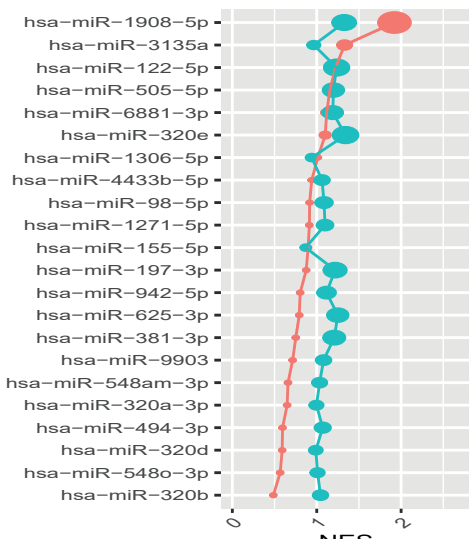
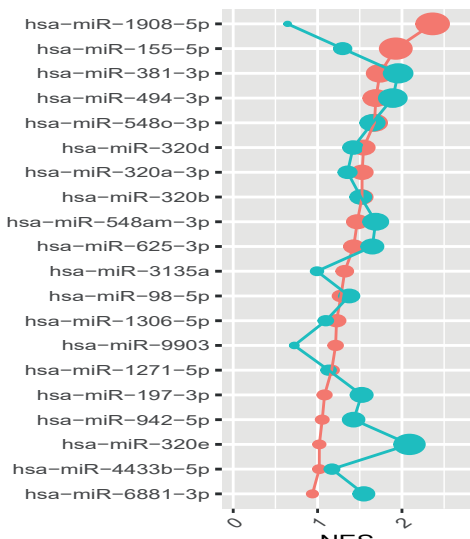
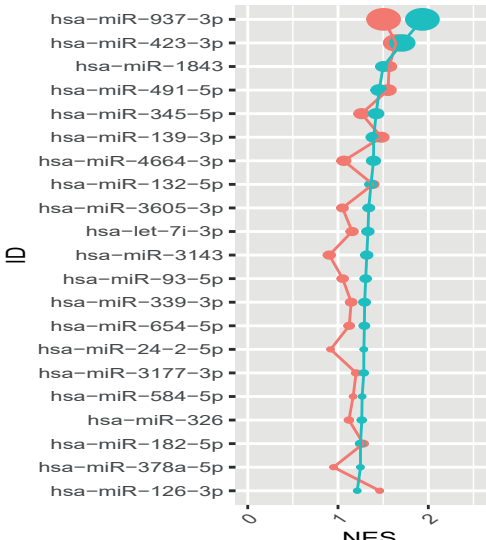
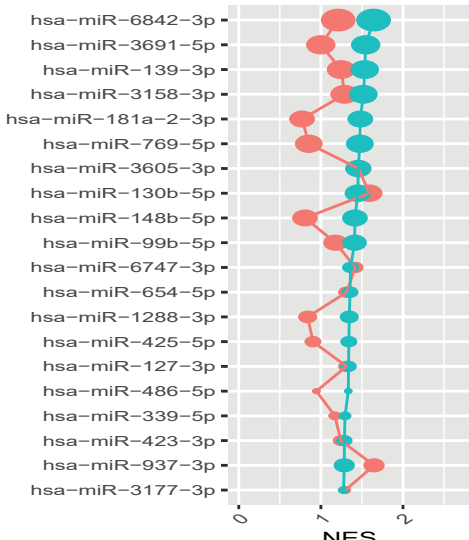
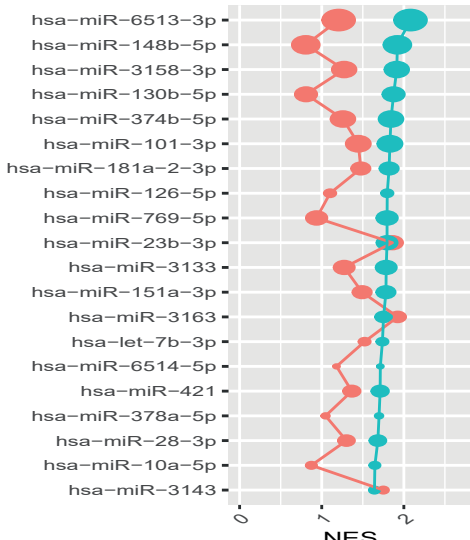
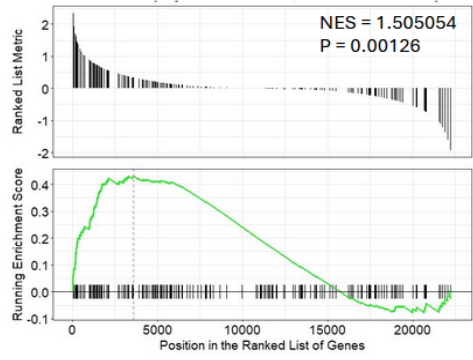
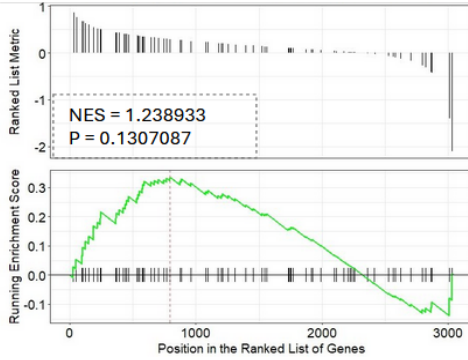
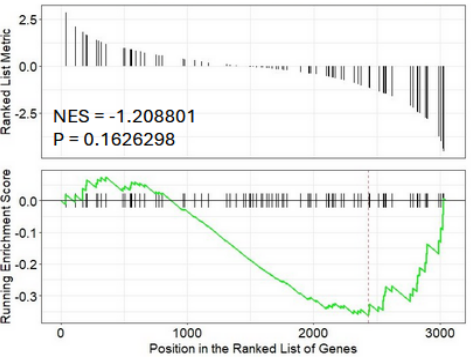
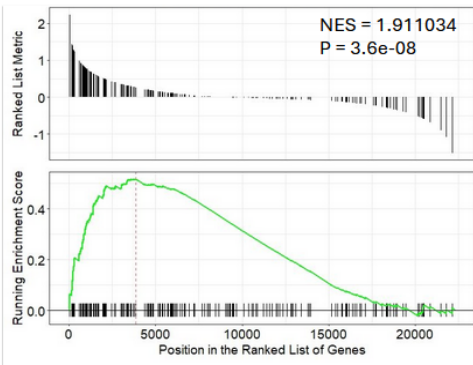
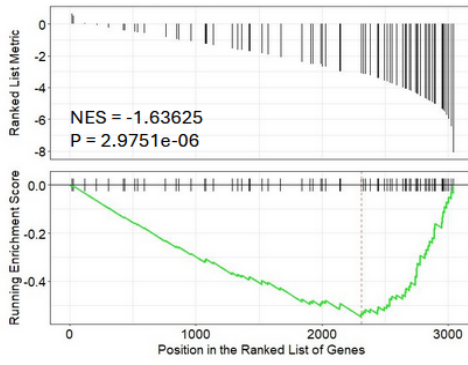
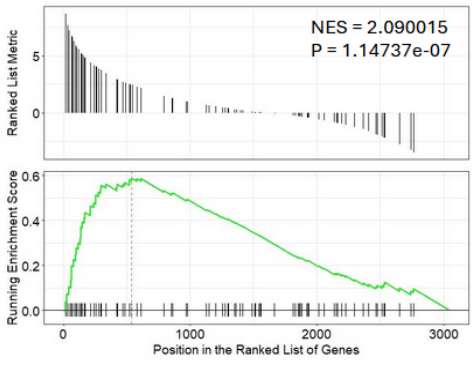
4.0

4.5

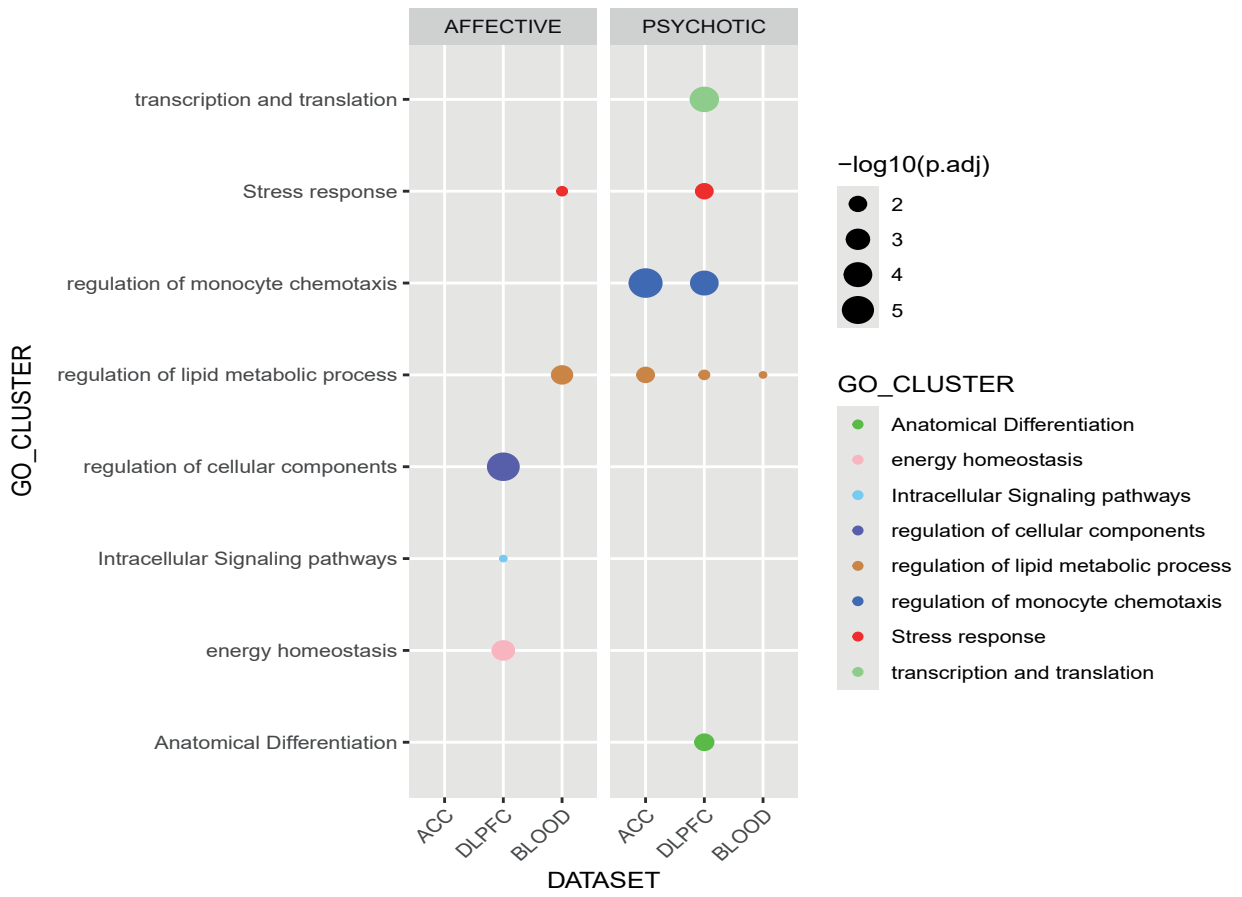
DLPC (miR-6513-3p)

ACC (miR-6842-3p)

BLOOD (miR-937-3p)

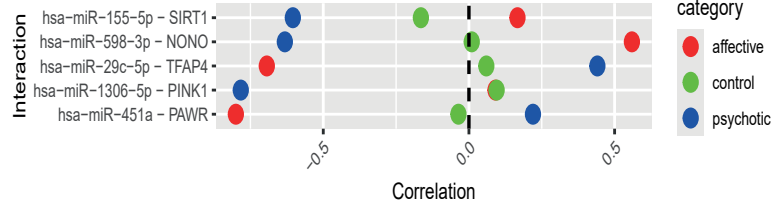
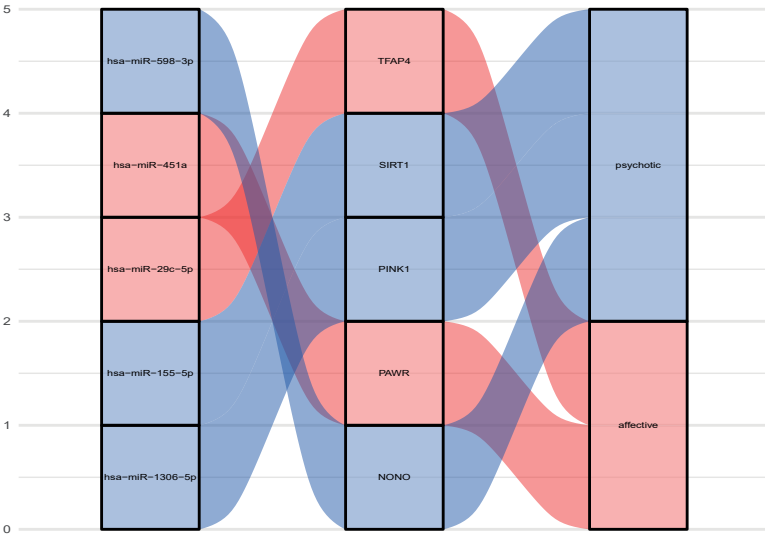


H

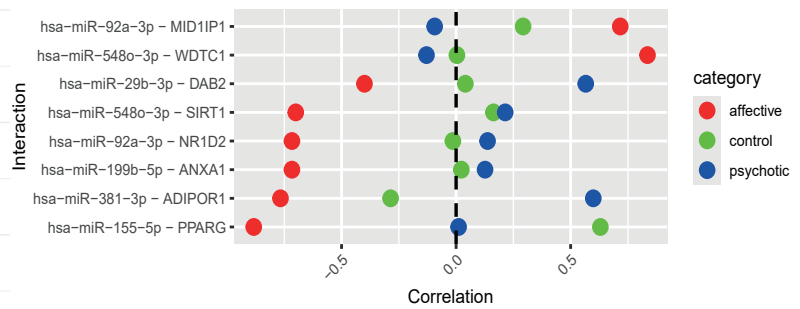
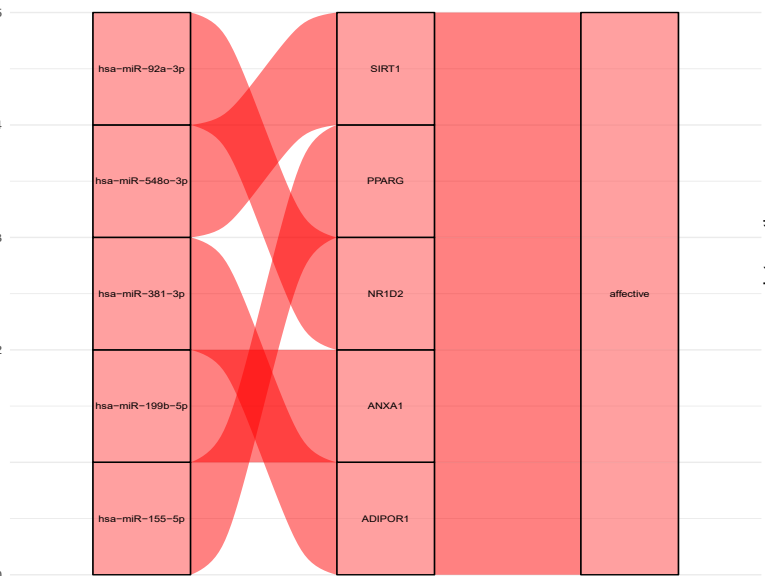


I

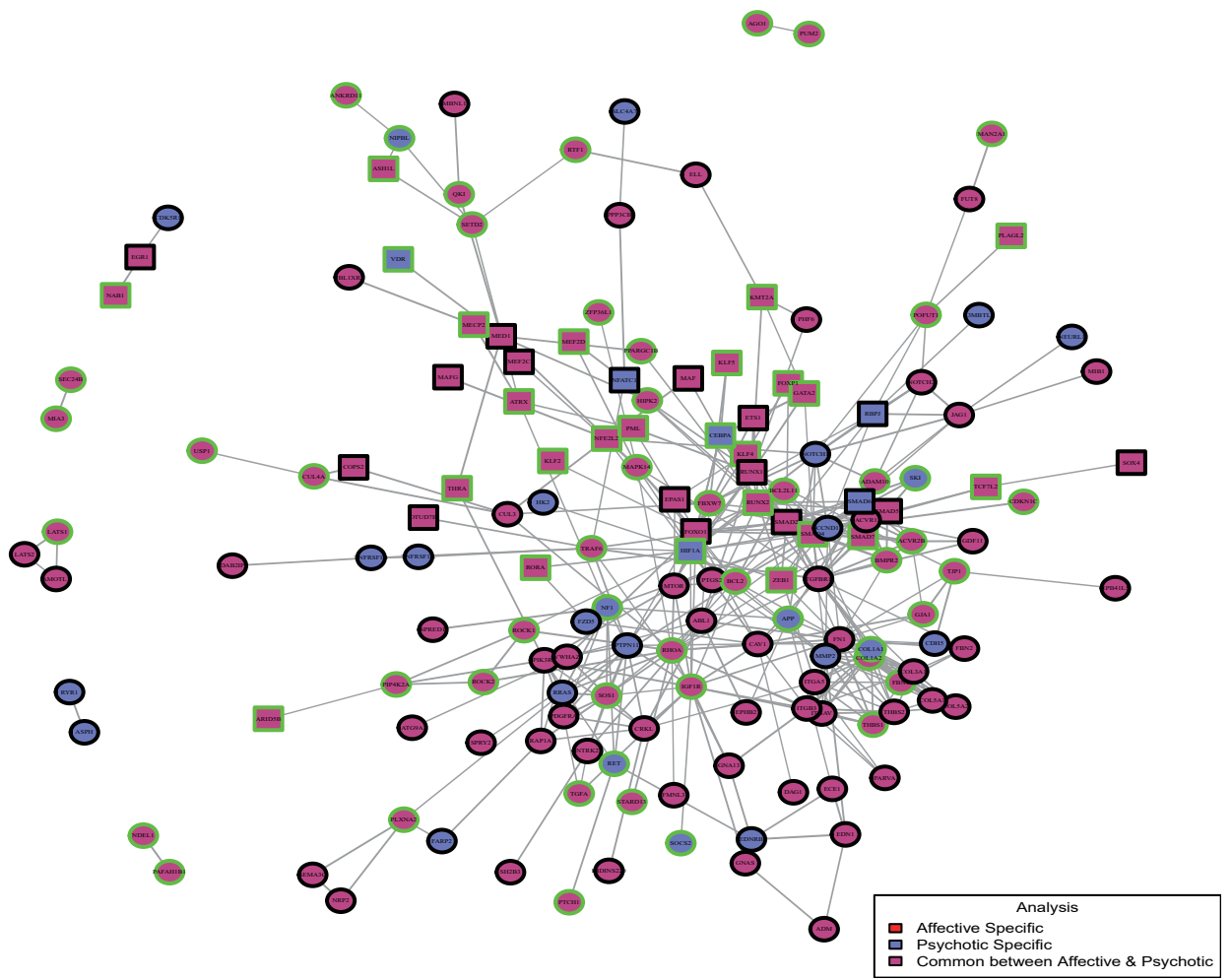
Stress response



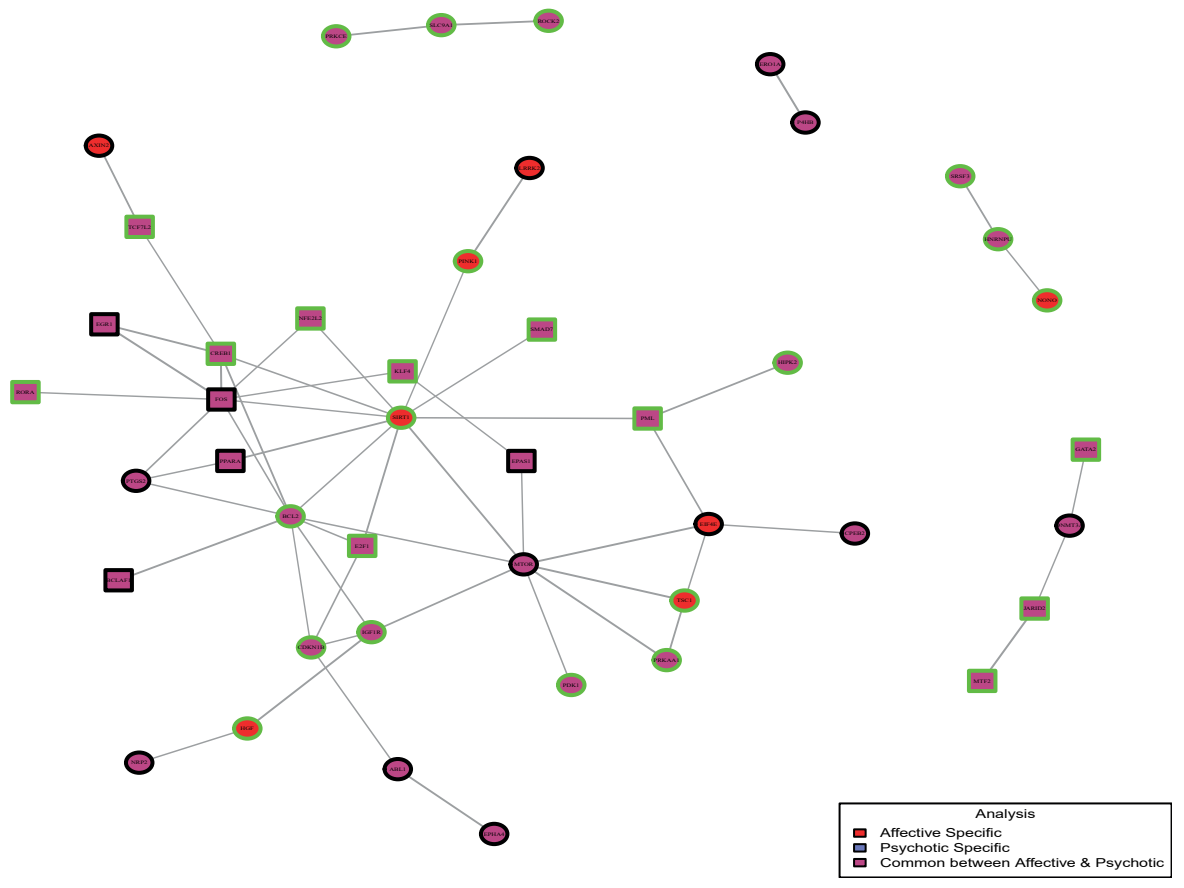
Regulation of lipid metabolic process



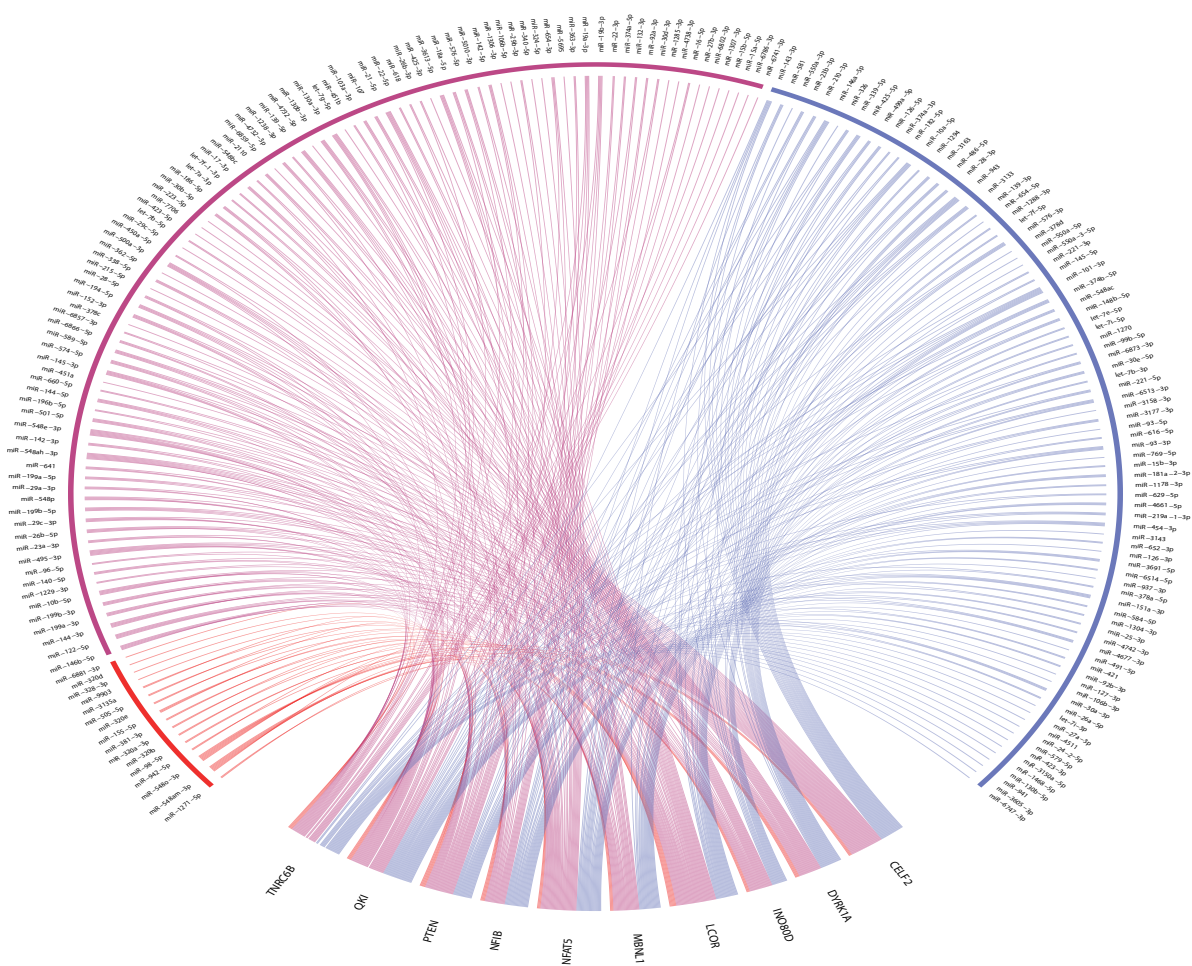
J



K

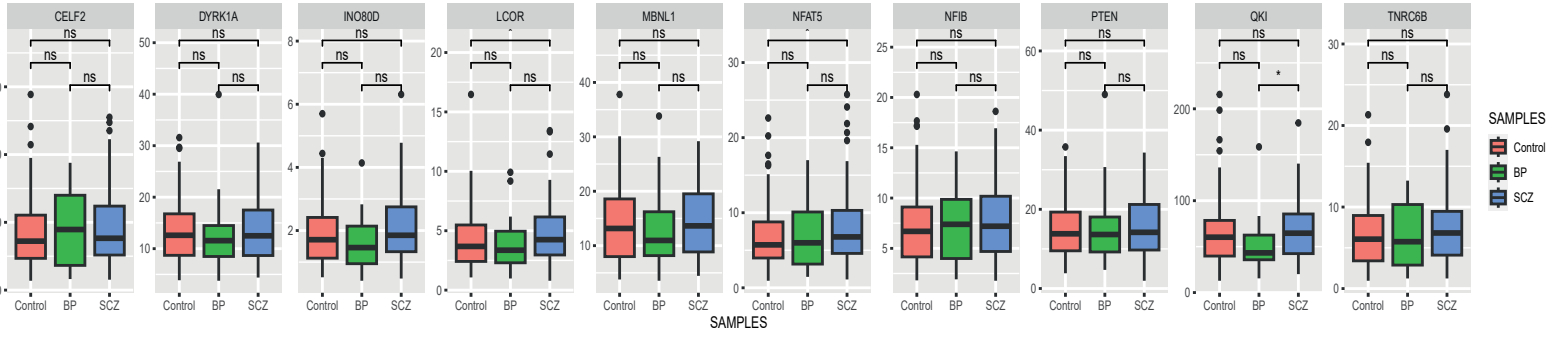


L

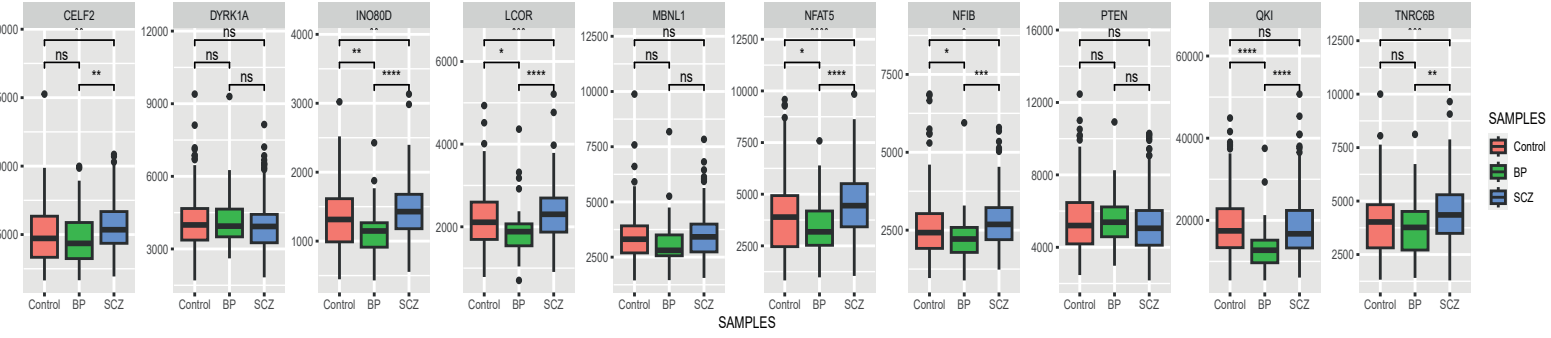


M

Boxplot of the top genes from the ACC data

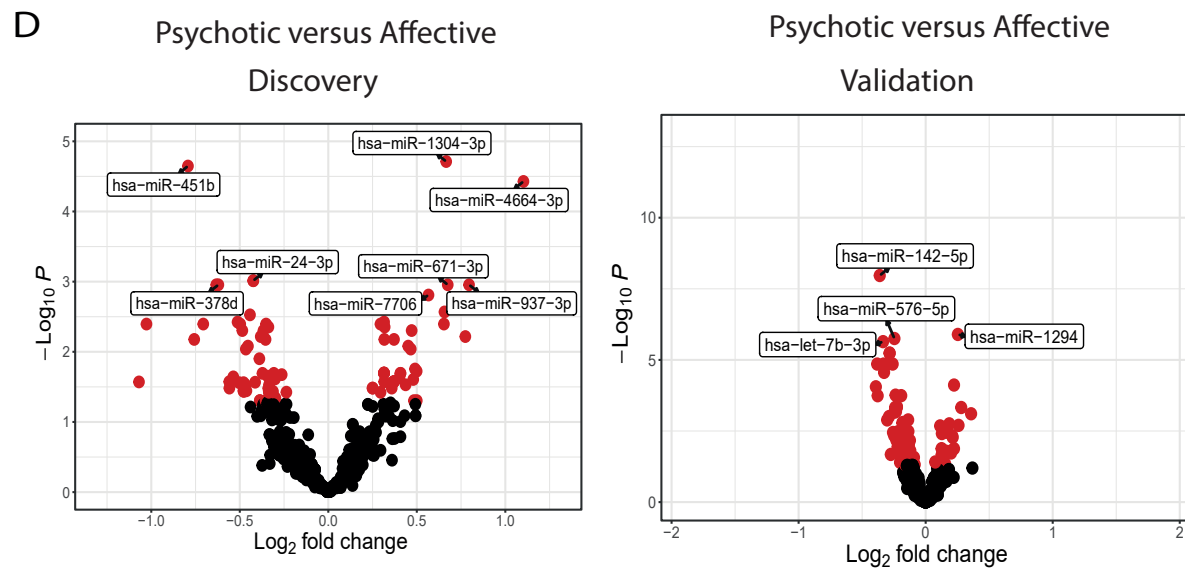
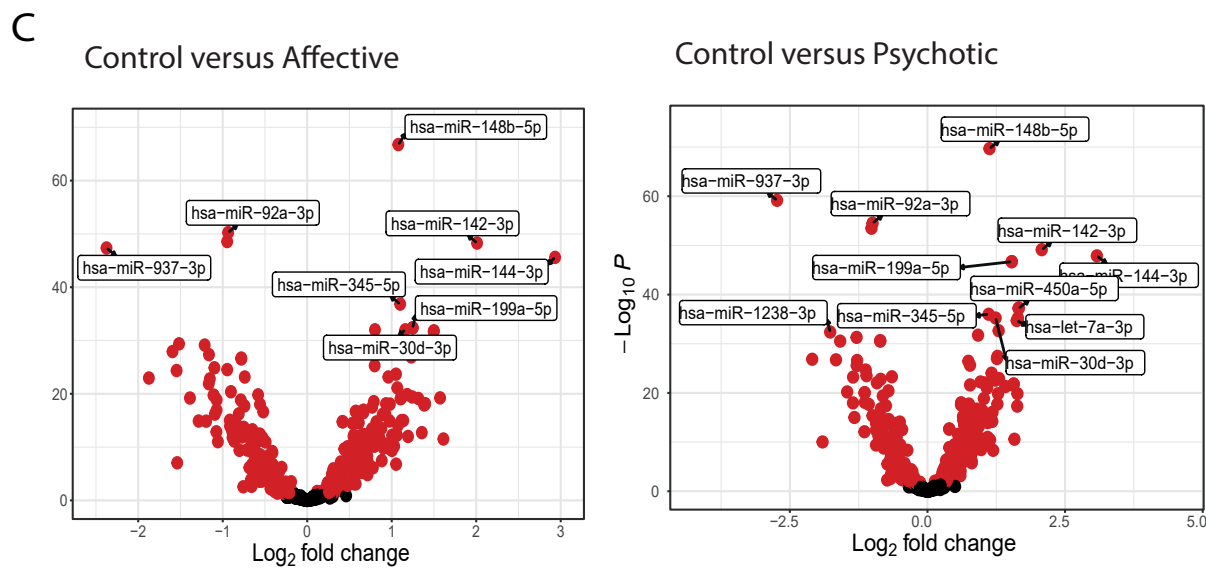
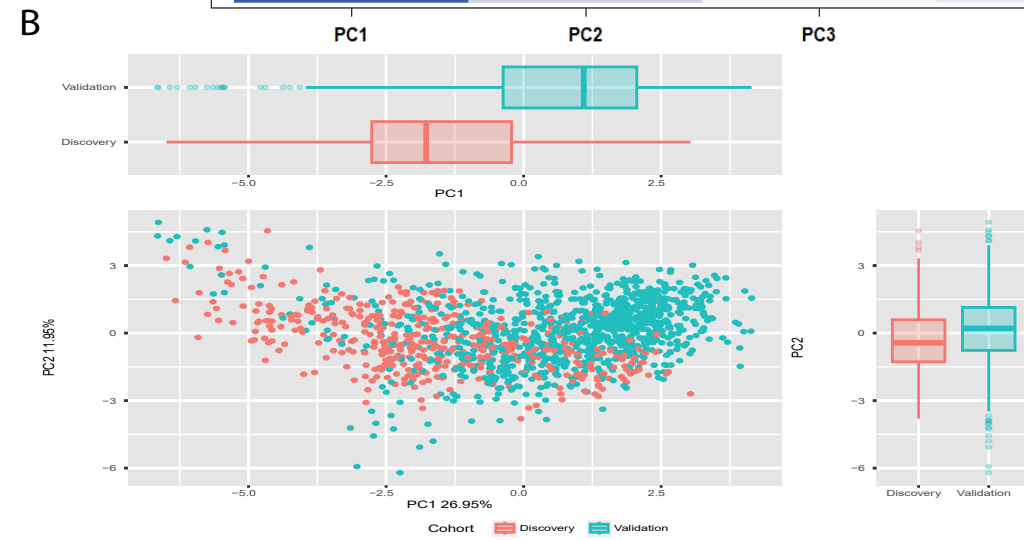
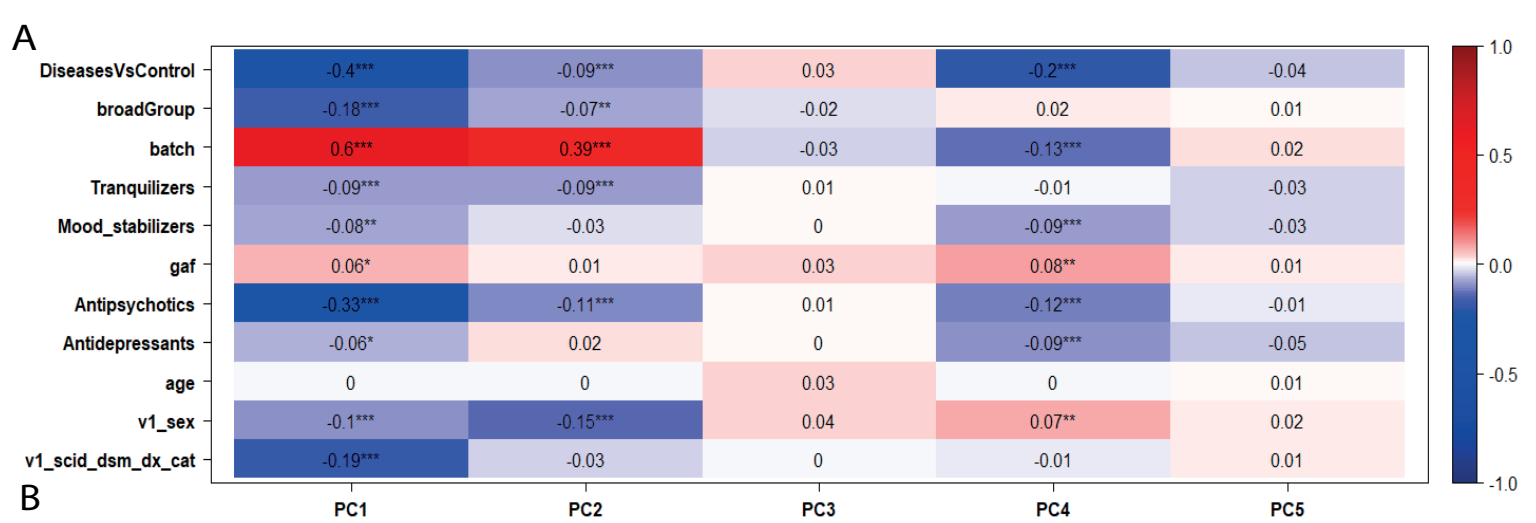


Boxplot of the top genes from the DLPC data



Supplementary Figure 1:

- 781
- 782 A) PCA plot of all samples and associated boxplot of the PC1 and PC2 values. The colors
783 represent the discovery (red) and validation (blue) samples.
- 784 B) Correlation heatmap who represent the Pearson correlation between the first 5 PC of the
785 PCA plot and covariates of the PsyCourse Study. The values and color indicate the
786 correlation. Stars indicate significance P-values (*0.05; ** 0.01; *** 0.001.)
- 787 C) Volcano plots of the comparisons between the control group and the affective (left) and
788 psychotic (right) groups in the validation samples. The miRNA in red were those that
789 were found differentially expressed in the validation samples. The black point represent
790 miRNA that are not differentially expressed.
- 791 D) Volcano plots of the comparisons between the psychotic and the affective group in the
792 discovery (left) and validation (right) samples.
- 793
- 794



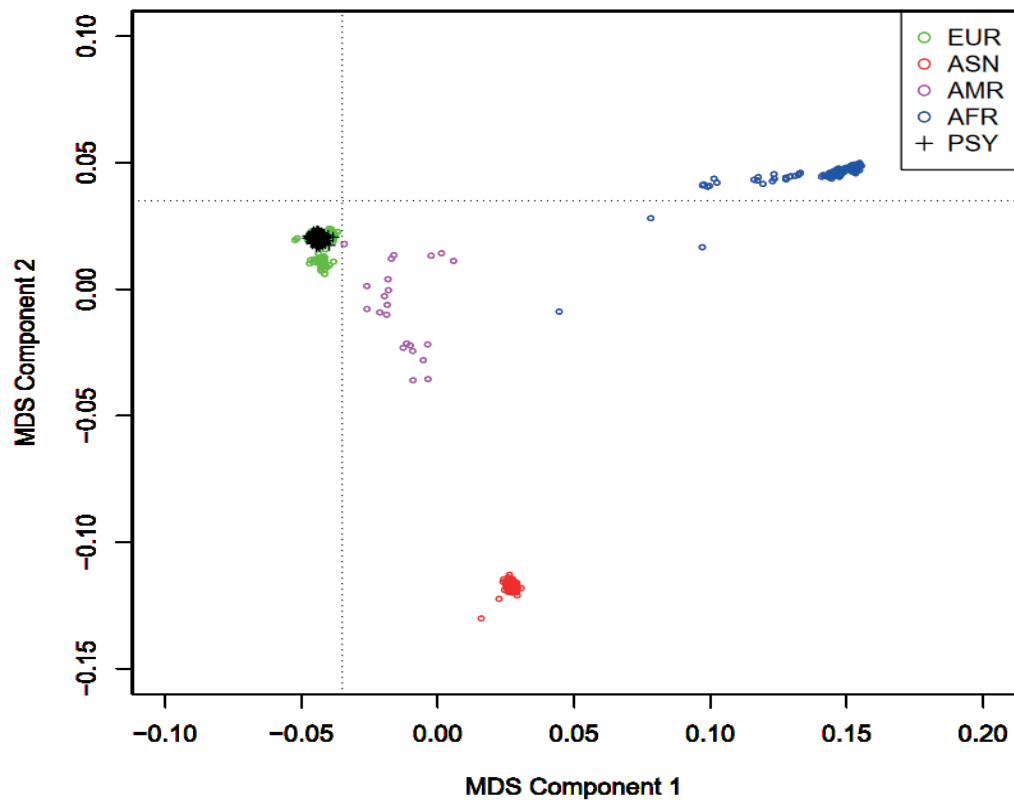
795 **Supplementary Figure 2:**

- 796 A) MDS plot representing the ancestry of the participants of the TWAS analysis.
797 B) Scatter plot representing the heritability (left) and the heritability p-value (right) in the
798 discovery and validation samples for miRNA in common to both analyses.

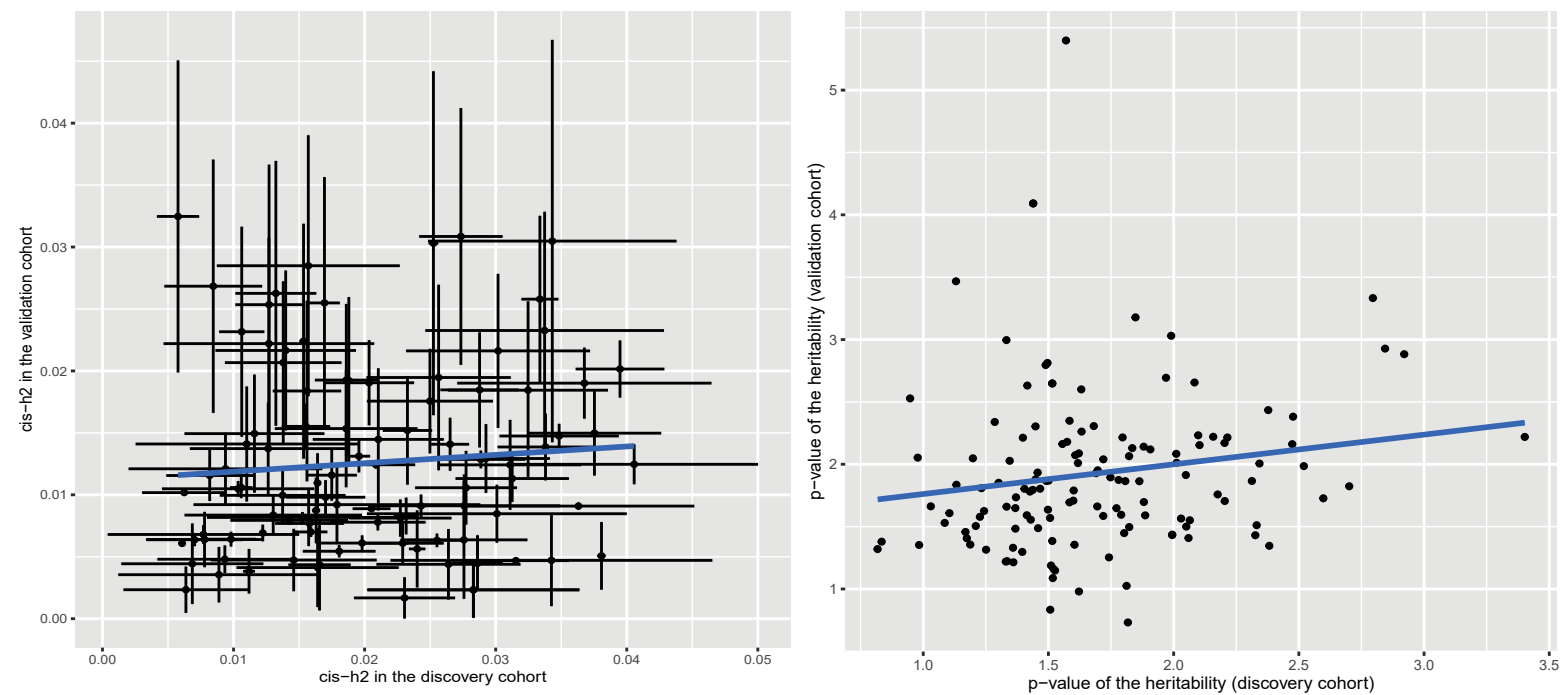
799

800

A

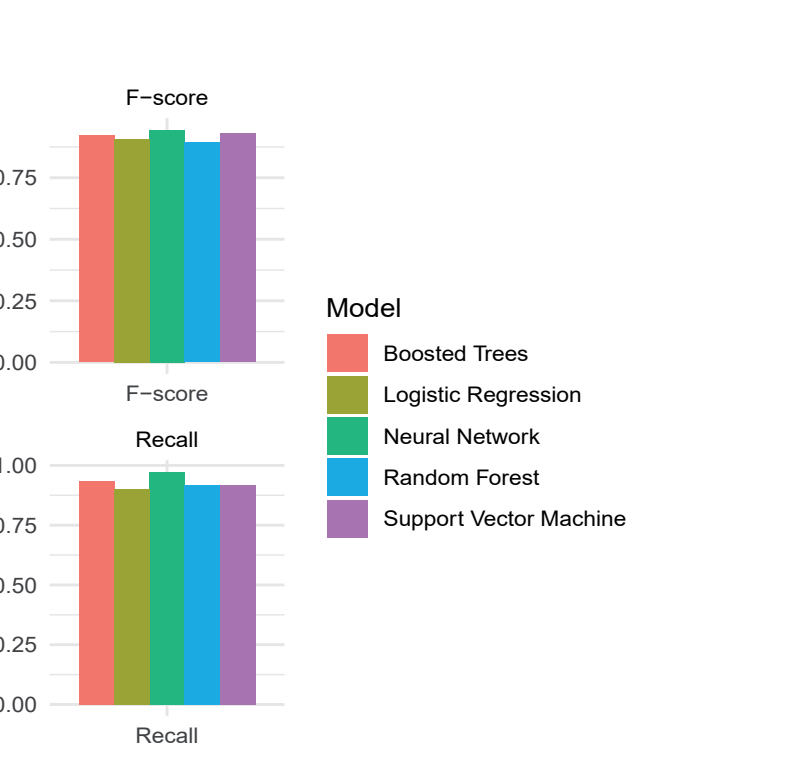
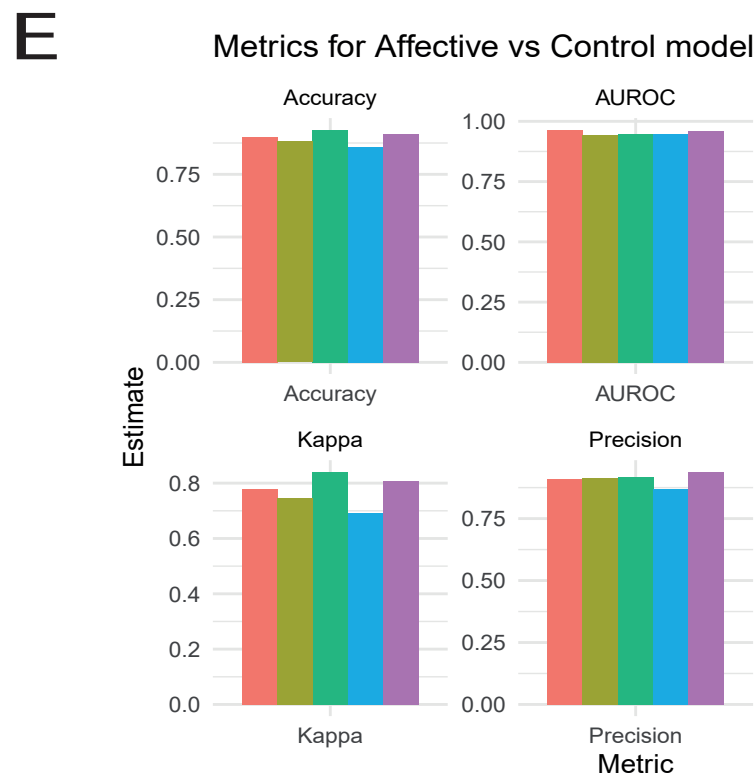
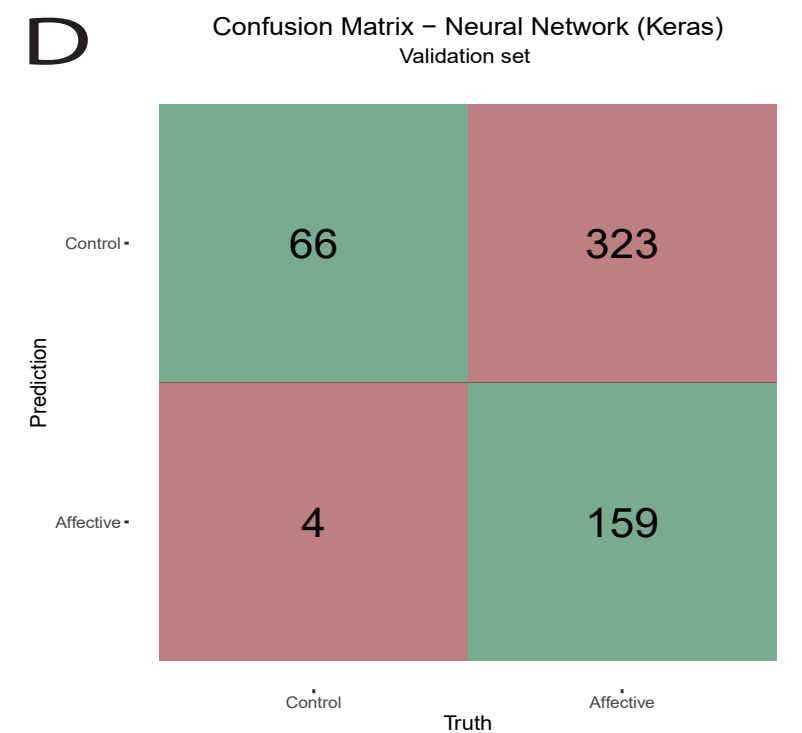
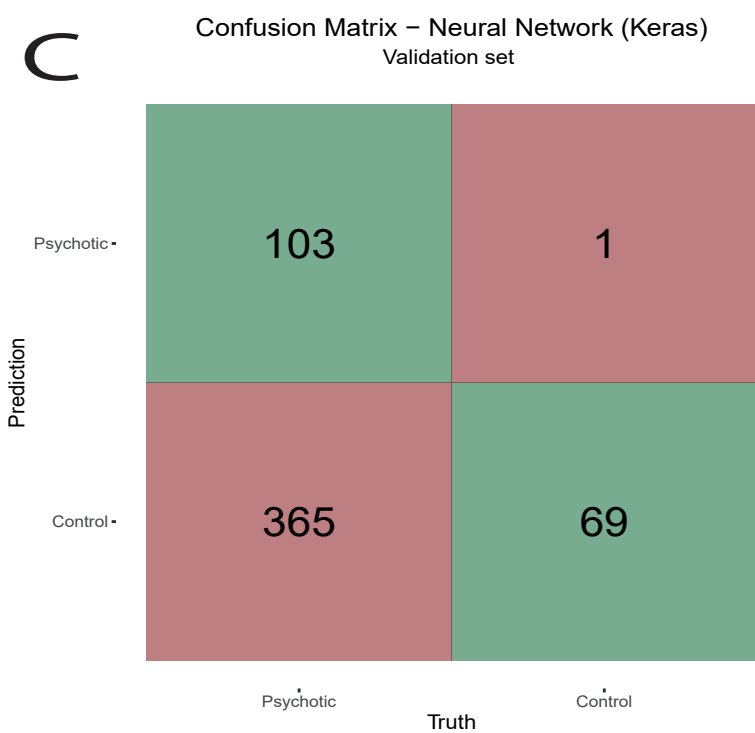
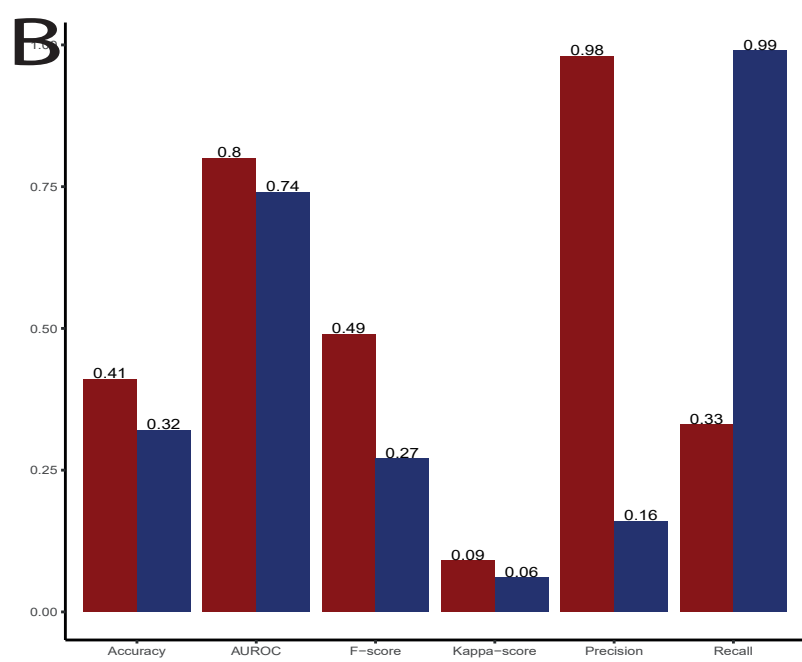
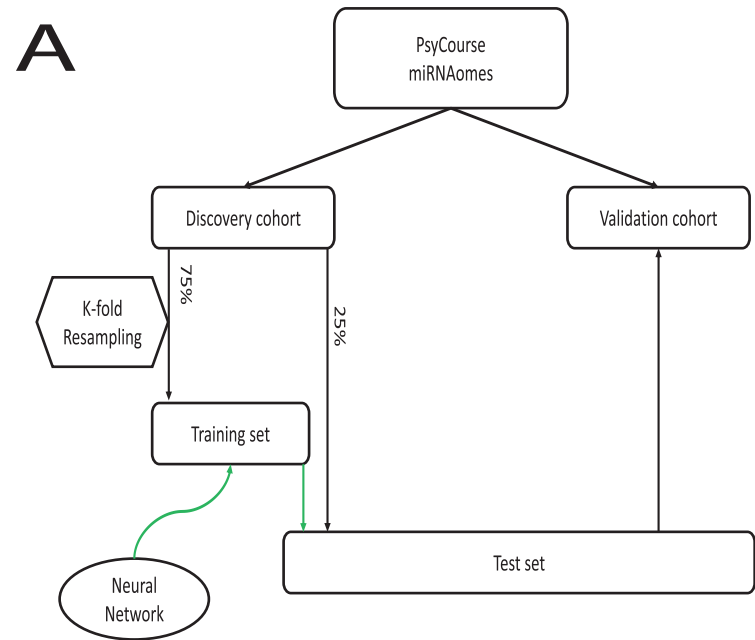


B



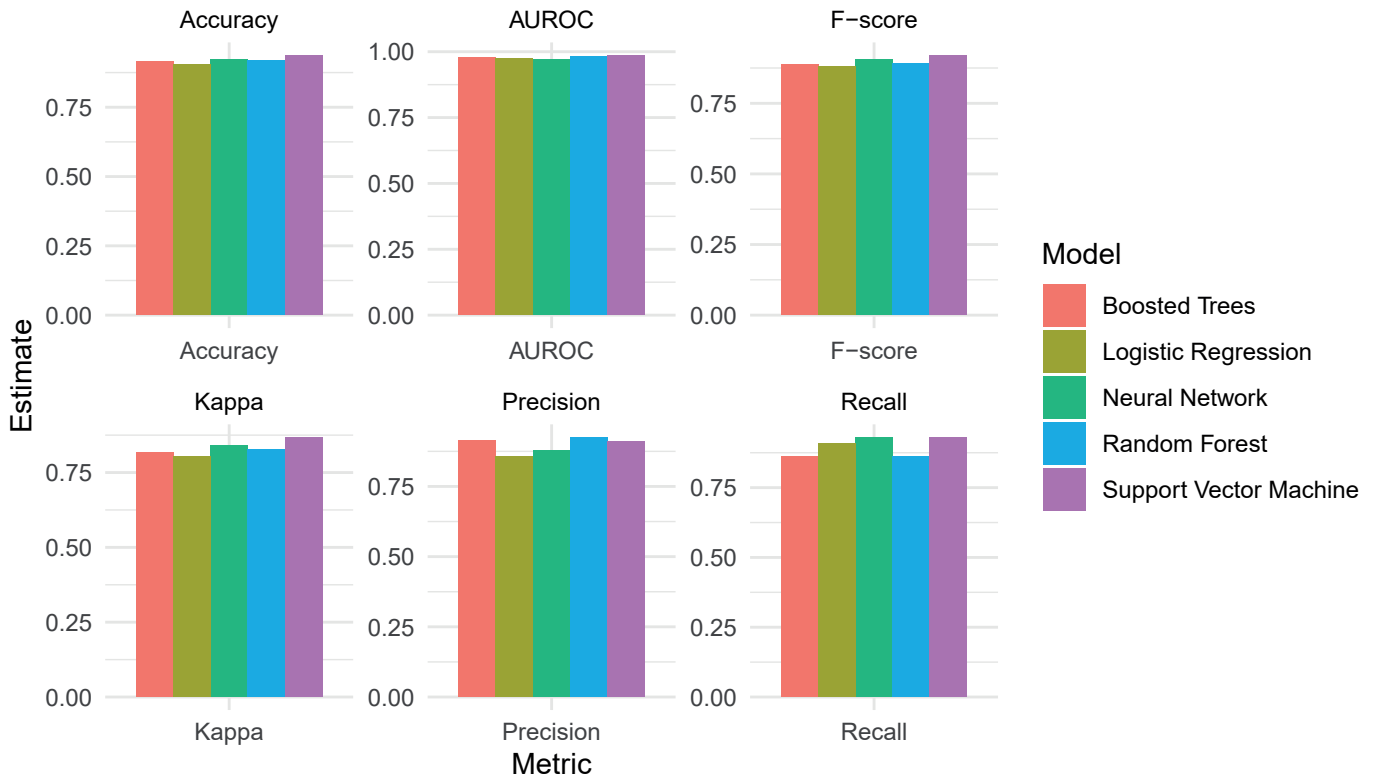
Supplementary Figure 3:

- A) Flowchart of initial strategy for the use of Neural Network to validate miRNA link to the broad groups.
- B) Barplot representing the metrics of each models generated using our first strategy on the validation samples
- C) Confusion matrix resulting of the ML first strategy test on the validation samples for the model comparing PSY and CTL.
- D) Confusion matrix resulting of the ML first strategy test on the validation samples for the model comparing AFF and CTL.
- E) Barplots of metrics representing the performances of different classifications ML algorithms trained and tested on our data to differentiate the affective and control participants
- F) . Barplots of metrics representing the performances of different classifications ML algorithms trained and tested on our data to differentiate the psychotic and control participants
- G) Boxplot of residuals for the different classification algorithms trained to classify the affective and control participants
- H) of residuals for the different classification algorithms trained to classify the psychotic and control participants
- I) Graphes that represents the AUROC of the entire training and test sets for neural networks trained on fractions of the training sets (20 to 100%) to classify the affective (right) or psychotic (left) and the control participants
- J) ROC plot of the first strategy ML models.



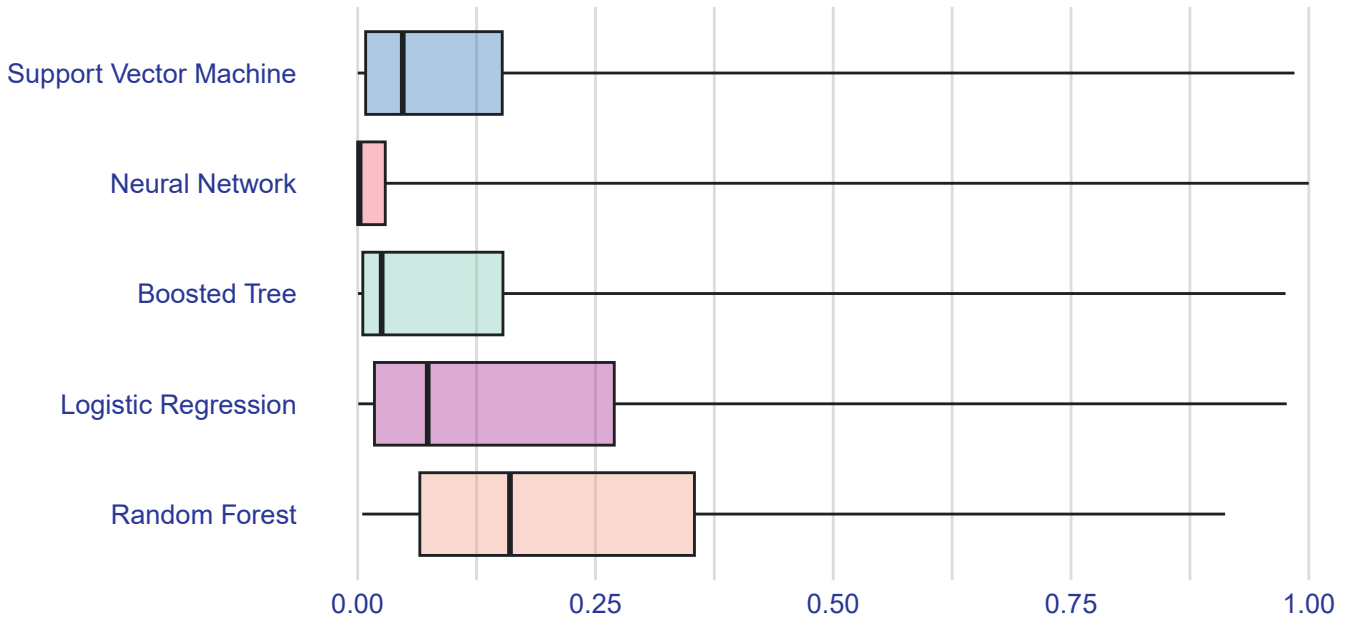
F

Metrics for Psychotic vs Control models



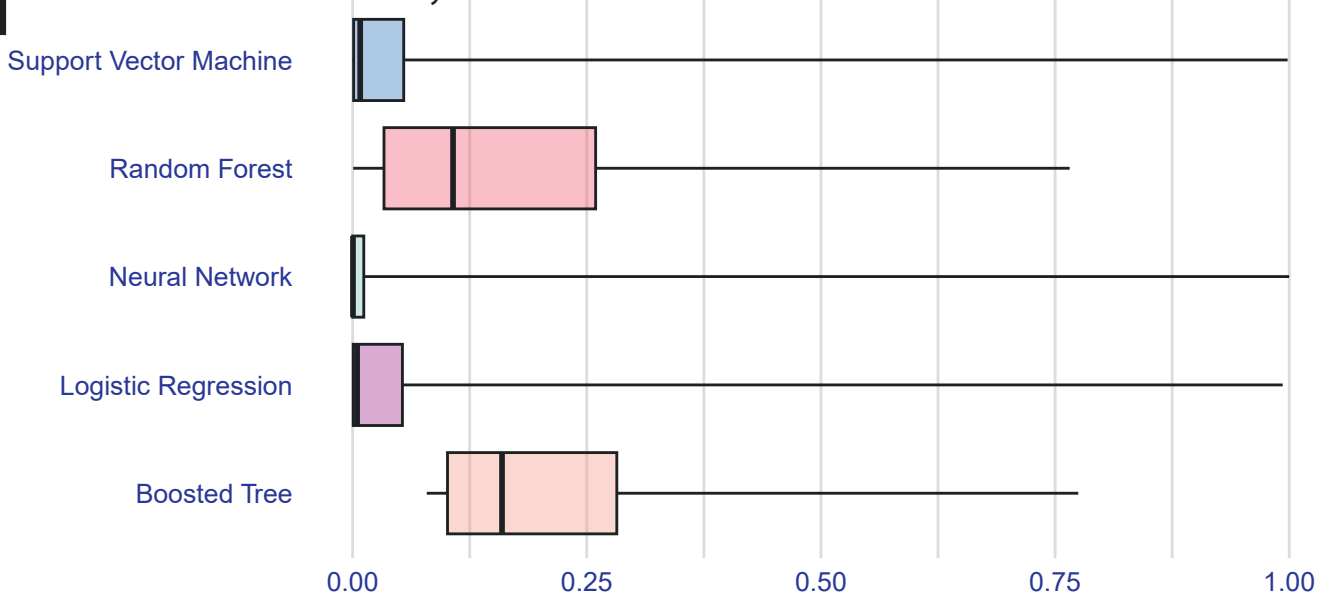
G

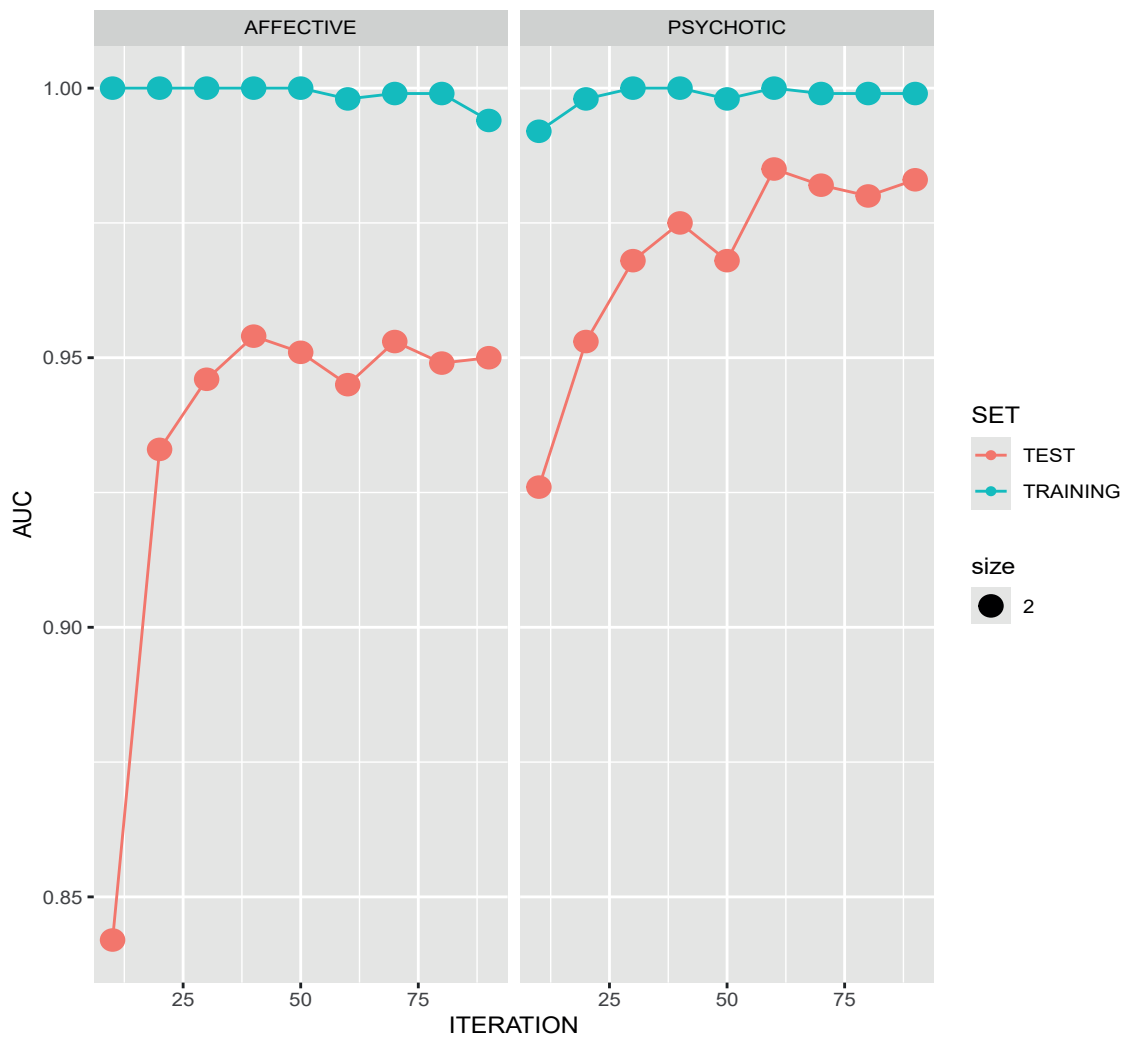
Residuals of the Affective vs Control models



H

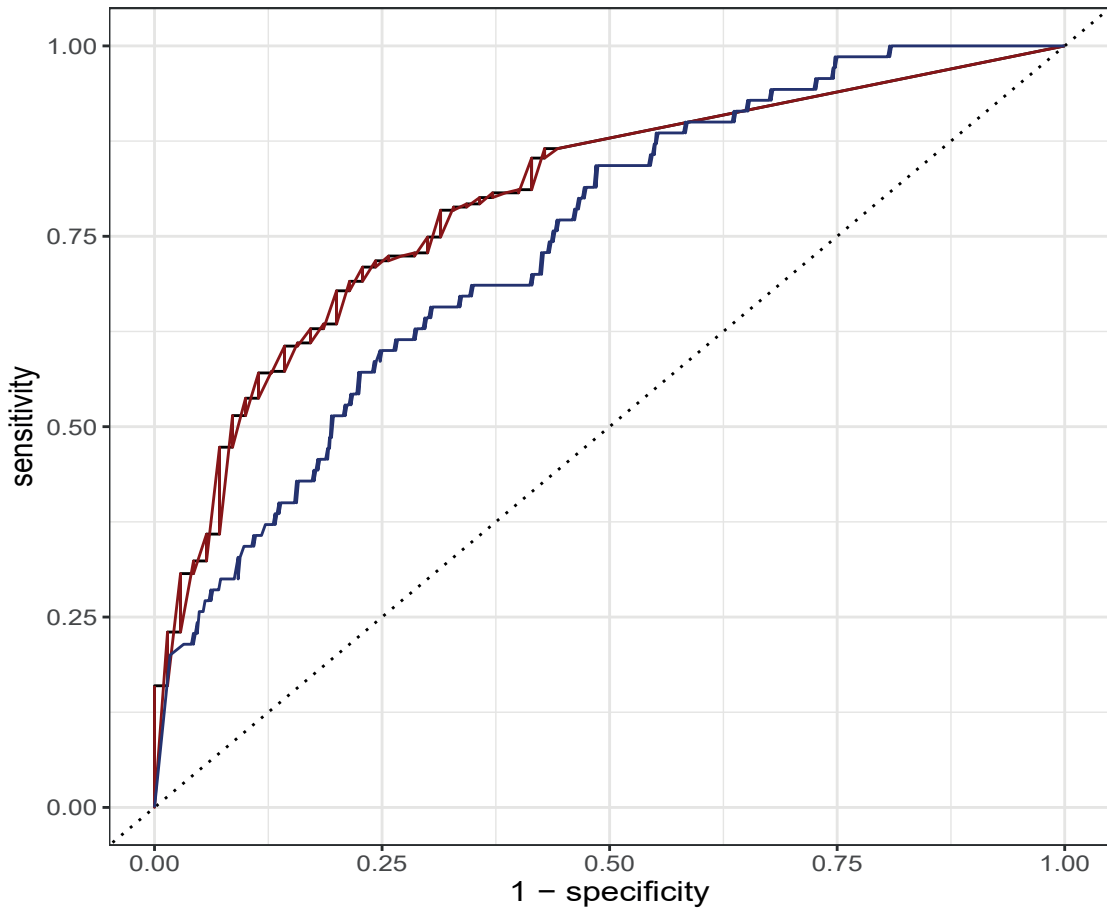
Residuals of the Psychotic vs Control models





J

ROC Curve

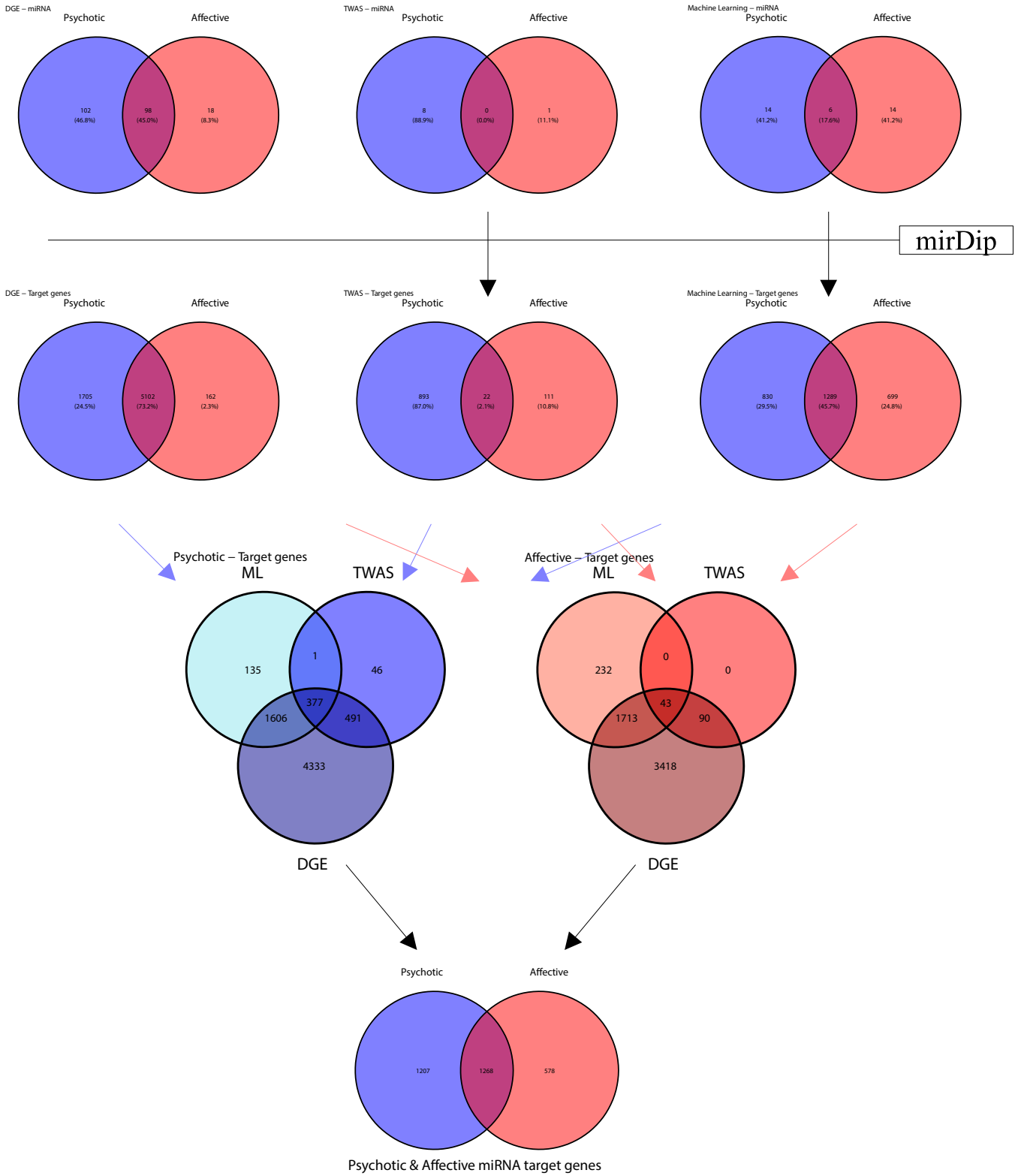


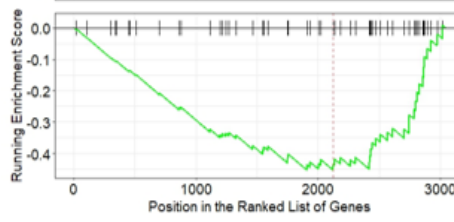
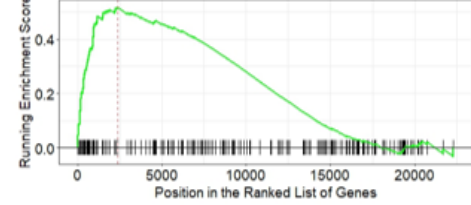
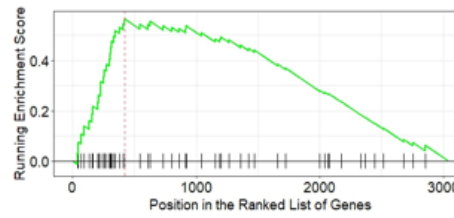
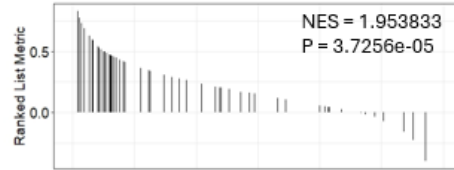
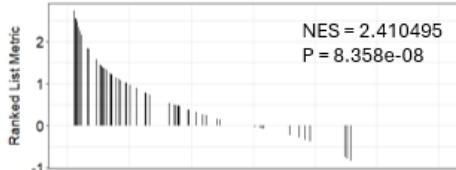
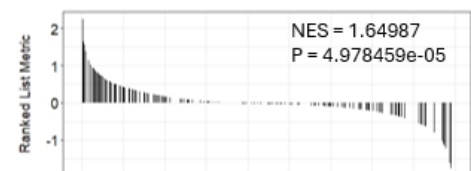
825 **Supplementary Figure 4:**

826 A) Description of the integration strategy

827

A



B**DLPC (miR-1908-5p)****ACC (miR-1908-5p)****BLOOD (miR-1908-5p)**

PSYCHOTIC GSEA

AFFECTIVE GSEA

828 Supplementary Tables:

- 829 I. Summary of the DGE analysis results
- 830 II. Table that resume the miRNAs identified in previous studies
- 831 III. Table that indicate if the miRNA expressed in blood were identified in our DGE analysis
832 and/or in previous studies of schizophrenia, bipolar disorders and major depressive
833 disorder
- 834 IV. Table that indicate the number of miRNA for which the TWAS models were computed
835 and cis-heritability summary
- 836 V. TWAS heritability of each miRNAs
- 837 VI. Allelic proportions of the TWAS eQTL across the 3 broad groups
- 838 VII. Table that resume the linkage disequilibrium (R^2 and D') between the TWAS eQTL and
839 the GWAS eQTL
- 840 VIII. Results of our gene ontology analysis
- 841 IX. Summary of the miRSNPs of the identified target genes
- 842 X. Summary of the 10 genes that are targeted by the most miRNAs among those we
843 identified

844 References

- 845 1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders:*
846 *DSM-5.* (American Psychiatric Association, 2013).
- 847 2. Meyer, F. & Meyer, T. D. The misdiagnosis of bipolar disorder as a psychotic disorder:
848 Some of its causes and their influence on therapy. *J. Affect. Disord.* **112**, 174–183 (2009).
- 849 3. Baryshnikov, I. *et al.* Diagnostic conversion from unipolar depression to bipolar disorder,
850 schizophrenia, or schizoaffective disorder: A nationwide prospective 15-year register study
851 on 43 495 inpatients. *Bipolar Disord.* **22**, 582–592 (2020).
- 852 4. Koreen, A. R. *et al.* Depression in first-episode schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* **150**, 1643–
853 1648 (1993).
- 854 5. Florentin, S., Reuveni, I., Rosca, P., Zwi-Ran, S. R. & Neumark, Y. Schizophrenia or
855 schizoaffective disorder? A 50-year assessment of diagnostic stability based on a national
856 case registry. *Schizophr. Res.* **252**, 110–117 (2023).
- 857 6. Laursen, T. M. & Munk-Olsen, T. A Comparison of Selected Risk Factors for Unipolar
858 Depressive Disorder, Bipolar Affective Disorder, Schizoaffective Disorder, and
859 Schizophrenia From a Danish Population-Based Cohort. *J. Clin. Psychiatry* **68**, 1673–1681
860 (2007).

- 861 7. Cardno, A. G. & Owen, M. J. Genetic relationships between schizophrenia, bipolar disorder,
862 and schizoaffective disorder. *Schizophr. Bull.* **40**, 504–515 (2014).
- 863 8. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Identification of risk loci
864 with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet*
865 *Lond. Engl.* **381**, 1371–1379 (2013).
- 866 9. Goes, F. S., Sanders, L. L. O. & Potash, J. B. The genetics of psychotic bipolar disorder.
867 *Curr. Psychiatry Rep.* **10**, 178–189 (2008).
- 868 10. Squarcina, L., Fagnani, C., Bellani, M., Altamura, C. A. & Brambilla, P. Twin studies for the
869 investigation of the relationships between genetic factors and brain abnormalities in bipolar
870 disorder. *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* **25**, 515–520 (2016).
- 871 11. Sullivan, P. F., Kendler, K. S. & Neale, M. C. Schizophrenia as a complex trait: evidence
872 from a meta-analysis of twin studies. *Arch. Gen. Psychiatry* **60**, 1187–1192 (2003).
- 873 12. Mullins, N. *et al.* Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder
874 cases provides new insights into the underlying biology. *Nat. Genet.* **53**, 817–829 (2021).
- 875 13. The Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke, S.,
876 Walters, J. T. & O'Donovan, M. C. *Mapping Genomic Loci Prioritises Genes and Implicates*
877 *Synaptic Biology in Schizophrenia*.
878 <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.09.12.20192922> (2020)
879 doi:10.1101/2020.09.12.20192922.
- 880 14. Bennett, F. C. & Molofsky, A. V. The immune system and psychiatric disease: a basic
881 science perspective. *Clin. Exp. Immunol.* **197**, 294–307 (2019).
- 882 15. Maes, M., Plaimas, K., Suratane, A., Noto, C. & Kanchanatawan, B. First Episode
883 Psychosis and Schizophrenia Are Systemic Neuro-Immune Disorders Triggered by a Biotic
884 Stimulus in Individuals with Reduced Immune Regulation and Neuroprotection. *Cells* **10**,
885 2929 (2021).
- 886 16. Shafiee-Kandjani, A. R. *et al.* MicroRNAs and pro-inflammatory cytokines as candidate
887 biomarkers for recent-onset psychosis. *BMC Psychiatry* **23**, 631 (2023).

- 888 17. Sundquist, K., Memon, A. A., Palmér, K., Sundquist, J. & Wang, X. Inflammatory proteins
889 and miRNA-144-5p in patients with depression, anxiety, or stress- and adjustment disorders
890 after psychological treatment. *Cytokine* **146**, 155646 (2021).
- 891 18. Beveridge, N. J., Gardiner, E., Carroll, A. P., Tooney, P. A. & Cairns, M. J. Schizophrenia is
892 associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol. Psychiatry* **15**, 1176–
893 1189 (2010).
- 894 19. Kim, Y. *et al.* Bipolar Disorder Associated microRNA, miR-1908-5p, Regulates the
895 Expression of Genes Functioning in Neuronal Glutamatergic Synapses. *Exp. Neurobiol.* **25**,
896 296–306 (2016).
- 897 20. Beveridge, N. J. & Cairns, M. J. MicroRNA dysregulation in schizophrenia. *Neurobiol. Dis.*
898 **46**, 263–271 (2012).
- 899 21. Fries, G. R., Carvalho, A. F. & Quevedo, J. The miRNome of bipolar disorder. *J. Affect.*
900 *Disord.* **233**, 110–116 (2018).
- 901 22. Kaurani, L. *et al.* Baseline levels of miR-223-3p correlate with the effectiveness of
902 electroconvulsive therapy in patients with major depression. *Transl. Psychiatry* **13**, 294
903 (2023).
- 904 23. Pérez-Rodríguez, D. *et al.* MiRNA Differences Related to Treatment-Resistant
905 Schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 1891 (2023).
- 906 24. Żurawek, D. & Turecki, G. The miRNome of Depression. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11312 (2021).
- 907 25. Kaurani, L. *et al.* Regulation of Zbp1 by miR-99b-5p in microglia controls the development of
908 schizophrenia-like symptoms in mice. *EMBO J.* (2024) doi:10.1038/s44318-024-00067-8.
- 909 26. Gusev, A. *et al.* Integrative approaches for large-scale transcriptome-wide association
910 studies. *Nat. Genet.* **48**, 245–252 (2016).
- 911 27. Lonsdale, J. *et al.* The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **45**, 580–
912 585 (2013).
- 913 28. Bhattacharya, A., Ziebarth, J. D. & Cui, Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms
914 in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic*
915 *Acids Res.* **42**, D86–D91 (2014).

- 916 29. John, J. *et al.* Association study of MiRSNPs with schizophrenia, tardive dyskinesia and
917 cognition. *Schizophr. Res.* **174**, 29–34 (2016).
- 918 30. Budde, M. *et al.* A longitudinal approach to biological psychiatric research: The PsyCourse
919 study. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **180**, 89–102 (2019).
- 920 31. Kang, W. *et al.* miRTrace reveals the organismal origins of microRNA sequencing data.
921 *Genome Biol.* **19**, 213 (2018).
- 922 32. Chaumette, T. *et al.* Monocyte Signature Associated with Herpes Simplex Virus
923 Reactivation and Neurological Recovery After Brain Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*
924 (2022) doi:10.1164/rccm.202110-2324OC.
- 925 33. Hoffman, G. E. *et al.* CommonMind Consortium provides transcriptomic and epigenomic
926 data for Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Sci. Data* **6**, 180 (2019).
- 927 34. Juzenas, S. *et al.* A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral
928 blood. *Nucleic Acids Res.* **45**, 9290–9301 (2017).
- 929 35. Fang, C. *et al.* Massively parallel sequencing of microRNA in bloodstains and evaluation of
930 environmental influences on miRNA candidates using realtime polymerase chain reaction.
931 *Forensic Sci. Int. Genet.* **38**, 32–38 (2019).
- 932 36. Huan, T. *et al.* Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is
933 associated with all-cause mortality and age-related traits. *Aging Cell* **17**, e12687 (2018).
- 934 37. Wang, Y. *et al.* Screening of schizophrenia associated miRNAs and the regulation of miR-
935 320a-3p on integrin β 1. *Medicine (Baltimore)* **98**, e14332 (2019).
- 936 38. Ying, S., Heung, T., Zhang, Z., Yuen, R. K. C. & Bassett, A. S. Schizophrenia Risk Mediated
937 by microRNA Target Genes Overlapped by Genome-Wide Rare Copy Number Variation in
938 22q11.2 Deletion Syndrome. *Front. Genet.* **13**, 812183 (2022).
- 939 39. Endicott, J. The Global Assessment Scale: A Procedure for Measuring Overall Severity of
940 Psychiatric Disturbance. *Arch. Gen. Psychiatry* **33**, 766 (1976).
- 941 40. Gardiner, E. *et al.* Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-
942 associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells. *Mol. Psychiatry* **17**,
943 827–840 (2012).

- 944 41. Huang, Z. *et al.* HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA–
945 disease associations. *Nucleic Acids Res.* **47**, D1013–D1017 (2019).
- 946 42. Jiang, Q. *et al.* miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in
947 human disease. *Nucleic Acids Res.* **37**, D98–D104 (2009).
- 948 43. Zhu, W. & Zhang, X. Research progress of miRNA in different depression model samples.
949 *Adv. Eng. Technol. Res.* **1**, 497 (2022).
- 950 44. Tokar, T. *et al.* mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions.
951 *Nucleic Acids Res.* **46**, D360–D370 (2018).
- 952 45. Geaghan, M. & Cairns, M. J. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry.
953 *Biol. Psychiatry* **78**, 231–239 (2015).
- 954 46. Huang, Z.-X., Chen, Y., Guo, H.-R. & Chen, G.-F. Systematic Review and Bioinformatic
955 Analysis of microRNA Expression in Autism Spectrum Disorder Identifies Pathways
956 Associated With Cancer, Metabolism, Cell Signaling, and Cell Adhesion. *Front. Psychiatry*
957 **12**, 630876 (2021).
- 958 47. Marrale, M., Albanese, N. N., Cali, F. & Romano, V. Assessing the Impact of Copy Number
959 Variants on miRNA Genes in Autism by Monte Carlo Simulation. *PLoS ONE* **9**, e90947
960 (2014).
- 961 48. Vaishnavi, V., Manikandan, M., Tiwary, B. K. & Munirajan, A. K. Insights on the Functional
962 Impact of MicroRNAs Present in Autism-Associated Copy Number Variants. *PLoS ONE* **8**,
963 e56781 (2013).
- 964 49. Satoh, J., Kino, Y. & Niida, S. MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood
965 Biomarkers for Alzheimer’s Disease from Public Data. *Biomark. Insights* **10**, BMI.S25132
966 (2015).
- 967 50. Bame, M., McInnis, M. G. & O’Shea, K. S. MicroRNA Alterations in Induced Pluripotent
968 Stem Cell-Derived Neurons from Bipolar Disorder Patients: Pathways Involved in Neuronal
969 Differentiation, Axon Guidance, and Plasticity. *Stem Cells Dev.* **29**, 1145–1159 (2020).
- 970 51. Panja, D., Li, Y., Ward, M. E. & Li, Z. miR-936 is Increased in Schizophrenia and Inhibits
971 Neural Development and AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission. *Schizophr.*
972 *Bull.* **47**, 1795–1805 (2021).

- 973 52. Zhao, D. *et al.* MicroRNA Profiling of Neurons Generated Using Induced Pluripotent Stem
974 Cells Derived from Patients with Schizophrenia and Schizoaffective Disorder, and 22q11.2
975 Del. *PLOS ONE* **10**, e0132387 (2015).
- 976 53. Swathy, B. & Banerjee, M. Understanding Pharmaco-Epigenomic Response of
977 Antipsychotic Drugs Using Genome-Wide MicroRNA Expression Profile in Liver Cell Line.
978 *Front. Mol. Neurosci.* **15**, 786632 (2022).
- 979 54. Hornik, K., Stinchcombe, M. & White, H. Multilayer feedforward networks are universal
980 approximators. *Neural Netw.* **2**, 359–366 (1989).
- 981 55. Cohen, J. Weighted kappa: Nominal scale agreement provision for scaled disagreement or
982 partial credit. *Psychol. Bull.* **70**, 213–220 (1968).
- 983 56. Cohen, J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ. Psychol. Meas.* **20**, 37–46
984 (1960).
- 985 57. Zhao, Z. *et al.* Altered expression of microRNA-223 in the plasma of patients with first-
986 episode schizophrenia and its possible relation to neuronal migration-related genes. *Transl.*
987 *Psychiatry* **9**, 289 (2019).
- 988 58. Ramocki, M. B. & Zoghbi, H. Y. Failure of neuronal homeostasis results in common
989 neuropsychiatric phenotypes. *Nature* **455**, 912–918 (2008).
- 990 59. Zhang, X. *et al.* Role of Astrocytes in Major Neuropsychiatric Disorders. *Neurochem. Res.*
991 **46**, 2715–2730 (2021).
- 992 60. Madre, M. *et al.* Structural abnormality in schizophrenia versus bipolar disorder: A whole
993 brain cortical thickness, surface area, volume and gyrification analyses. *NeuroImage Clin.*
994 **25**, 102131 (2020).
- 995 61. Kim, Y., Santos, R., Gage, F. H. & Marchetto, M. C. Molecular Mechanisms of Bipolar
996 Disorder: Progress Made and Future Challenges. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 30 (2017).
- 997 62. Pfaffenseller, B. *et al.* Impaired endoplasmic reticulum stress response in bipolar disorder:
998 cellular evidence of illness progression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **17**, 1453–1463
999 (2014).
- 1000 63. Nelson, J. C. & Davis, J. M. DST studies in psychotic depression: a meta-analysis. *Am. J.*
1001 *Psychiatry* **154**, 1497–1503 (1997).

- 1002 64. Schumacher, M. M. & Santambrogio, J. Cortisol and the Dexamethasone Suppression Test
1003 as a Biomarker for Melancholic Depression: A Narrative Review. *J. Pers. Med.* **13**, 837
1004 (2023).
- 1005 65. Aberg, K. *et al.* Human QKI, a new candidate gene for schizophrenia involved in
1006 myelination. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc.*
1007 *Psychiatr. Genet.* **141B**, 84–90 (2006).
- 1008 66. Jiang, L., Saetre, P., Radomska, K. J., Jazin, E. & Lindholm Carlström, E. QKI-7 regulates
1009 expression of interferon-related genes in human astrocyte glioma cells. *PLoS One* **5**, e13079
1010 (2010).
- 1011
- 1012

1 Supplementary methods

2 Methods

3 **The PsyCourse Study**

4 Data and samples used for these analyses were obtained from the PsyCourse Study, a
5 longitudinal, multisite, observational transdiagnostic study that was conducted at in Germany
6 and Austria within the frameworks of the Clinical Research Group 241 (KFO241 consortium;
7 www.kfo241.de) and the PsyCourse consortium (www.psycourse.de). The study design has been
8 described in detail elsewhere (PMID: 30070057; <https://doi.org/10.5282/ubm/data.199>). The
9 official period of data collection was from January 2012 through December 2019. Extensive
10 phenotype data were collected in adult participants (>18 years) at up to four assessments, each
11 about 6 months apart. Participants are either clinical participants with a diagnosis from the
12 affective-to-psychotic spectrum or neurotypic (control) participants. Clinical participants were
13 former and current in- and outpatients of the respective psychiatric clinics at twenty clinical
14 centers. At baseline, diagnoses of clinical participants were made according to DSM-IV.
15 Neurotypic participants were recruited at three clinical centers and screened for lifetime
16 occurrence (hospitalization) of the target diagnoses of the clinical participants. At each visit,
17 blood samples were taken which allowed to obtain the smallRNAome and genotype information
18 used in our study. The study protocol was approved by the respective ethics committee for each
19 study center and was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki. All study
20 participants provided written informed consent.

21 22 **Broad Diagnosis Group Classification**

23 Broad diagnostic groups were defined using the DSM-IV diagnoses obtained at the first visit of the
24 PsyCourse Study. In total, we defined 3 groups, including a control group (CTL) composed of
25 neurotypic participants, a psychotic group (PSY) composed of participants diagnosed of

26 schizophrenia (SCZ) or schizo-affective disorder (SCZA), the last affective group (AFF) was
27 composed of participants with bipolar disorder (BD) I or II and participants with recurrent major
28 depressive disorder (MDD).

29 **Genotyping and imputation**

30 Individuals were genotyped using the Illumina Infinium Global Screening Array-24 Kit (GSA Array,
31 version 1 and 3; Illumina, San Diego, CA). Quality Control (QC) of genotype data was conducted
32 in PLINK v1.90b6.16 or higher (<https://www.cog-genomics.org/plink/>). Briefly, the sequence of
33 these QC steps was: Removal of SNPs with call rates <98% or a minor allele frequency (MAF)
34 <0.5%, removal of individuals with genotyping rates <98%, identification and exclusion of
35 duplicate and related samples, identification and exclusion of population ancestry outliers,
36 identification and exclusion of individuals with excess heterozygosity, exclusion of sex
37 chromosomes, identification and exclusion of SNPs not fulfilling the Hardy-Weinberg equilibrium
38 criterion and the required minimum MAF (<1%), removal of palindromic SNPs, removal of SNPs
39 with a large deviation (>10%) from the expected frequency in European reference populations
40 (1000 Genomes Project). These steps included the calculation of ancestry multi-dimensional
41 scaling (MDS) components. After these steps, the full dataset contained 1,600 individuals and
42 428,907 SNPs. Subsequently, data were imputed using the Michigan Imputation Server
43 (imputationserver.sph.umich.edu)¹, after comparing allele frequencies in the Haplotype
44 Reference Consortium (HRC) reference panel to identify and remove genetic variants with an
45 outstanding difference in frequency (>20%), or not matching the HRC panel regarding position or
46 alleles. The final imputed dataset contained N=1,600 individuals and 7,712,287 SNPs. The post-
47 imputation reference genome used was that of the Haplotype Reference Consortium (version r1.1
48 2016) (hg19)².

49 **miRNA transcriptome**

50 SmallRNAs sequencing of the PsyCourse Study has been described previously³. Briefly, the whole
51 blood samples were collected during the first visit of the PsyCourse Study, the miRNA libraries

52 were prepared using NEBNext Small RNA library preparation kit (E7330) and sequenced using
53 TruSeq Small RNA kit as described in ⁴⁵. We considered the miRNAs with 5 or more reads on at
54 least half the samples as being expressed.

55 QC were realized using FastQC v0.12.1 and miRTrace v1.0.0 ⁵. Sequenced reads were mapped to
56 the hg38 genome using mirdeep2 v2.0.1.2 and bowtie v1.3.1. More exactly, we used the mapper.pl
57 command of mirdeep2 with the default settings to make the alignment while discarding reads with
58 less than 18 nucleotides then, we used mirdeep2 quantifier.pl command to quantify the human
59 miRNAs in the version 22 of miRBase. Samples that generated warnings when analysed by the
60 miRTrace pipeline were removed from further analysis. We also removed samples of participants
61 diagnosed with “Brief Psychotic Disorder” or “Schizophreniform Disorder”. Then, we filtered the
62 miRNAs to keep only those with 5 or more reads on at least half the samples as being expressed.
63 Leaving a total of 495 expressed miRNA and 1476 samples.

64 For validation purpose, we sequenced the mRNAs of 43 PBMC samples (11 affective, 14
65 Psychotic, 18 controls) collected at a new recruitment of the PsyCourse Study participants for the
66 MulioBio project. Assay was carried out as in ⁶. Briefly, the libraries were prepared from 10 ng of
67 total RNA. The mRNA poly(A) tails were tagged with universal adapters, well-specific barcodes,
68 and unique molecular identifiers during template-switching reverse transcription. Barcoded
69 complementary DNAs from multiple samples were then pooled, amplified, and tagmented using
70 a transposon fragmentation approach which enriches for 3' ends of complementary DNA. A
71 library of 350 to 800 bp was run on a 100-cycle S1 v1.5 run on Nova seq6000 at the Genomics
72 Atlantic platform (Nantes) platform facility (Nantes). An average of 5 million 75 bp single-end
73 reads were obtained for each sample. Samples were demultiplexed and aligned to the hg38
74 genome using the DGE bioinformatics pipeline ⁷

75 **DGE and TWAS analysis**

76 For our DGE analysis, we divided the PsyCourse samples in two discovery (N=456) and validation
77 (N=1020) sets. the DESeq2 R package was used to identify DE miRNAs between broad diagnosis
78 groups including a “Control” group (control participants), the “Affective” group (Type I or Type II
79 BD and MDD), and the “Psychotic” group (SCZ and SCZA).

80 For the TWAS analysis, we used samples for which we had miRNAome and genotype data to
81 realize a discovery (N=402) and a validation TWAS (N=926) using the FUSION R software and
82 GWAS summary data of SCZ⁸ and BD⁹ downloaded on the PGC consortium.

83 For both analyses, we corrected for age, sex, and sequencing batch, we filtered the TWAS models
84 of the miRNA with a significant heritability ($p \leq 0.05$) in at least one of the discovery or validation
85 samples groups, and we defined statistically significant miRNAs as those with an adjusted TWAS
86 p-value ≤ 0.05 (BH) inferior to 0.05 and a similar TWAS z-score (for the TWAS) or a similar log2
87 fold change (for the DGE analysis).

88 The TWAS analysis was performed using R3.6.2. All other analysis involving R were realized using
89 R4.2.3.

90 **Machine Learning**

91 Neural networks (NN), a type of machine learning (ML) algorithm that mimics brain structure
92 through layers of interconnected artificial neurons, enables the identification of miRNAs as
93 predictive markers for disease classification. This streamlined approach was chosen for its ability
94 to efficiently process and learn from miRNA expression data, thereby enhancing the precision of
95 disease state predictions. After training, the model's effectiveness can be evaluated using metrics
96 such as accuracy and kappa-score on a test set, pinpointing critical miRNAs for disease
97 differentiation. This approach was used to reveal miRNAs which may be associated with disease
98 state in a non-linear fashion¹⁰

99 We used *R* software (v4.3.1) with packages *tidymodels* (v.1.1.1) and *keras* (v2.13) for the creation
100 of classifiers. Discovery and validation samples were split separately in training set and test set
101 with the proportion of 75/25 with a stratification on disease status. Sets were then merged,
102 resulting in a training set (N= 698) and a test set (N= 237) for the Affective vs Control Model and a
103 training set (N= 659) and a test set (N= 222) for the Psychotic vs Control Model. Variables used
104 were the numbers of reads of each miRNA, age and sex. Variables were transformed by log2,
105 centered by abstracting the average of each count measured on the training set and scaled so that
106 the data has a standard deviation of 1. Algorithm used was a multilayer perceptron. Training was
107 performed on the training set with a k-fold resampling (with k = 5 and 10 repetitions with a
108 stratification based on disease status) on a cluster computer using *R* (v4.2.2). Performances of
109 the models were then measured of the test sets.

110 To test for overfitting, we retrained NN models while iterating on the size of the training set (20
111 to 90% by step of 10). We then plotted the AUROC obtained with the entire training and test set
112 (Supplementary Figure 3D).

113 **Result integration**

114 A list of possible gene target was created by getting the imputed target of the 494 miRNAs on
115 mirDIP (v5.2.3.1). This list of genes was then filtered to keep the genes expressed in two tissues:
116 whole blood and brain according to GTEx Portal on 07/2023. The Genotype-Tissue Expression
117 (GTEx) Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National
118 Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. For each analysis, the
119 target genes corresponding to outlined miRNAs were extracted. We kept genes that were targeted
120 in at least 2 analyses for the integration, and we verified which were the 10 most targeted mRNA
121 among the targets of all those genes.

122 GO were identified using *topGO* package (v2.52.0). They were clustered using *simplifyEnrichment*
123 package (v1.10.0) with similarity computed by Wang algorithm and clustering by binary-cut

124 algorithm. Clusters were named based on common parent GO. If names were too broad, we
125 specified it manually. Cluster composed of one GO were named after the GO.

126 PPI data was obtained from the STRING-database (v12.0) with a confidence score of 0.7. A
127 network was created from all genes contained in the 20 most significant GO. Disconnected nodes
128 were removed from the data. *Igraph* package (v1.5.1) with the Fruchterman-Reingold algorithm
129 was used to create the PPI for each broadgroup.

130 The most targeted genes (Figure 4G) were obtained by counting the number of miRNAs targeting
131 each gene.

132 **Gene expression validation**

133 We used PBMC transcriptomic data of the PsyCourse Study and asked for post-mortem brain
134 transcriptomic data mRNA from Dorsolateral prefrontal cortex (release 4) and Anterior Cingulate
135 Cortex (release 6) regions to the CommonMind consortium¹¹. For each dataset, we computed score
136 of expression of each GO cluster for each individual as the mean of the Z-scores of the genes
137 that compose the GO. We used student tests to compare the scores across the different broad
138 diagnosis groups.

139 **Gene Set Enrichment Analysis:**

140 GSEA was performed using the miRNAs target genes as sets and a list of those target genes ranked
141 according to the negative log₁₀ of the p-value multiplied by the fold change of the differential gene
142 expression analysis comparing control to patients with bipolar disorders or schizophrenia.

143 Alluvial and correlation plots.

144 **miRNA-mRNA expression correlation**

145 We computed Spearman correlation between miRNA expression and the corresponding mRNA
146 expression of the same individuals. We filtered the correlation to identify, in each of the “affective
147 only” and “psychotic only” target genes sets, the pairs with the most negative correlation. We then

148 represented those genes and the associated miRNA with alluvial plots and scatters plot that
149 compare the correlations for the different categories affective, psychotic, and control.

150 References

151

152 1. Das, S. *et al.* Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat. Genet.* **48**,
153 1284–1287 (2016).

154 2. the Haplotype Reference Consortium. A reference panel of 64,976 haplotypes for genotype
155 imputation. *Nat. Genet.* **48**, 1279–1283 (2016).

156 3. Kaurani, L. *et al.* A Novel miR-99b-5p- Zbp1 Pathway in Microglia Contributes to the
157 Pathogenesis of Schizophrenia. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.03.21.533602>
158 (2023) doi:10.1101/2023.03.21.533602.

159 4. Islam, M. R. *et al.* A microRNA signature that correlates with cognition and is a target against
160 cognitive decline. *EMBO Mol. Med.* **13**, e13659 (2021).

161 5. Kang, W. *et al.* miRTrace reveals the organismal origins of microRNA sequencing data.
162 *Genome Biol.* **19**, 213 (2018).

163 6. Chaumette, T. *et al.* Monocyte Signature Associated with Herpes Simplex Virus Reactivation
164 and Neurological Recovery After Brain Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2022)
165 doi:10.1164/rccm.202110-2324OC.

166 7. Charpentier, E. *et al.* 3' RNA Sequencing for Robust and Low-Cost Gene Expression Profiling.
167 <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/pex-1336/v1> (2021)
168 doi:10.21203/rs.3.pex-1336/v1.

169 8. The Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke, S.,
170 Walters, J. T. & O'Donovan, M. C. *Mapping Genomic Loci Prioritises Genes and Implicates*
171 *Synaptic Biology in Schizophrenia.*

172 <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.09.12.20192922> (2020)

173 doi:10.1101/2020.09.12.20192922.

174 9. Mullins, N. *et al.* Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder cases

175 provides new insights into the underlying biology. *Nat. Genet.* **53**, 817–829 (2021).

176 10. Hornik, K., Stinchcombe, M. & White, H. Multilayer feedforward networks are universal

177 approximators. *Neural Netw.* **2**, 359–366 (1989).

178 11. Hoffman, G. E. *et al.* CommonMind Consortium provides transcriptomic and epigenomic

179 data for Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Sci. Data* **6**, 180 (2019).

180

3.2 Projet n°2: Classification semi-supervisée à l'aide de mesures longitudinales de la sévérité des symptômes

Un article intitulé **Disease Severity Across Psychiatric Disorders Is Linked to Pro-Inflammatory Cytokines** résumant les résultats de ce projet a été écrit durant ma thèse. Avec mes collaborateurs, nous allons le soumettre à American Journal of Psychiatry (AJP). La version que j'inclus risque d'être différente de la version publiée si des modifications seront demandées lors de l'étape de relecture.

L'objectif de cette étude était d'utiliser les données de l'évolution des troubles psychiatriques pour classer les patients en fonction de la progression de leurs troubles indépendamment de leurs diagnostics. J'ai contribué à ce projet en réalisant une classification semi-supervisée des individus de l'équipe PsyCourse en utilisant uniquement les données longitudinales sur la sévérité des symptômes, indépendamment des diagnostics pour identifier deux groupes de patients qui diffèrent par la sévérité de leurs symptômes. Pour cela, j'ai regroupé les variables à ma disposition en 5 groupes:

1. Les symptômes de dépression représentés par les items de l'IDS-C₃₀
2. Les symptômes de manie représentés par les items de l'échelle d'évaluation de la manie de Young ou en anglais; Young Mania Rating Scale (YMRS)
3. Les symptômes de la SCZ représentés par les items du PANSS
4. Les performances cognitives représentées par 8 variables correspondant aux scores, temps, et nombre d'erreur réalisés lors de tests neurocognitifs.
5. Le fonctionnement psychologique représenté par l'EGF, le nombre de traitements (antipsychotiques, antidépresseurs, et stabilisateurs de l'humeur), et si le participant est ou non en couple.

La présence de traumatismes lors de l'enfance n'a pas été utilisée car elle n'a été mesurée qu'une seule fois lors de la 3^{ème} visite de l'étude PsyCourse. De même, l'indice de masse corporelle n'a pas été utilisé car il n'a pas été mesuré à toutes les visites pour chaque participant.

Après avoir identifié ces groupes, j'ai comparé leurs phénotypes pour m'assurer qu'ils présentent une différence de sévérité. J'ai ensuite analysé leurs méthylome, miRNAome, et protéomes pour identifier des signatures biologiques associés à la sévérité des TPS. J'ai également participé à l'écriture de cet article.

Disease Severity Across Psychiatric Disorders Is Linked to Pro-Inflammatory Cytokines

Pierre Solomon^{1*}, Monika Budde^{2*}, Mojtaba Oraki Kohshour^{2,3}, Kristina Adorjan^{2,4}, Maria Heilbronner², Alba Navarro-Flores^{2,5}, Sergi Papiol^{2,6}, Daniela Reich-Erkelenz², Eva C. Schulte^{2,7-10}, Fanny Senner^{2,7,11}, Thomas Vogl², Lalit Kaurani¹², Dennis M. Krüger¹², Farahnaz Sananbenesi¹³, Tonatiuh Pena¹², Susanne Burkhardt¹², Anna-Lena Schütz¹³, Ion-George Anghelescu¹⁴, Volker Arolt¹⁵, Bernhardt T. Baune¹⁶⁻¹⁸, Udo Dannlowski¹⁵, Detlef E. Dietrich¹⁹⁻²¹, Andreas J. Fallgatter^{22,23}, Christian Figge²⁴, Georg Juckel²⁵, Carsten Konrad²⁶, Fabian U. Lang²⁷, Jens Reimer^{28,29}, Eva Z. Reininghaus³⁰, Max Schmauß³¹, Carsten Spitzer³², Jens Wiltfang³³⁻³⁵, Jörg Zimmermann³⁶, André Fischer^{12, 33,37}, Peter Falkai^{7,6,10}, Thomas G. Schulze^{2,38,39,10}, Urs Heilbronner^{2,40#}, Jeremie Poschmann^{1,40,#}

Affiliations:

1. Nantes Université, CHU-Nantes, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, 44000, Nantes, France.
2. Institute of Psychiatric Phenomics and Genomics (IPPG), LMU University Hospital, LMU Munich, Munich, 80336, Germany
3. Department of Immunology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4. University Hospital of Psychiatry and Psychotherapy, University of Bern, Bern, Switzerland
5. International Max Planck Research School for Translational Psychiatry (IMPRS-TP), Munich, Germany
6. Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany
7. Department of Psychiatry and Psychotherapy, LMU University Hospital, LMU Munich, Munich, 80336, Germany
8. Department of Psychiatry and Psychotherapy, Faculty of Medicine and University Hospital Bonn, University of Bonn, Bonn, 53127, Germany
9. Institute of Human Genetics, University Hospital, Faculty of Medicine, University of Bonn, Bonn, Germany
10. German Center for Mental Health (DZPG), Partner Site Munich/Augsburg, Munich, Germany
11. Centres for Psychiatry Suedwuerttemberg, Ravensburg, 88214, Germany
12. German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Department for Epigenetics and Systems Medicine in Neurodegenerative Diseases, Göttingen 37075, Germany
13. Research Group for Genome Dynamics in Brain Diseases, German Center for Neurodegenerative Diseases, Göttingen, Germany
14. Department of Psychiatry and Psychotherapy, Mental Health Institute Berlin, Berlin, 14050, Germany

15. Institute for Translational Psychiatry, University of Münster, Münster, 48149, Germany
16. Department of Psychiatry, University of Münster, Münster, 48149, Germany
17. Department of Psychiatry, University of Melbourne, Melbourne, Australia
18. Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, Parkville, Australia
19. AMEOS Clinical Center Hildesheim, Hildesheim, 31135, Germany
20. Center for Systems Neuroscience (ZSN), Hannover, 30559, Germany
21. Department of Psychiatry, Medical School of Hannover, Hannover, 30625, Germany
22. Department of Psychiatry and Psychotherapy, Tübingen Center for Mental Health (TüCMH), University of Tübingen, Tübingen, 72076, Germany
23. German Center for Mental Health (DZPG), Partner Site Tübingen, Tübingen, 72076, Germany
24. Karl-Jaspers Clinic, European Medical School Oldenburg-Groningen, Oldenburg, 26160, Germany
25. Department of Psychiatry, Ruhr University Bochum, LWL University Hospital, Bochum, 44791, Germany
26. Department of Psychiatry and Psychotherapy, Agaplesion Diakonieklinikum, Rotenburg, 27356, Germany
27. Department of Psychiatry II, Ulm University, Bezirkskrankenhaus Günzburg, Günzburg, 89312, Germany
28. Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, 20246, Germany
29. Center for Psychosocial Medicine, Academic Teaching Hospital Itzehoe, Itzehoe, Germany
30. Division of Psychiatry and Psychotherapeutic Medicine, Research Unit for Bipolar Affective Disorder, Medical University of Graz, Graz, 8036, Austria
31. Clinic for Psychiatry, Psychotherapy and Psychosomatics, Augsburg University, Medical Faculty, Bezirkskrankenhaus Augsburg, Augsburg, 86156, Germany
32. Department of Psychosomatic Medicine and Psychotherapy, University Medical Center Rostock, Rostock, 18147, Germany
33. Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Göttingen, Göttingen, 37075, Germany
34. German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Göttingen, 37075, Germany
35. Neurosciences and Signaling Group, Institute of Biomedicine (iBiMED), Department of Medical Sciences, University of Aveiro, Aveiro, Portugal
36. Psychiatrieverbund Oldenburger Land GMBH, Karl-Jaspers-Klinik, Bad Zwischenahn, 26160, Germany
37. Cluster of Excellence "Multiscale Bioimaging: from Molecular Machines to Networks of Excitable Cells" (MBExC), University of Göttingen, Germany

38. Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY, USA
39. Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA
40. correspondence should be addressed to jeremie.poschmann@univ-nantes.fr or Urs.Heilbronner@med.uni-muenchen.de

* These authors contributed equally

These authors directed the study

Disclosure:

Volker Arolt has been working as a counselor for Sanofi-Aventis Germany and Springer-Nature Verlag, Germany.

Ion-George Anghelescu has served as a counselor, advisor or CME speaker for the following entities: Aristo Pharma, Janssen Pharmaceutica, Merck, Dr. Willmar Schwabe, Recordati Pharma.

Jens Wiltfang acted as a consultant for Immungenetics, Noselab, Roboscreen, served on a scientific advisory board for Abbott, Biogen, Boehringer Ingelheim, Lilly, Immungenetics, MSD Sharp-Dohme, Noselab, Roboscreen, Roche, and received honoraria for presentations by Beeijing Yibai Science and Technology Ltd, Eisai, Gloryren, Janssen, Pfizer, Med Update GmbH, Roche, Lilly.

Carsten Konrad has been working as advisor for Janssen Pharmaceuticals and received speakers honorary from Janssen, Lundbeck, Neuraxpharm, and Servier.

Peter Falkai is currently president of the WFSBP. Peter Falkai has been EPA president in 2022 and is a co-editor of the German (DGPPN) schizophrenia treatment guidelines and a co-author of the WFSBP schizophrenia treatment guidelines. Peter Falkai received speaking fees from Boehringer-Ingelheim, Janssen, Otsuka, Lundbeck, Recordati, and Richter and was a member of the advisory boards of these companies and Rovi.

Jörg Zimmermann served as an advisor for Biogen concerning Aducanumab (Alzheimer's Disease).

Acknowledgments:

This work is part of the MulioBio project funded by a NEURON-ERANET grant (JTC2019) and Pierre Solomon thesis co-funded by the region Pays de la Loire, France (order n°2020_10085). We are most grateful to the Genomics Core Facility GenoA and France Genomique, member of Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) for the use of their resources and their technical support.

TGS and PF are supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within the framework of the projects www.kfo241.de and www.PsyCourse.de (SCHU 1603/4-1, 5-1, 7-1; FA241/16-1). TGS is further supported by the Dr. Lisa Oehler Foundation (Kassel, Germany), IntegraMent (01ZX1614K), BipoLife (01EE1404H), e:Med Program (01ZX1614K), GEPI-BIOPSY (01EW2005), MulioBio (01EW2009). This work was endorsed

by German Center for Mental Health (DZPG; to PF and TGS, FKZ: 01EE2303A, 01EE2303F). UH was supported by European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (PSY-PGx, grant agreement No 945151) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation, project number 514201724). EXC 2067/1 390729940. FS was supported by the GoBIO project miRassay from the BMBF. The study was endorsed by the Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung [BMBF]) within the initial phase of the German Center for Mental Health (DZPG) (grant: 01EE2303A, 01EE2303F to PF).

Kristina Adorjan, Monika Budde, Peter Falkai, Maria Heilbronner, Urs Heilbronner, Alba Navarro-Flores, Mojtaba Oraki Kohshour, Sergi Papiol, Daniela Reich-Erkelenz, Eva C. Schulte, Thomas G. Schulze, Fanny Senner, and Thomas Vogl are part of the PsyCourse core team.

Ion-George Anghelescu, Volker Arolt, Bernhardt T. Baune, Udo Dannlowski, Detlef E. Dietrich, Andreas J. Fallgatter, Christian Figge, Fabian Lang, Georg Juckel, Carsten Konrad, Jens Reimer, Eva Z. Reininghaus, Max Schmauß, Carsten Spitzer, Jens Wiltfang, and Jörg Zimmermann represent clinical centers involved in the recruitment and sample collection of the PsyCourse Study.

We would like to express our profound gratitude to all study participants without whom this work would not have been possible.

Abstract

Objective: Severe mental disorders (SMD), including schizophrenia, schizoaffective disorder, bipolar disorder, and major depressive disorder, are complex conditions with partly overlapping symptoms and shared risk factors. Traditional categorical diagnoses may not fully capture the heterogeneity and shared pathophysiology across these disorders. Therefore, this study aimed to identify transdiagnostic patient clusters based on disease severity and explore the underlying biological mechanisms.

Methods: We utilized data from 443 participants of the PsyCourse Study diagnosed with SMD, a longitudinal study with deep phenotyping across four visits. We performed longitudinal clustering to group patients based on symptom trajectories and cognitive performance. The two identified clusters were compared on cross-sectional variables, including independent measures of severity as well as polygenic risk scores, protein quantifications, miRNA expression, and DNA methylation.

Results: The two clusters did not differ significantly in age, sex, or diagnostic proportions but showed marked differences in illness severity. Inflammatory serum proteins were significantly different, indicating that disease severity is associated with a pro-inflammatory state.

Conclusion: Our findings demonstrate that transdiagnostic clustering can effectively differentiate patients based on illness severity. The association of disease severity with pro-inflammatory proteins highlights the potential role of inflammation in the pathophysiology of SMD. These results underscore the importance of considering illness severity in psychiatric research and clinical practice and suggest that targeting inflammatory pathways may offer novel therapeutic strategies for patients with SMD.

Keywords: severe mental disorders, transdiagnostic clustering, disease severity, inflammation, proteomics, PLAU, cognitive dysfunction, multi-omics analysis

Introduction

Severe mental disorders (SMD) such as schizophrenia (SCZ), schizoaffective disorder (SCZA), bipolar disorder (BD), and major depressive disorder (MDD), are complex and multifaceted syndromes that have common symptoms and risk factors(1). Many characteristics such as cognitive dysfunction, functional impairment, and psychiatric symptoms are shared among SMD. There is evidence from behavioral genetic and genome-wide association studies (GWAS) that SMD are heritable, with a common phenomic(2,3) and genomic basis(4). Different nosological frameworks have been proposed based on account for these commonalities, with RDoC and HiTOP(5) emphasizing dimensionality rather than categorical classification. Also, the DSM-5 is

now emphasizing dimensionality in addition to diagnostic categories. Moreover, multiple studies have associated SMD with a dysregulation of the immune system. For example, SMD are marked by an augmentation of pro-inflammatory proteins in the blood (6,7). Treatments of pro-inflammatory cytokines can induce SMD symptoms(8). The link between the immune system and SMD is so important that those disorders are recognized as neuroimmune disorders (9–11). However, a challenge that remains for clinicians, regardless of the diagnostic system used is how to differentiate individuals who will experience a severe form of psychopathology from milder cases. The gold standard is population-based longitudinal studies with a duration of several years or decades, ideally prior to disease onset. However, such studies are extremely challenging and costly to conduct and in the end most longitudinal studies have emphasized highly heterogeneous illness trajectories over time(12). Here, we take a different approach and instead focus on the short-term course of the five core aspects of SMD: cognitive dysfunction, functional impairment, psychotic, manic, and depressive symptoms. We take advantage of The PsyCourse Study(13), a deeply phenotyped longitudinal sample of the psychotic-to-affective spectrum, collected specifically for this purpose. To identify clusters of patients that differ in their longitudinal course, we used *longmixr* a R toolbox that enables longitudinal clustering of mixed data types(14,15). We identified two patient clusters that are similar in diagnostic proportions but exhibited distinct levels of severity. We then conducted comprehensive multi-omics analyses and found that proinflammatory cytokines are strongly associated with disease severity.

Methods

Participants data and samples were obtained from the PsyCourse Study (www.psycourse.de), a longitudinal, multisite, observational transdiagnostic study that was conducted in Germany and Austria within the Clinical Research Group 241 (KFO241 consortium; www.kfo241.de) (13). Participants provided written consent. Participants attended up to four visits evenly distributed over 18 months. With the aim to stratify participants independent of their diagnoses, we selected all participants diagnosed with SCZ, SCZA, BD, or MDD according to DSM-IV who participated in all visits (443 participants).

Longitudinal clustering

Clustering was performed using *longmixr* (14). First, longitudinally measured phenotypic data were meaningfully divided into five groups. Each groups represent a different domain SMD, namely depressive symptoms, schizophrenia symptoms, manic symptoms, cognitive performance, and functioning. (For details see supplemental material).

Missing values were imputed (n=5; R package *Amelia*). To reduce dimensionality within each group of variables, *longmixr* applies factorial analysis of mixed data (FAMD). The

first component from each FAMD was corrected for the effects of age and sex, and then used for consensus clustering (1000 repetitions) (Figure 1A).

Phenotypic characterization of the clusters

To validate the clustering, we compared the clusters for the sums of the scales and the scores of neuropsychological tests used for clustering. To ensure that there were no biases, we checked for differences in age, sex, and diagnosis.

We also compared the clusters on three severity indicators not used for clustering: Operational Criteria Checklist for Psychotic and Affective Illness (OPCRIT) item 90 (16), the body mass index (BMI), and childhood trauma.

OPCRIT is a standardized diagnostic that provides detailed symptom ratings and operationally defined diagnoses based on established criteria. At the fourth visit OPCRIT was rated, assessing the disease course on an ordinal scale from “single episode with good remission” to “ongoing chronic disease with deterioration”.

Childhood trauma was assessed with the Childhood Trauma Screener (17).

Statistics were applied, using X^2 tests for categorical variables, T tests for single visit measurements, and ANOVA for multiple time-points. Analysis and figures were realized with *rstatix* and *ggplot2* R packages.

Polygenic risk score analysis (PRS)

To assess whether genetics contributed to the differences in clusters, we compared PRS for MDD, BD, and SCZ and for antipsychotic treatment resistance and a general genetic predisposition for psychopathology (P-factor) (18,19). Genotyping was described previously (20). (for details see supplemental material).

Multiomics analysis

Propensity score matching was used control for age, sex, and diagnosis across clusters. Serum from the first visit was used to quantify 384 proteins in 176 participants using Olink Explore Inflammation panel. The *OlinkAnalyze* package was used for QC. Proteins were compared using T tests, followed by a Gene Ontology (GO) analysis to identify biological pathways. Spearman correlations were computed between the normalized expression values of proteins (NPX) and variables from neuropsychological tests (Trail Making Test A (TMT-A) and B (TMT-B) (time), Verbal digit span forward (DGT_SP_FRW), Verbal digit span backward (DGT_SP_BW), Digit-Symbol-Test (DST)) and age of the participants

To account for age, we selected proteins with one significant correlation with a test variable and recomputed partial correlations between proteins and each test.

For DNA methylation analysis 192 participants were analyzed (Illumina EPIC V2). The ages were imputed using the *methylclock* package and probes were filtered out if

variance <0.05 resulting in 693 probes. Differential analysis was performed with *minfi* and *limma* packages while adjusting for age and sex.

The miRNAome was obtained from the first visit of PsyCourse and processed as previously described(20,21). *DESeq2* compared the two clusters while adjusting for age, sex, and sequencing batches. Multiple hypothesis correction (Benjamini-Hochberg) was used.

Results

Longitudinal clustering of participants

Our aim was to characterize the study samples independently of their ascertained DSM-IV diagnoses (Figure 1A, Methods, Table I). We explored different clustering solutions and used the cumulative distribution function (CDF) to determine the optimal number of clusters (Figure 1B). The CDF indicated that the two-cluster solution was optimal, as it demonstrated better binary separation characterized by a flatter curve with steep ascents at 0 and 1 (14).

The clusters showed significant differences across various symptom scales and neuropsychological assessments. Cluster B had higher scores on schizophrenia, manic and depressive symptoms (Figure 1C-E). They also showed poorer functioning scores (Figure 1F).

In addition, patients in Cluster B performed worse for cognition, i.e. they had a higher error rate on the TMT Part B with longer completion times (for both Parts A and B) and had lower scores for Verbal Digit Span (VDS) tests, and DST (Figure 1G-H; Supplementary Figures 1A-E).

In summary, Cluster B consists of participants with a higher illness severity compared to cluster A.

Our clustering algorithm used longitudinal data from these symptom scales and neuropsychological tests to group patients based on their symptom trajectories and cognitive performance over time. Since the clusters were derived by analyzing patterns in these specific measures, it is logical that the resulting clusters would differ significantly on these variables. However, it is noteworthy that the differences across these diverse scales and tests converge in the same direction, consistently indicating greater severity in Cluster B. The convergence of these independent measures across different domains supports the conclusion that clustering differentiates patients primarily by severity.

Comparison of Cross-Sectional Phenotypic Variables

Since age and sex were regressed out during clustering, we anticipated that these variables would not differ significantly between clusters. Indeed, there were no significant differences in age (Figure 1I; *t*-test *p*-value = 0.36) or sex (Figure 1J; χ^2 *p*-value = 0.46). Importantly, the clusters did not differ significantly in the proportions of diagnoses among SCZ, SCZA, BD, and MDD (Figure 1K; χ^2 *p*-value = 0.18). Additionally, the proportions of male and female subjects in the clusters were also similar (Supplementary Figure 1F and Supplementary Table I, X^2 *p*_{adj} = 1 for each test). Age was also similar when stratified by sex and diagnosis individually, indicating that age and sex are similar in both clusters (Supplementary Figure 1G).

Comparison of Polygenic Profiles

To assess whether genetic factors contribute to the differences between our clusters, we used several PRS (see methods). We did not find significant differences between the clusters regarding PRS for MDD (Figure 2A; *t*-test adjusted *p*-value = 0.15), BD (Figure 2B; *t*-test adjusted *p*-value = 0.674), or SCZ (Figure 2C; *t*-test adjusted *p*-value = 0.894). Similarly, the sum of the PRS for these three disorders did not differ significantly between the clusters (Figure 2D; *t*-test adjusted *p*-value = 0.674). Furthermore, no significant differences were observed for SCZ treatment resistance PRS (Figure 2E; adjusted *p*-value = 0.674) or for the P factor PRS (Figure 2F; *t*-test adjusted *p*-value = 0.971).

Independent Measures of Severity

To further characterize the differences in severity between the clusters, we analyzed independent measures not used in the clustering process. We found a significant difference in the distribution of OPCRIT categories between the clusters (Figure 2G; χ^2 *p*-value < 0.001). Specifically, Cluster B had a higher proportion of patients experiencing partial remission or ongoing chronic illness compared to Cluster A, indicating a more severe illness trajectory.

Significant differences were found in BMI between the clusters (figure 2H, ANOVA *p*-value = 1e-07). However, there was no significant difference in the rate of BMI change over time between the clusters (*t*-test estimate=0.07; *p*-value = 0.33). Additionally, although not statistically significant, there was a trend toward a higher proportion of participants with a history of childhood trauma (CHT) in Cluster B compared to Cluster A (Figure 2I; χ^2 *p*-value = 0.07).

Multi-omics Analysis

To identify associated molecular alterations between the clusters we carried out 3 distinct molecular profiling approaches during the first visit for each patient group (Figure 3A).

miRNA Expression and Methylome Comparisons

We compared the miRNA profiles from the first visit of the PsyCourse Study of 125 participants (64 low-severity patients and 61 high-severity patients). PCA analysis did not reveal any major differences or batch effects (Supplemental figure 2A). Furthermore, none of the 465 miRNAs analysed were differentially expressed between the two groups, suggesting that miRNA expressions are unlikely to be associated with differences observed between the clusters (Figure 3B).

Similarly, we explored the methylomes of 192 patients using DNA samples (see supplemental figure 2B). We performed differential methylation analyses on the top variable methylation sites (see method). However, no methylation sites were significantly different between the groups (Figure 3C). To further investigate a possible relationship between DNA methylation and severity we explored whether epigenetic age acceleration was distinct between the clusters. The imputed epigenetic age correlated strongly with the actual age of the participants (Supplemental Figure 2C) and did not differ between the two groups (Figure 3D; Wilcoxon p-value = 0.44).

Proteomic Differences in a targeted inflammatory protein Panel

We characterized 363 circulating serum proteins, using the Olink Inflammatory panel (Supplementary Figure 3A). Comparing the 363 circulating proteins between the clusters revealed 25 down-regulated and 48 up-regulated proteins in the serum of the high-severity cluster compared to the low-severity cluster (Figure 4A). Top differential expressed proteins are illustrated to reveal that differences are not due to extreme outliers (Figure 4B). GO analyses were performed to identify biological pathways associated with these proteins. The down-regulated proteins were linked to six GO terms related to the regulation of cell adhesion and interleukin-13 (IL-13) production, a cytokine with anti-inflammatory properties(22) (Figure 4C). In contrast, the up-regulated proteins were associated with multiple GO terms indicative of a pro-inflammatory state, such as "response to interferon-gamma" and "response to interleukin-1" (Figure 4D). This indicates that a higher severity is associated with a deregulation of inflammation state.

Spearman correlations between protein expression levels and neuropsychological assessments identified 7 proteins correlated with at least one of the test variables (Supplementary Figure 3D). Notably, proteins up-regulated in the high-severity cluster were positively correlated with the time taken to complete the TMT-A and TMT-B and negatively correlated with the scores of the DST as well as VDS_FRW and VDS_BW. Conversely, the down-regulated proteins ENPP5 and CDON showed opposite correlations.

Many of the correlations between proteins and neuropsychological variables were accompanied by similar correlations with the age of the participants (10 proteins; Supplementary Figure 3D). To disentangle the effect of age on cognition, we calculated partial correlations between these proteins and the test variables, adjusting for age. This

resulted in nine significant correlations while controlling for age, with five of these correlations related to the PLAUR gene (Figure 4E). We further investigated the relationship between the expression of PLAUR and disease severity encoded by the ordered categories of the OPCRIT. A significant association was found (ANCOVA p -value < 0.001 after adjusting for age). We also identified differences between patients with ongoing chronic illness and those with good or partial remission (Wilcoxon Rank Sum test, p -value < 0.05 , Figure 4F-G).

Discussion

Transdiagnostic Clustering Reveals Severity Independent of Diagnosis

Our study leverages comprehensive longitudinal phenotyping over four visits to demonstrate that disease severity in severe mental disorders can be characterized independently of traditional diagnostic categories. By employing a transdiagnostic clustering approach, we identified patient groups that differ primarily in illness severity. While there were no significant differences in age and sex overall, we did observe a significant difference in the proportion of female patients with schizoaffective disorder between the clusters. This specific variance may be due to unique clinical features within this subgroup, but overall, the similar diagnostic proportions highlight that the clusters represent groups differentiated by severity across diagnostic categories.

This finding underscores the significant overlap in symptoms across disorders such as schizophrenia, schizoaffective disorder, bipolar disorder, and major depressive disorder, highlighting the limitations of categorical diagnoses in capturing the complexity of psychiatric conditions.

Overlapping Symptoms Support Dimensional Models of Psychopathology

The overlapping symptoms between different psychiatric disorders have been well-documented and suggest that common underlying mechanisms may contribute to disease manifestation(3,4). Cognitive dysfunction, functional impairment, and mood disturbances are prevalent across multiple diagnoses. Our results demonstrate that these shared symptoms coalesce to define severity levels that transcend diagnostic boundaries. This supports dimensional models of psychopathology, such as RDoC and HiTOP, which advocate for assessing mental disorders along continuous dimensions rather than discrete categories(23,24).

Independent Measures Confirm Robustness of Severity Classification

Importantly, we found that independent measures not used in the clustering process, especially the OPCRIT item and BMI also differed between the clusters, further confirming the robustness of our severity classification. The high-severity cluster had a higher proportion of patients experiencing partial remission or ongoing chronic illness according to the OPCRIT item, indicating a more severe overall illness trajectory.

Additionally, patients in the high-severity cluster exhibited higher BMI, which has been associated with increased psychiatric symptom severity, poorer cognitive performance and poorer clinical outcomes in patients with affective disorders (25,26). Weight gain is also a common side effect of antipsychotic treatment and is associated with poorer medication adherence in patients with schizophrenia, which increases the risk for recurrent illness episodes and poorer outcome long term(27). Although the difference in CHT was not statistically significant, there was a trend toward a higher proportion in the high-severity cluster, aligning with literature that associates CHT with more severe psychiatric outcomes(28,29). These independent measures, which were not part of the clustering variables, reinforce our finding that the clusters are differentiated primarily by severity.

No Associations of Transdiagnostic Severity profiles and Polygenic Scores

The genetic analysis revealed no significant differences in PRS for SCZ, BP, or MDD between the high-severity and low-severity clusters. This suggests that genetic variants identified in GWAS may be more closely associated with disease susceptibility rather than the severity of illness. In psychiatry, the largest GWAS focus on the risk of developing a disorder by comparing cases to controls, which may not capture genetic factors influencing the course or severity of the disease once it manifests. It is also possible that rare variants, structural variations, or gene–environment interactions play a more significant role in determining illness severity.

Proteomic Analysis Reveals Increased Inflammatory State Associated with Severity

Our proteomic analysis revealed that disease severity is associated with proteomic changes indicative of a pro-inflammatory state associated to psychiatric severity. Specifically, patients in the high-severity cluster showed up-regulation of proteins associated with pro-inflammatory pathways while anti-inflammatory pathways associated with IL-13 were down-regulated. This shift toward a pro-inflammatory profile suggests that systemic inflammation may be linked to increased illness severity in SMD. Given that cognitive dysfunction is a critical aspect of disease severity, we investigated whether the expression levels of these proteins were associated with cognitive performance. Our analysis identified 4 proteins that correlated with at least one neuropsychological test variable. It is noteworthy that some of these proteins have been previously associated with psychosis or nervous system development. For example, ENPP5 was found positively associated to intelligence by a Mendelian analysis (30), while negative association were found for the expression of PLAUR and CD4 (31,32). The CRIM1 gene is expressed in neurons and is implicated in central nervous system (CNS) development(33). Among them, PLAUR (plasminogen activator, urokinase receptor) deserves particular attention due to its multiple associations with cognitive function and neurological processes. Literature searches confirmed the association of PLAUR

expression with cognitive function in multiple studies. This gene is also expressed by microglial cells in the CNS. Its inactivation is known to induce changes in GABA A-receptor subunits, highlighting its importance in CNS development(34). Additionally, the urokinase plasminogen activator system, of which PLAUR is a part, is involved in leukocyte recruitment and breaching of the blood-brain barrier (BBB), with the soluble form of PLAUR in serum and cerebrospinal fluid being implicated in neurological disorders(35,36). Taken together, these findings demonstrate that disease severity is associated with proteomic changes indicative of a pro-inflammatory state.

Lack of Differences in miRNA and Methylation Profiles

In contrast to the proteomic findings, our analysis revealed no significant differences in miRNA expression or DNA methylation profiles between the high-severity and low-severity clusters. miRNA expression and DNA methylation are regulatory mechanisms that may require longer timescales to manifest significant changes. These epigenetic modifications are often more stable and may not fluctuate significantly over the short-term course captured in our study(37).

An important consideration is that our analyses of miRNA and DNA methylation were conducted using peripheral blood samples. While blood is accessible and can reflect systemic changes, it may not capture alterations occurring specifically in the brain. Significant epigenetic changes associated with psychiatric disorders may be present in neural tissue but remain undetected in peripheral samples. The brain and blood can have distinct epigenetic landscapes, and peripheral markers may not fully represent central nervous system processes. The lack of differences suggests that the proteomic alterations are not driven by changes at the transcriptional or epigenetic levels detectable in blood but may result from post-transcriptional regulation, protein stability, or external factors such as medication effects or environmental stressors.

Limitations of the Study

Despite the strengths of our comprehensive multi-omics approach and longitudinal design, our study has several limitations. First, the use of peripheral blood samples for miRNA and DNA methylation analyses may not accurately reflect brain-specific epigenetic changes associated with psychiatric disorders or be a consequence of lack of statistical power due to the sample size. Second, due to a reasonable but limited sample size in a homogenous (German and Austrian) population it is relevant to replicate our findings in larger and heterogenous populations in future studies.

Conclusion

In conclusion, our study emphasizes the importance of comprehensive, longitudinal phenotyping in capturing the complexity of SMD beyond categorical diagnoses. Our multi-omics analysis further reveals that increased disease severity is associated with a pro-inflammatory proteomic profile, potentially contributing to cognitive dysfunction.

Our work underscores the importance of considering illness severity as a key dimension in psychiatric research and clinical practice. Tailoring interventions based on severity rather than diagnosis alone may improve patient outcomes, and targeting inflammatory pathways—potentially through modulating proteins like PLAUR—could offer new therapeutic avenues for patients with SMD.

Author contribution

UH, TGS and JP designed the study. MB, KA, PF, MH, UH, ANF, MOK, SP, DRE, ECS, TGS, FS, TV, IGA, VA, BTB, UD, DED, AJF, CF, FL, GJ, CK, FL, JR, EZR, MS, CS, JW, and JZ contributed to acquisition and/or processing and/or managing of data (phenotype data and/or biological data). SP carried out the quality control of the genotyping, imputation and (in parts) PRS calculation. LK coordinated the RNA isolation and small-RNA-seq of the entire PsyCourse samples with the help of SB and ALS. DMK and TP contributed to the sequencing design and performed QC analysis. FS and AF planned the sequencing experiments. PS performed all analyses including the clustering, the omics comparisons and generated the figures. JP supervised the analyses. PS, UH, MB, JP & TGS wrote the first draft of the paper.

All authors contributed to revising and approving the final version of the manuscript.

References

1. Guloksuz S, Van Os J. The slow death of the concept of schizophrenia and the painful birth of the psychosis spectrum. *Psychol Med.* janv 2018;48(2):229-44.
2. Murray RM, Sham P, Van Os J, Zanelli J, Cannon M, McDonald C. A developmental model for similarities and dissimilarities between schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Research.* déc 2004;71(2-3):405-16.
3. Kaymaz N, Van Os J. Murray et al. (2004) revisited: is bipolar disorder identical to schizophrenia without developmental impairment?: Editorial. *Acta Psychiatrica Scandinavica.* 10 sept 2009;120(4):249-52.
4. Cardno AG, Owen MJ. Genetic relationships between schizophrenia, bipolar disorder, and schizoaffective disorder. *Schizophr Bull.* mai 2014;40(3):504-15.
5. Jonas KG, Cannon TD, Docherty AR, Dwyer D, Gur RC, Gur RE, et al. Psychosis superspectrum I: Nosology, etiology, and lifespan development. *Mol Psychiatry.* avr 2024;29(4):1005-19.
6. Osimo EF, Cardinal RN, Jones PB, Khandaker GM. Prevalence and correlates of low-grade systemic inflammation in adult psychiatric inpatients: An electronic health record-based study. *Psychoneuroendocrinology.* mai 2018;91:226-34.
7. Goldstein BI, Lotrich F, Axelson DA, Gill MK, Hower H, Goldstein TR, et al. Inflammatory Markers Among Adolescents and Young Adults With Bipolar Spectrum Disorders. *J Clin Psychiatry.* 25 nov 2015;76(11):1556-63.
8. Capuron L. Neurobehavioral Effects of Interferon- α in Cancer Patients Phenomenology and Paroxetine Responsiveness of Symptom Dimensions. *Neuropsychopharmacology.* mai 2002;26(5):643-52.
9. Chaves-Filho A, Eyres C, Blöbaum L, Landwehr A, Tremblay M. The emerging neuroimmune hypothesis of bipolar disorder: An updated overview of neuroimmune and microglial findings. *Journal of Neurochemistry.* 19 mars 2024;jnc.16098.
10. Hodes GE, Kana V, Menard C, Merad M, Russo SJ. Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci.* oct 2015;18(10):1386-93.
11. M A, Smyth, M S, Lawrie. The Neuroimmunology of Schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 28 déc 2013;11(3):107-17.
12. Heilbronner U, Samara M, Leucht S, Falkai P, Schulze TG. The Longitudinal Course of Schizophrenia Across the Lifespan: Clinical, Cognitive, and Neurobiological Aspects. *Harvard Review of Psychiatry.* mars 2016;24(2):118-28.
13. Budde M, Anderson-Schmidt H, Gade K, Reich-Erkelenz D, Adorjan K, Kalman JL, et al. A longitudinal approach to biological psychiatric research: The PsyCourse study. *Am J Med Genet.* mars 2019;180(2):89-102.

14. Hagenberg J, Budde M, Pandeva T, Kondofersky I, Schaupp SK, Theis FJ, et al. longmixr: a tool for robust clustering of high-dimensional cross-sectional and longitudinal variables of mixed data types. *Bioinformatics*. 29 mars 2024;40(4):btac137.
15. Schulte EC, Kondofersky I, Budde M, Papiol S, Senner F, Schaupp SK, et al. A novel longitudinal clustering approach to psychopathology across diagnostic entities in the hospital-based PsyCourse study. *Schizophr Res*. juin 2022;244:29-38.
16. McGuffin P. A Polydiagnostic Application of Operational Criteria in Studies of Psychotic Illness: Development and Reliability of the OPCRIT System. *Arch Gen Psychiatry*. 1 août 1991;48(8):764.
17. Grabe H, Schulz A, Schmidt C, Appel K, Driessen M, Wingenfeld K, et al. Ein Screeninginstrument für Missbrauch und Vernachlässigung in der Kindheit: der Childhood Trauma Screener (CTS). *Psychiatr Prax*. avr 2012;39(03):109-15.
18. Caspi A, Moffitt TE. All for One and One for All: Mental Disorders in One Dimension. *AJP*. 1 sept 2018;175(9):831-44.
19. Pardiñas AF, Smart SE, Willcocks IR, Holmans PA, Dennison CA, Lynham AJ, et al. Interaction Testing and Polygenic Risk Scoring to Estimate the Association of Common Genetic Variants With Treatment Resistance in Schizophrenia. *JAMA Psychiatry*. 1 mars 2022;79(3):260.
20. Poschmann J, Solomon P, Kaurani L, Budde M, Guiné JB, Krüger D, et al. Integrative Analysis of miRNA Expression Profiles Reveals Distinct and Common Molecular Mechanisms Underlying Broad Diagnostic Groups of Severe Mental Disorders [Internet]. 2024 [cité 25 sept 2024]. Disponible sur: <https://www.researchsquare.com/article/rs-4279982/v1>
21. Kaurani L, Islam MR, Heilbronner U, Krüger DM, Zhou J, Methi A, et al. Regulation of Zbp1 by miR-99b-5p in microglia controls the development of schizophrenia-like symptoms in mice. *EMBO J*. 25 mars 2024;43(8):1420-44.
22. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. mars 1993;362(6417):248-50.
23. Kotov R, Krueger RF, Watson D, Achenbach TM, Althoff RR, Bagby RM, et al. The Hierarchical Taxonomy of Psychopathology (HiTOP): A dimensional alternative to traditional nosologies. *Journal of Abnormal Psychology*. mai 2017;126(4):454-77.
24. Cuthbert BN, Insel TR. Toward the future of psychiatric diagnosis: the seven pillars of RDoC. *BMC Med*. 14 mai 2013;11:126.
25. Maksyutynska K, Stogios N, Prasad F, Gill J, Hamza Z, De R, et al. Neurocognitive correlates of metabolic dysregulation in individuals with mood disorders: a systematic review and meta-analysis. *Psychol Med*. mai 2024;54(7):1245-71.

26. Kadriu B, Deng ZD, Kraus C, Johnston JN, Fijtman A, Henter ID, et al. The impact of body mass index on the clinical features of bipolar disorder: A STEP-BD study. *Bipolar Disord.* mars 2024;26(2):160-75.
27. De R, Smith ECC, Navagnanavel J, Au E, Maksyutynska K, Papoulias M, et al. The impact of weight gain on antipsychotic nonadherence or discontinuation: A systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 17 sept 2024;
28. Álvarez MJ, Roura P, Osés A, Foguet Q, Solà J, Arrufat FX. Prevalence and Clinical Impact of Childhood Trauma in Patients With Severe Mental Disorders. *The Journal of Nervous and Mental Disease.* mars 2011;199(3):156.
29. Bailey T, Alvarez-Jimenez M, Garcia-Sanchez AM, Hulbert C, Barlow E, Bendall S. Childhood Trauma Is Associated With Severity of Hallucinations and Delusions in Psychotic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Schizophrenia Bulletin.* 20 août 2018;44(5):1111-22.
30. Zhao W, Zhang X, Li F, Yan C. Mendelian Randomization Estimates the Effects of Plasma and Cerebrospinal Fluid Proteins on Intelligence, Fluid Intelligence Score, and Cognitive Performance. *Mol Neurobiol* [Internet]. 4 nov 2024 [cité 28 nov 2024]; Disponible sur: <https://link.springer.com/10.1007/s12035-024-04542-5>
31. Bissonette GB, Schoenbaum G, Roesch MR, Powell EM. Interneurons Are Necessary for Coordinated Activity During Reversal Learning in Orbitofrontal Cortex. *Biological Psychiatry.* mars 2015;77(5):454-64.
32. Serre-Miranda C, Roque S, Santos NC, Portugal-Nunes C, Costa P, Palha JA, et al. Effector memory CD4(+) T cells are associated with cognitive performance in a senior population. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* févr 2015;2(1):e54.
33. Kolle G, Georgas K, Holmes GP, Little MH, Yamada T. CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis. *Mech Dev.* févr 2000;90(2):181-93.
34. Eagleson KL, Gravielle MC, Schlueter McFadyen-Ketchum LJ, Russek SJ, Farb DH, Levitt P. Genetic disruption of the autism spectrum disorder risk gene PLAUR induces GABAA receptor subunit changes. *Neuroscience.* 14 juill 2010;168(3):797-810.
35. Garcia-Monco JC, Coleman JL, Benach JL. Soluble urokinase receptor (uPAR, CD 87) is present in serum and cerebrospinal fluid in patients with neurologic diseases. *Journal of Neuroimmunology.* août 2002;129(1-2):216-23.
36. Winkler F, Kastenbauer S, Koedel U, Pfister HW. Role of the urokinase plasminogen activator system in patients with bacterial meningitis. *Neurology.* 12 nov 2002;59(9):1350-5.
37. Comes AL, Czamara D, Adorjan K, Anderson-Schmidt H, Andlauer TFM, Budde M, et al. The role of environmental stress and DNA methylation in the longitudinal course of bipolar disorder. *Int J Bipolar Disord.* déc 2020;8(1):9.

Legends

Table I: Variables measured by the PsyCourse Study

Variable measured at each visits				
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
PANSS sum score*	49.58 (16.17)	46.34 (13.95)	46.03 (14.02)	45.89 (15.5)
IDSC sum score*	13.16 (10.83)	12.72 (9.92)	11.96 (10.37)	12.29 (10.77)
YMRS sum score*	3.14 (4.98)	2.28 (3.89)	2.46 (4.09)	2.17 (3.63)
GAF score*	56.87 (13.11)	61.17 (13.6)	61.31 (13.86)	61.26 (14.56)
Variable measured at a single visit				
Sex (visit 1)				
	F	190 (42.9%)		
	M	253 (57.1%)		
Age (mean; SD)?	19-79 (45.93; 12.49)			
Diagnosis (visit 1)				
	Bipolar-I Disorder	143 (32.1%)		
	Bipolar-II Disorder	35 (7.8%)		
	Depression	21 (4.7%)		
	Schizoaffective Disorder	43 (9.6%)		
	Schizophrenia	204 (45.7%)		
OPCRIT (visit 4)				
	Not estimable	2		
	Single episode with good remission	17		
	multiple episodes with good remission between episodes	151		
	multiple episodes with partial remission between episodes	152		
	ongoing chronic disease	96		
	ongoing chronic disease with deterioration	9		
	-999 (not measurable)	16		
Presence of childhood trauma (visit 3)				
	No	218		
	Yes	201		
	-999 (not measurable)	24		
Current psychiatric treatment (visit 1)				
	No	9		
	Yes. outpatient	295		
	Yes. day patient	22		
	Yes. inpatient	114		
	NA	3		
First-episode patient (visit 1)				
	No	410		
	Yes	16		
	NA	17		

* mean (SD)

Figure 1

(A) Graph representing the strategy to classify the longmixr participants based on clinical evaluations. The consensus matrix displayed is the one computed by longmixr for the 2 clusters solution, while the consensus CDF was used to identify the optimal number of clusters. (B) Consensus CDF (upper) and consensus matrix (bottom) plots of our longmixr clustering. Spaghetti plots comparing the sum of the PANSS (negative, positive, and general) scales (C, ANOVA p-value < 0.001), the sum of the YMRS scale across the two clusters (D, ANOVA p-value < 0.001), the sum of the IDSC scale across the two clusters (E, ANOVA p-value < 0.001), the sum of the GAF scale across the two clusters (F, ANOVA p-value < 0.001), the time needed to finish Part B of the TMT tests across the two clusters (G, ANOVA, p-value < 0.001), and the number of errors made during the Part B of the TMT test (H, ANOVA p-value = 0.005). Boxplot comparing the age at the first visit of the two clusters (I, T Test p-value = 0.36), and barplots representing the sex (J, χ^2 p-value = 0.458) and the diagnosis proportions in each cluster (K, χ^2 p-value = 0.18).

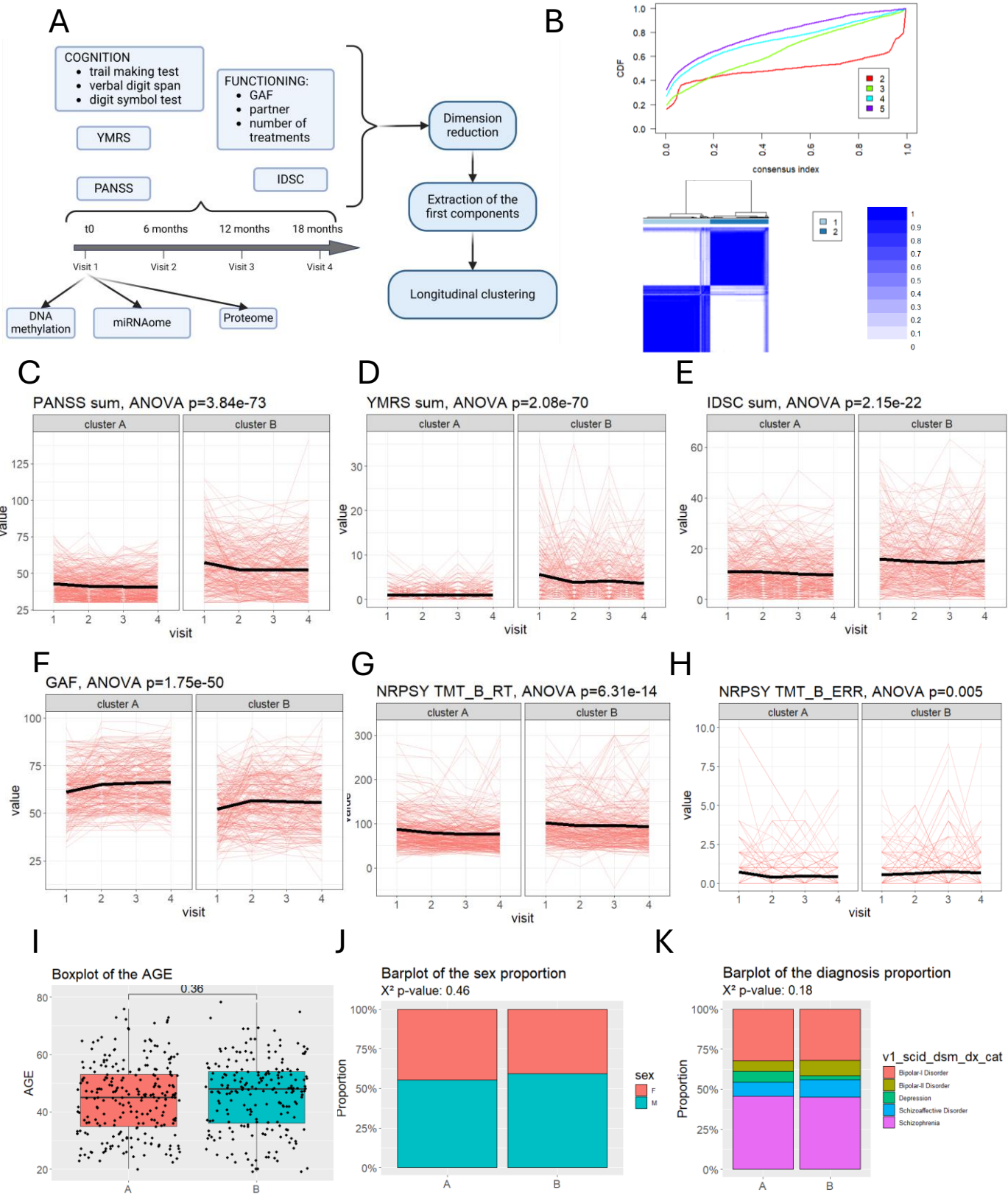


Figure 2

Boxplot comparing PRS between the two clusters, namely PRS for MD (A, T test adjusted p-value = 0.150), BD (B, T test adjusted p-value = 0.674), SCZ (C, T test adjusted p-value = 0.894), all 3 disorders (D, T test adjusted p-value = 0.674, sum of the individual PRS), SCZ treatment resistance (E, T test adjusted p-value = 0.674) and for the P factor (F, T test adjusted p-value = 0.971). Barplot representing the proportion of OPCRIT categories measured at the fourth visit of the PsyCourse study in each cluster (G, X^2 p-value < 0.001). Spaghetti plot comparing the BMI of the two clusters (H, ANOVA p-value < 0.001), and barplot representing the proportion of childhood trauma presence in each cluster (I, X^2 , p-value = 0.07)

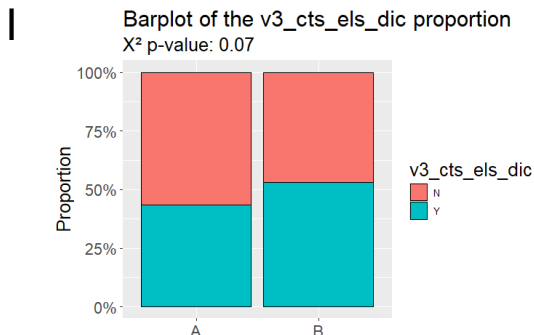
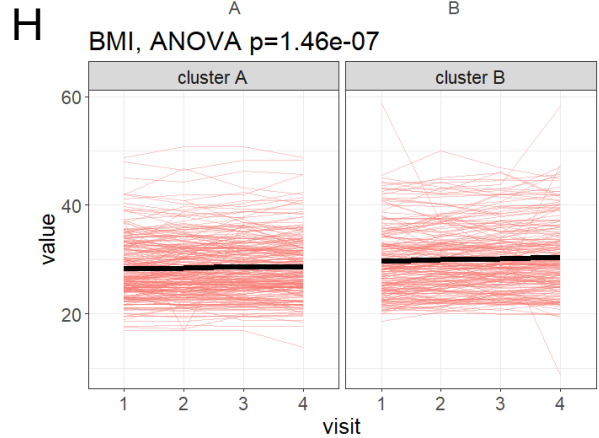
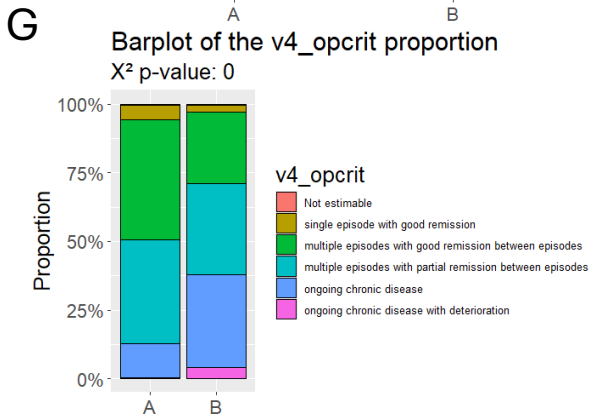
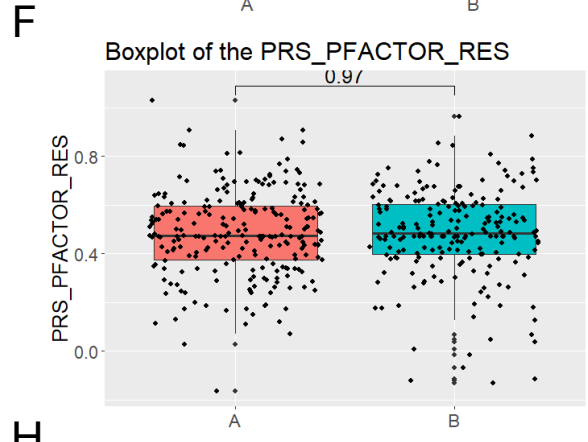
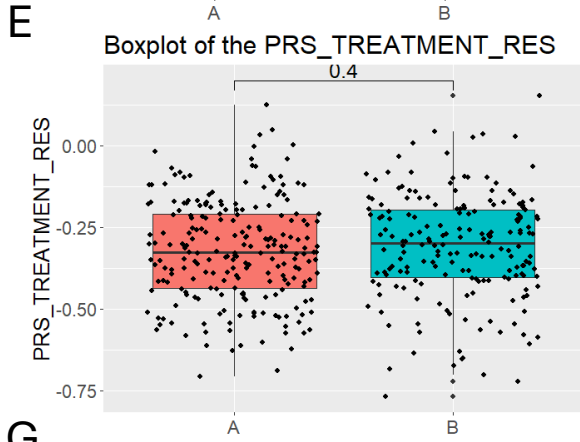
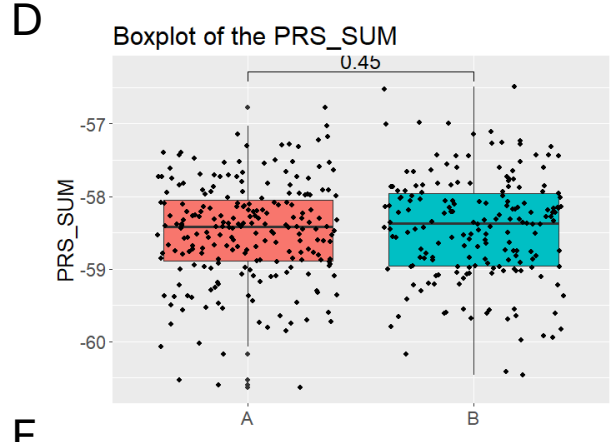
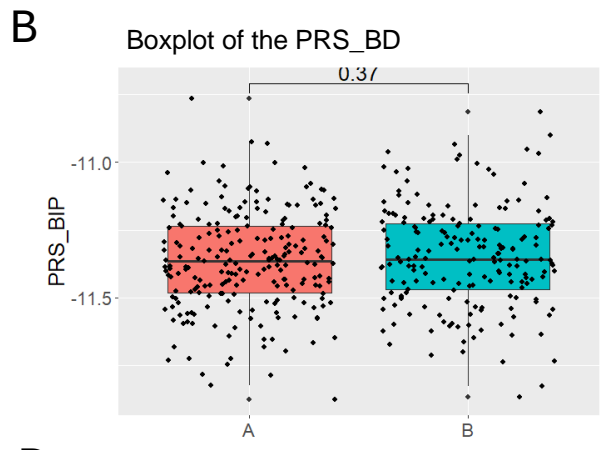
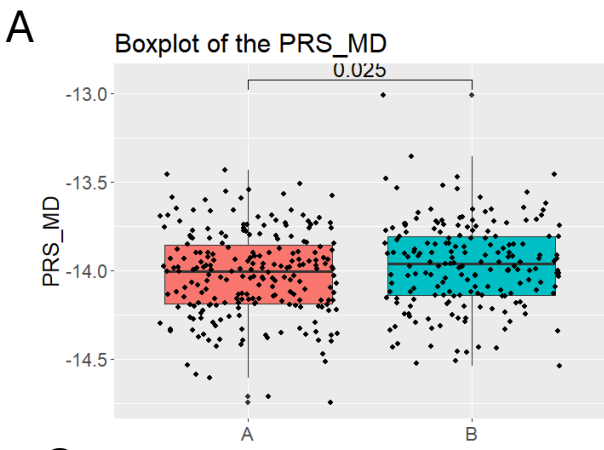


Figure 3

Flowchart that describes the multiomics analyses that were performed in this study (A) and volcano plot of the analysis comparing the miRNAome (B) and the methylome (C) of the two clusters. Boxplot comparing the age acceleration (imputed age – real age) of the two clusters (D).

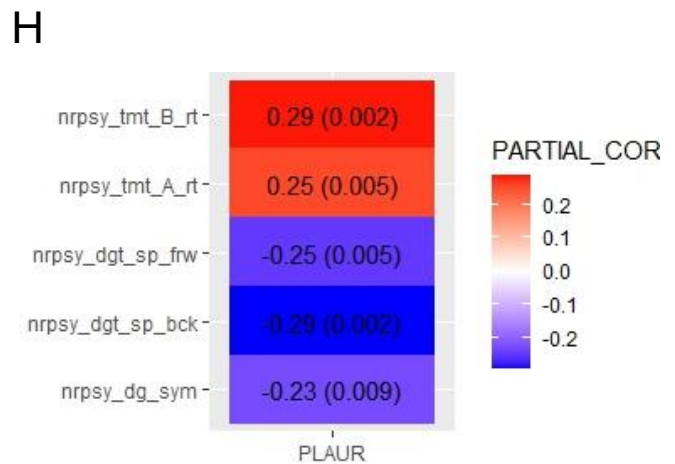
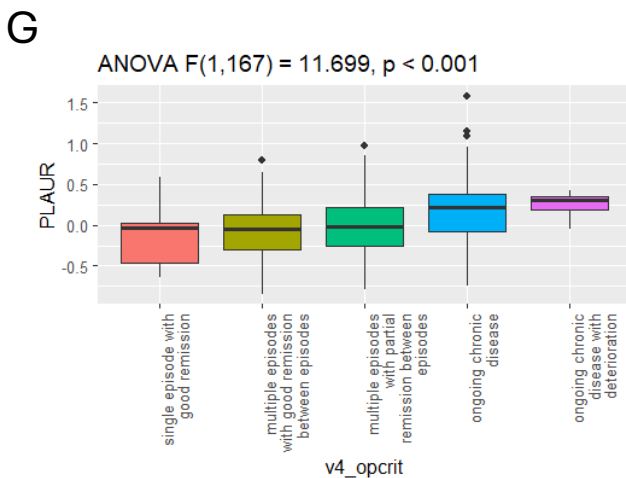
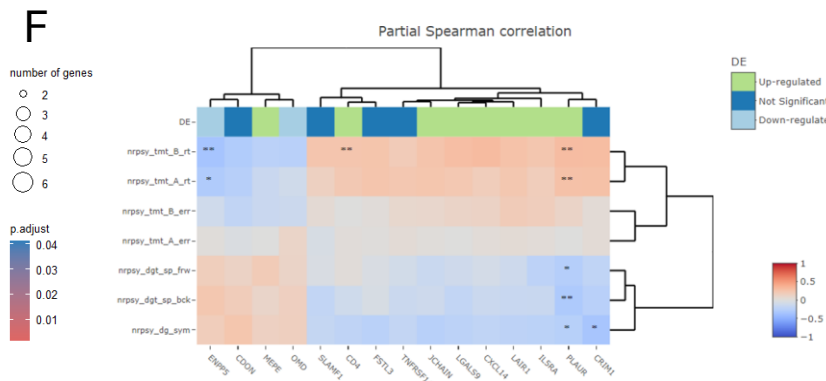
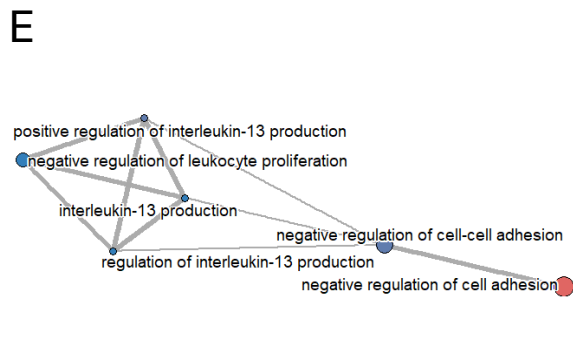
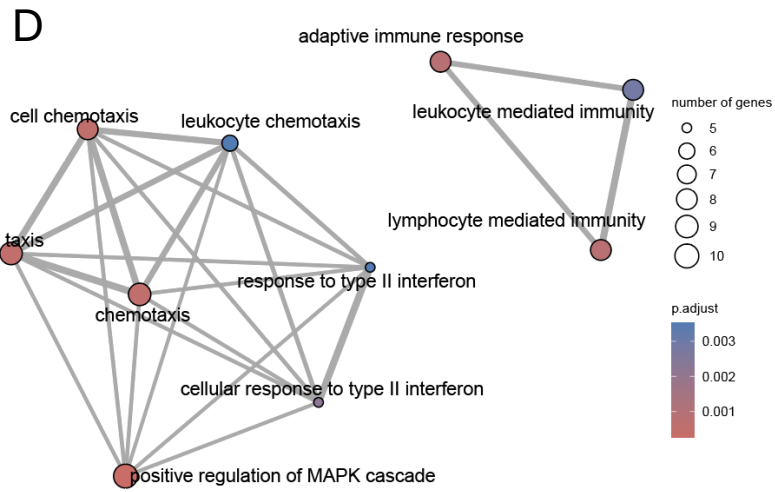
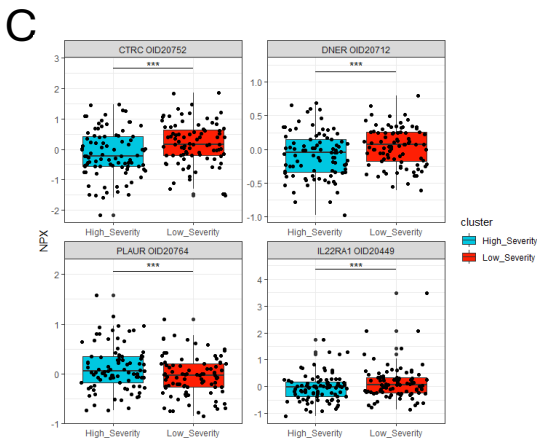
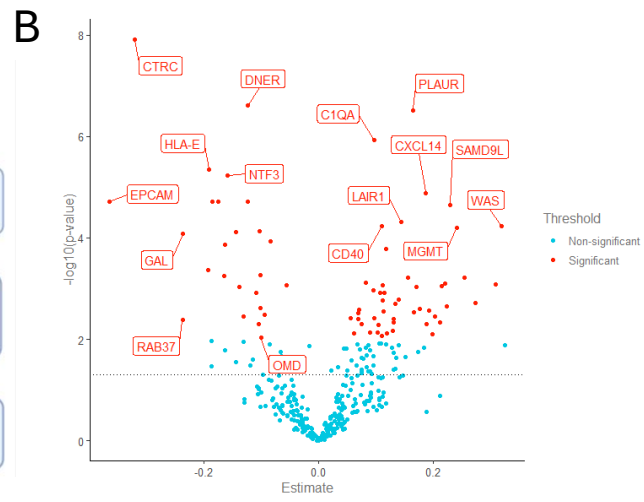
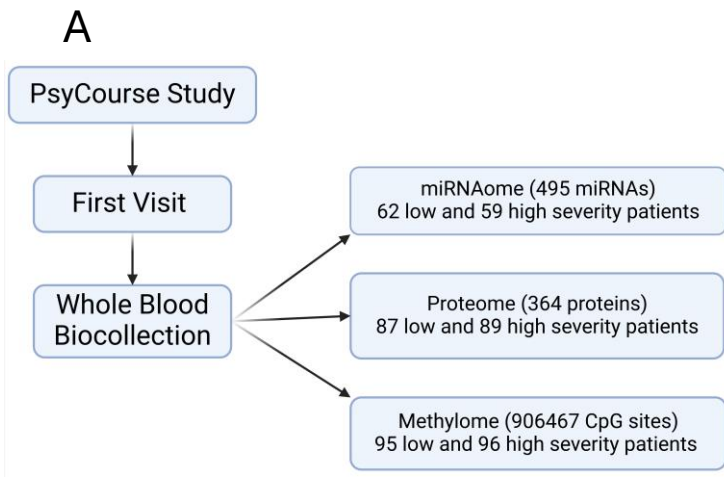
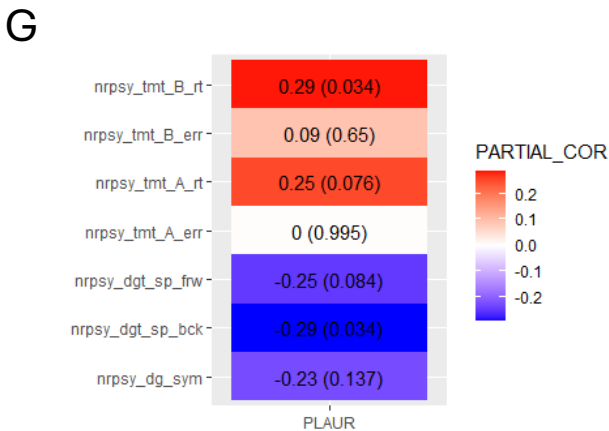
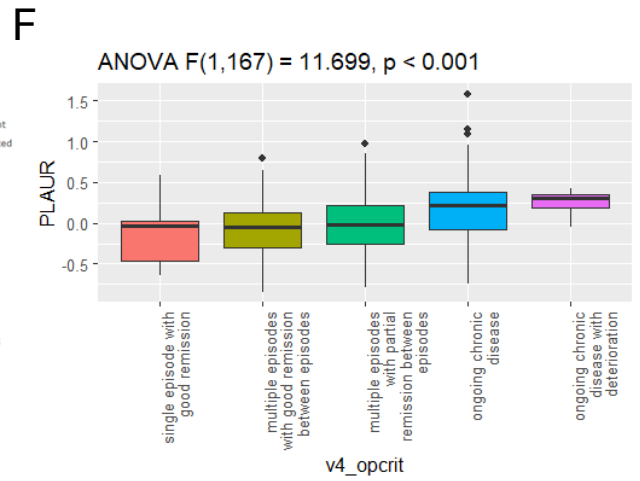
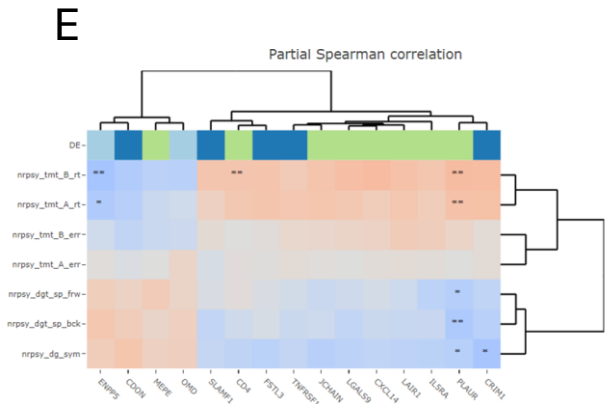
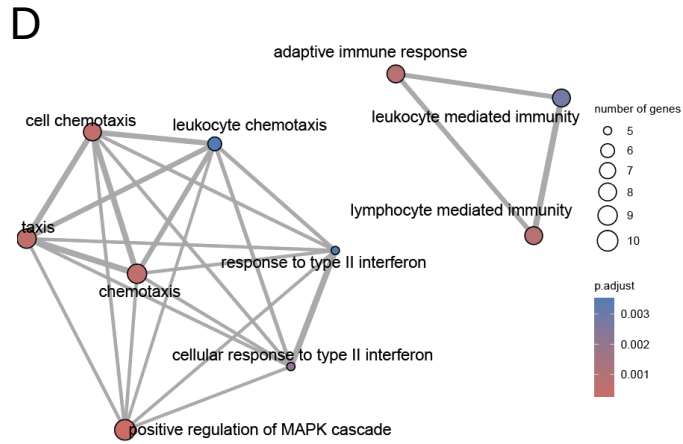
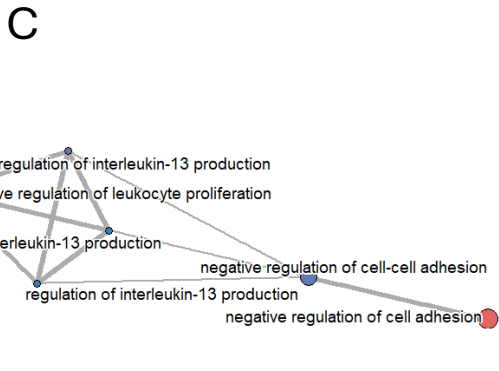
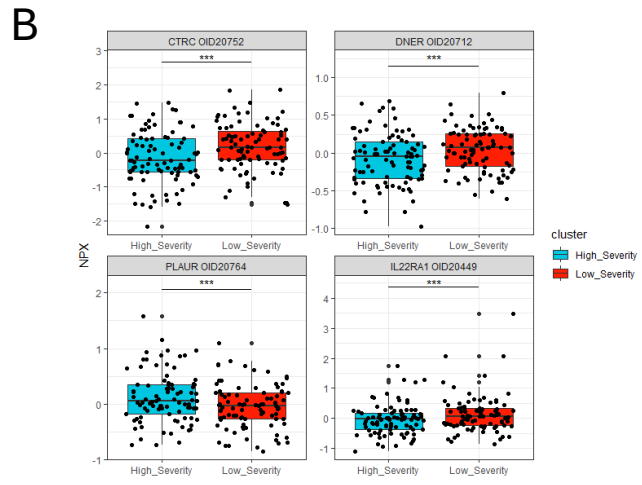
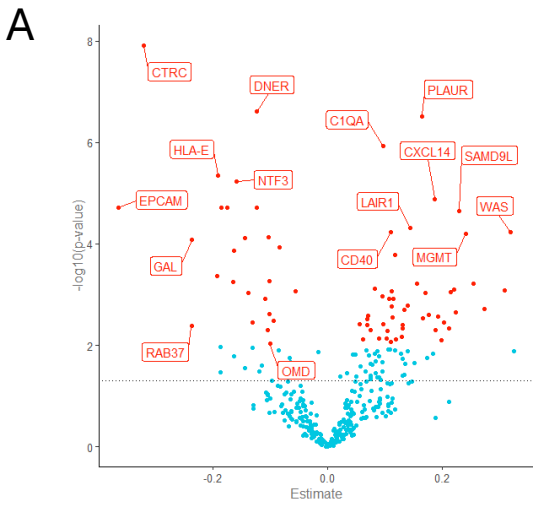


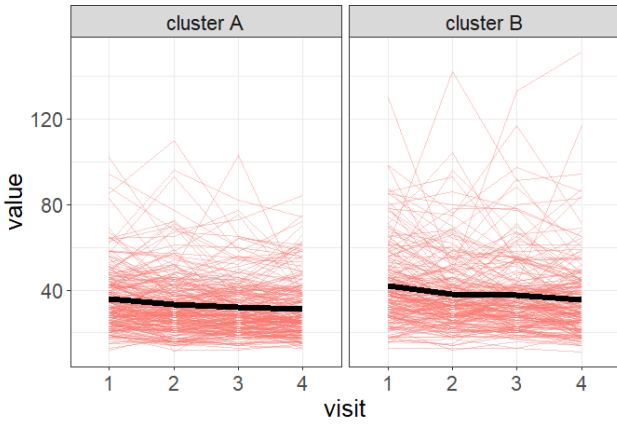
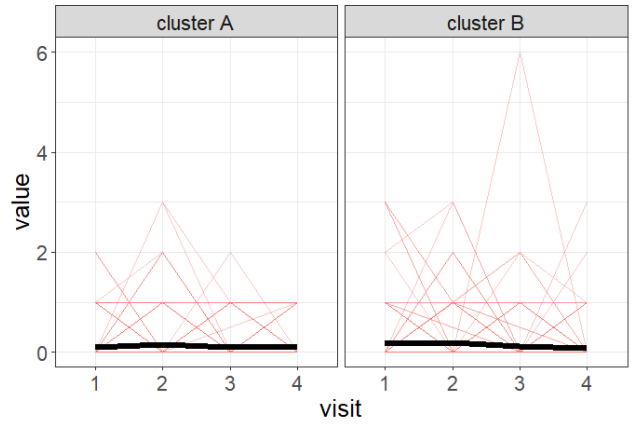
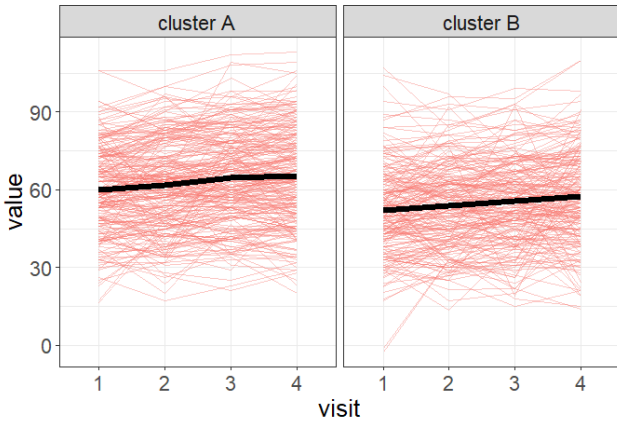
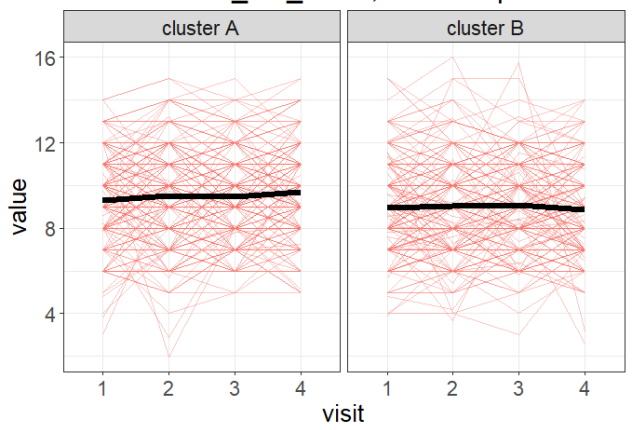
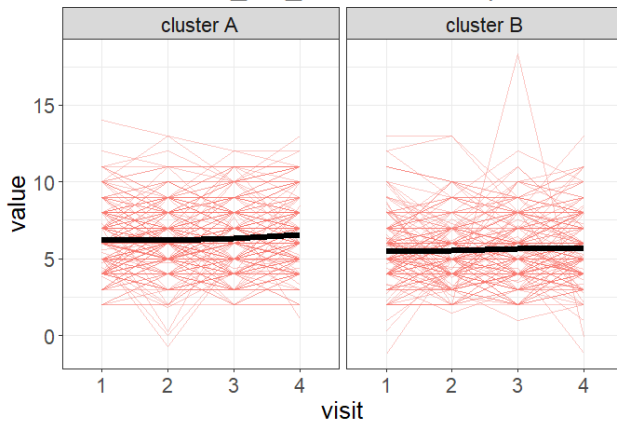
Figure 4

Volcano plot of the olink analysis (A, T test), and expression boxplot of 4 dysregulated proteins across the two clusters (B). Network graph of the GO process enriched in the proteins down-regulated (C), or up-regulated (D) in the high severity clusters. The color and size of the nodes correspond respectively to the p-value and the number of genes associated to the GO terms. The size of the edges represents the number of proteins in common between the GO terms. Correlation heatmap of the partial correlation of spearman between the protein's expression and the neuropsychological assessment variables (E, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$). The DE column indicates if the proteins were differentially expressed in our analysis comparing the high and low severity patients' groups. Boxplot representing the expression of the PLAUR gene according to the different OPCRIT categories (F), and heatmap representing the partial correlation of spearman of the PLAUR gene to the different neuropsychological assessments (G). The text in the tyle is the adjusted p-value.

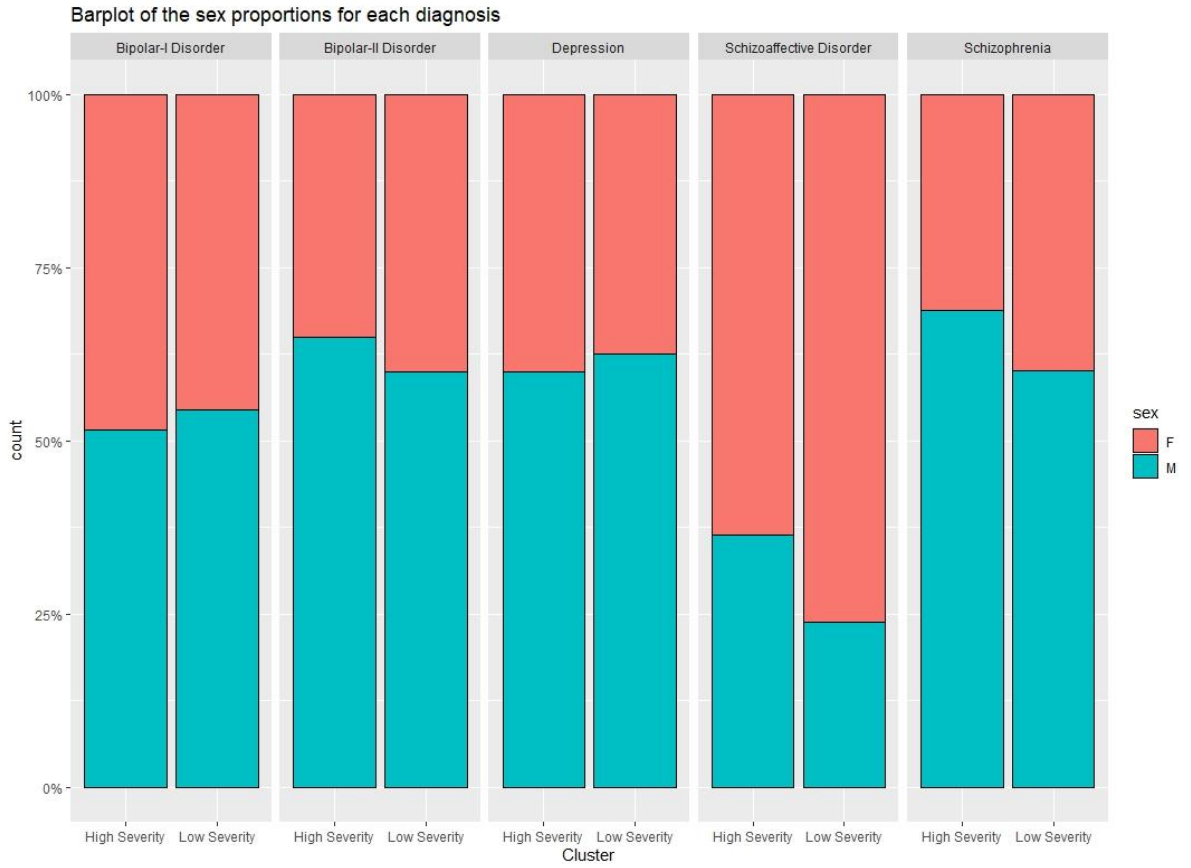


Supplementary Figure 1

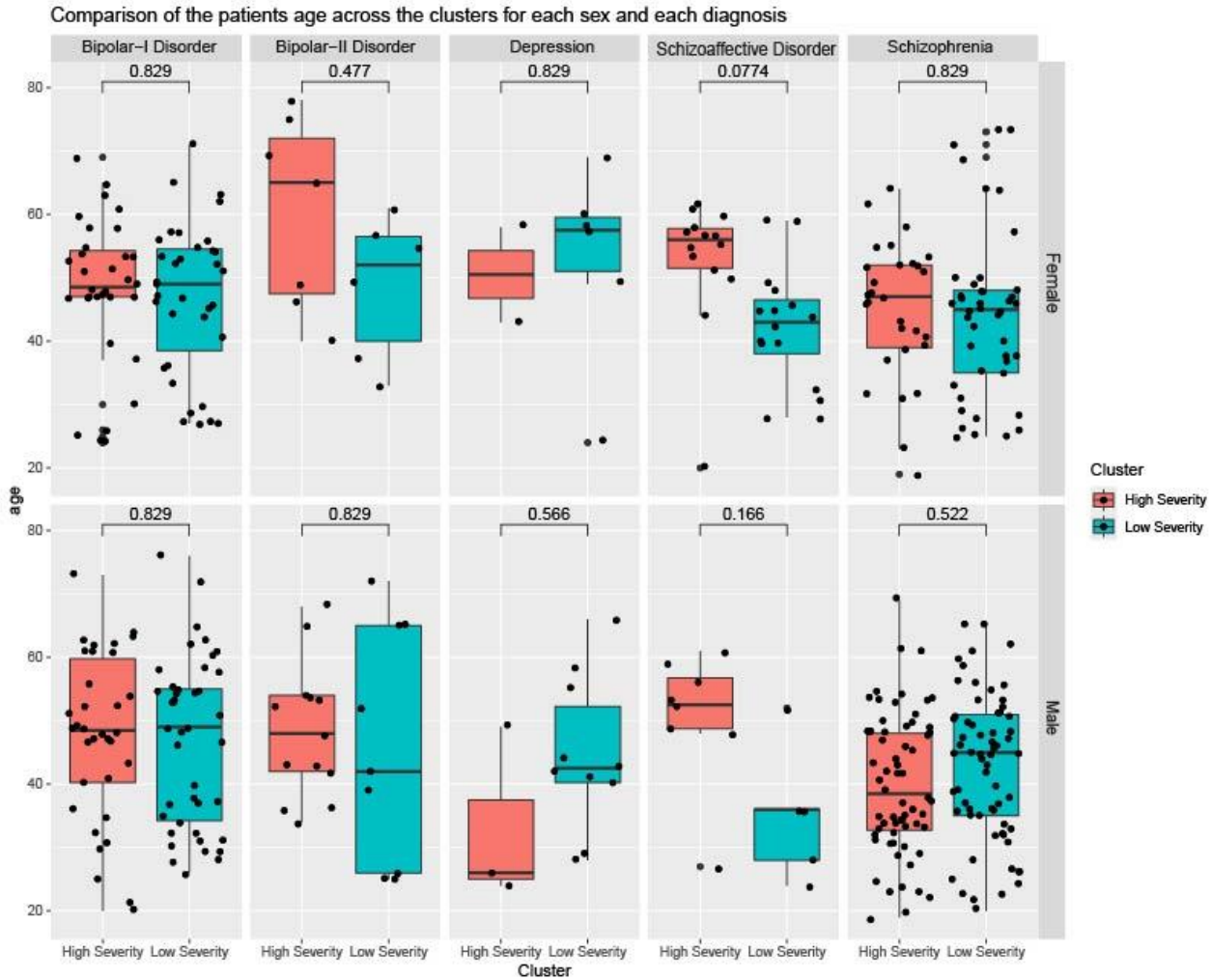
Spaghetti plots showing the time needed to finish (A, ANOVA p-value < 0.001) and the number of errors (B, ANOVA p-value =0.146) made during Part A of the TMT test, as well as the scores of the Digit Symbol test (C, ANOVA p-value < 0.001), Verbal Digit Span test forward (D, ANOVA p-value < 0.001) and backward (E, ANOVA p-value < 0.001) in both clusters. (F) Barplots indicate the sex proportion in the two clusters across the different categorical diagnoses, and (G) Comparison of age between the clusters grouped by age and diagnosis using T tests (pvalues adjusted with BH method).

ANRPSY TMT_A_RT, ANOVA $p=1.54e-12$ **B**NRPSY TMT_A_ERR, ANOVA $p=0.146$ **C**NRPSY DG_SYM, ANOVA $p=1.22e-21$ **D**NRPSY DGT_SP_FRW, ANOVA $p=4.85e-07$ **E**NRPSY DGT_SP_BCK, ANOVA $p=5.87e-13$ 

F



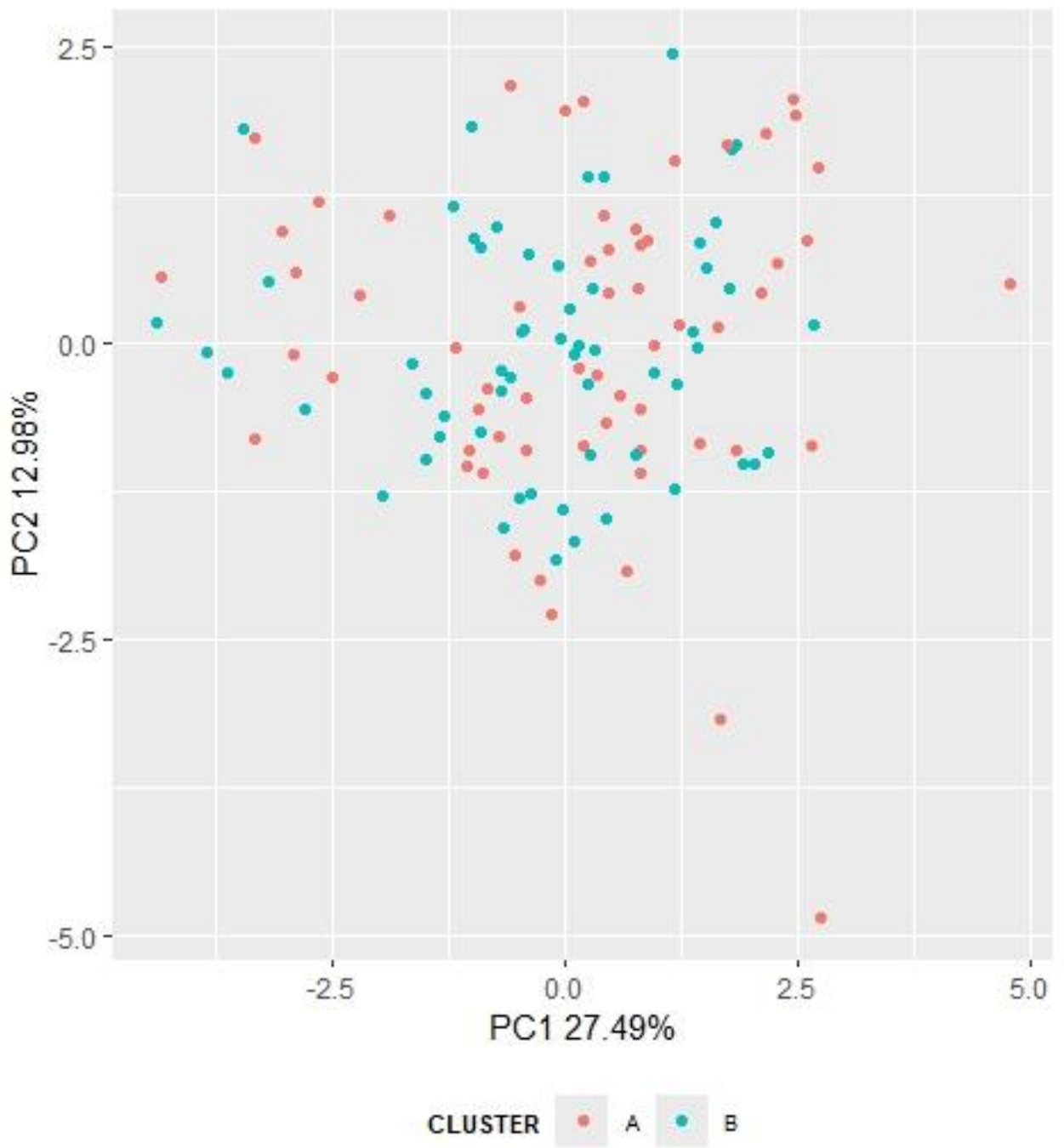
G



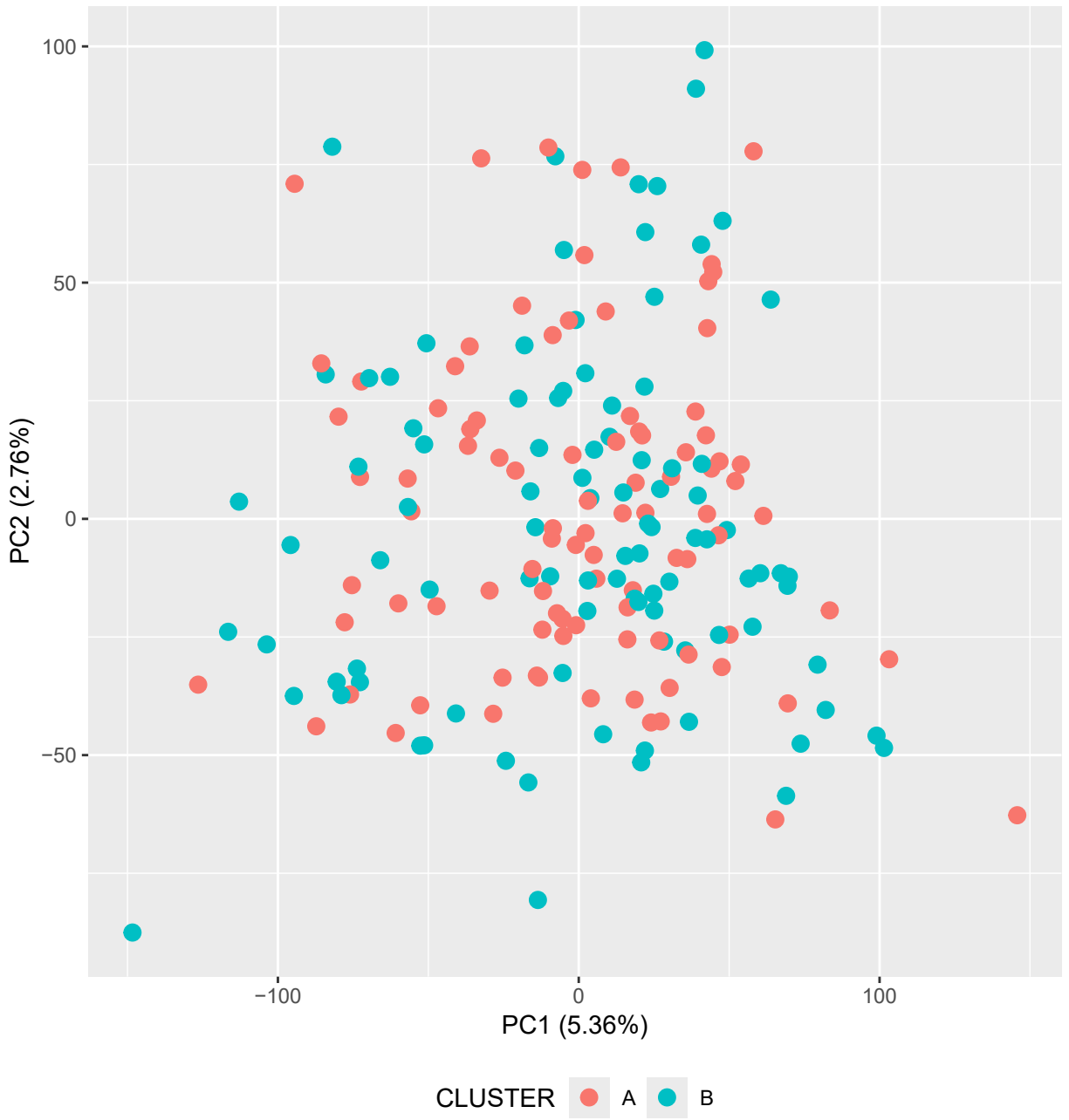
Supplementary Figure 2

PCA plot of the miRNAome expression data (A) of the methylation state of CpG site (B) of the patients. Correlation between real age of the participants during the first visit of the PsyCourse study and the DNA imputed age using the Levine model of the methylClock R package (C),

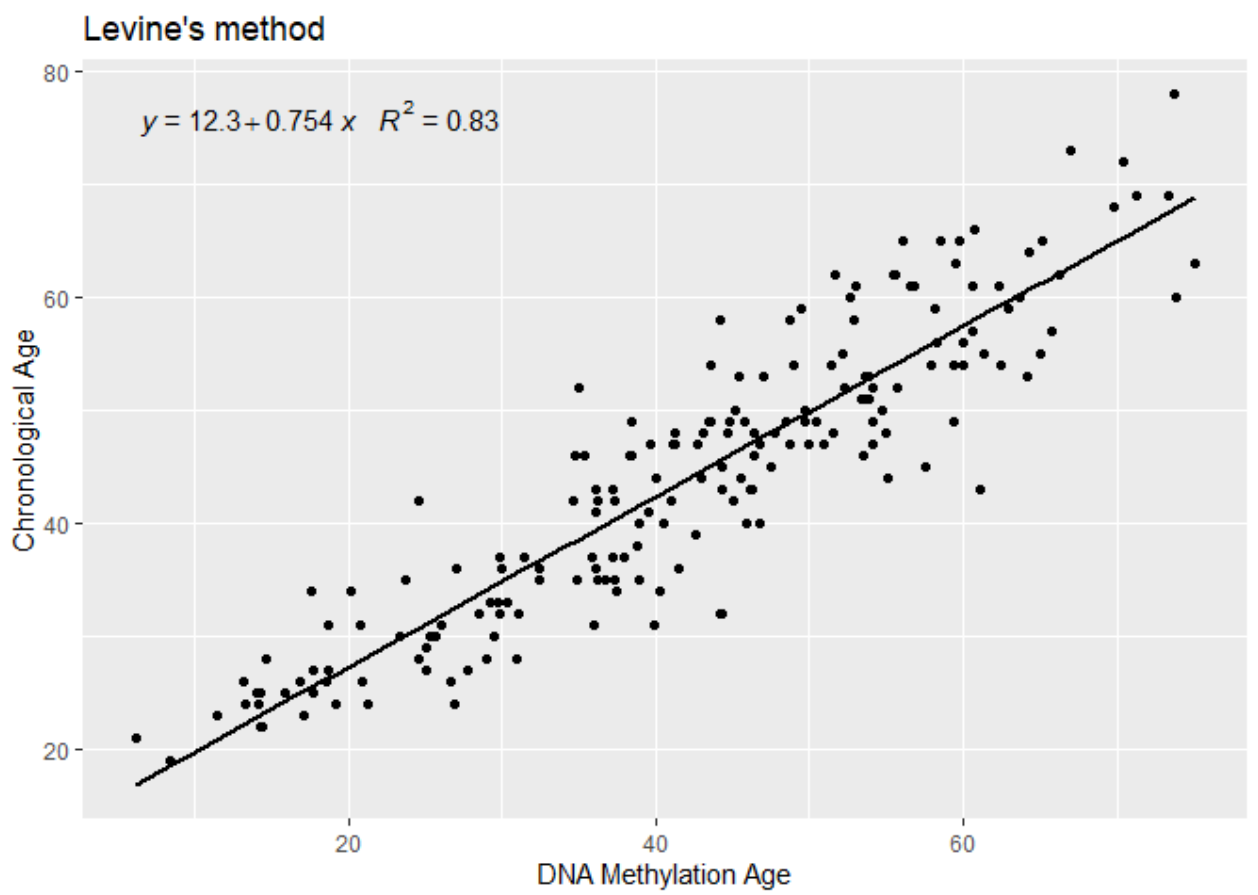
A



B



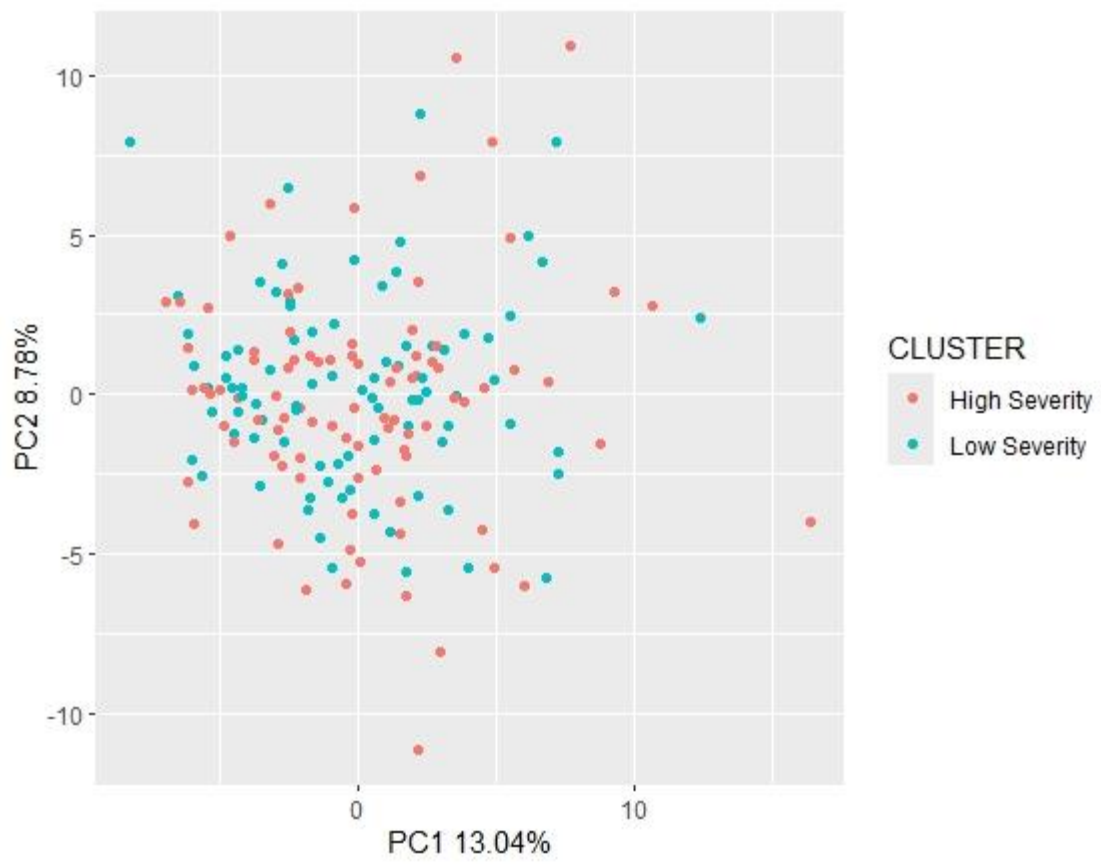
C



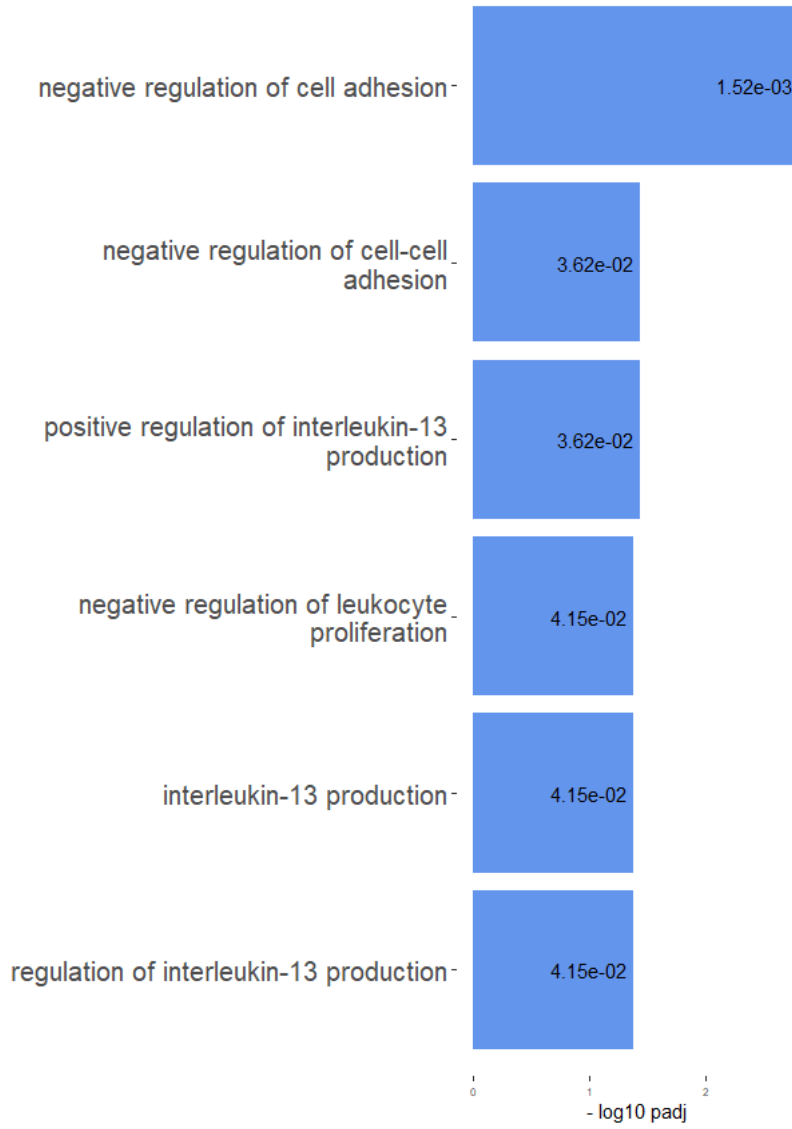
Supplementary Figure 3

PCA plot of the protein expression in NPX (A). Barplot of the GO process significantly enriched for the down-regulated (B) and up-regulated (C) proteins in the high severity cluster. Correlation heatmap of the partial correlation of spearman between the proteins' expression and the neuropsychological assessment variables (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$). The DE column indicates if the proteins were differentially expressed in our analysis comparing the high and low severity patients' groups (D).

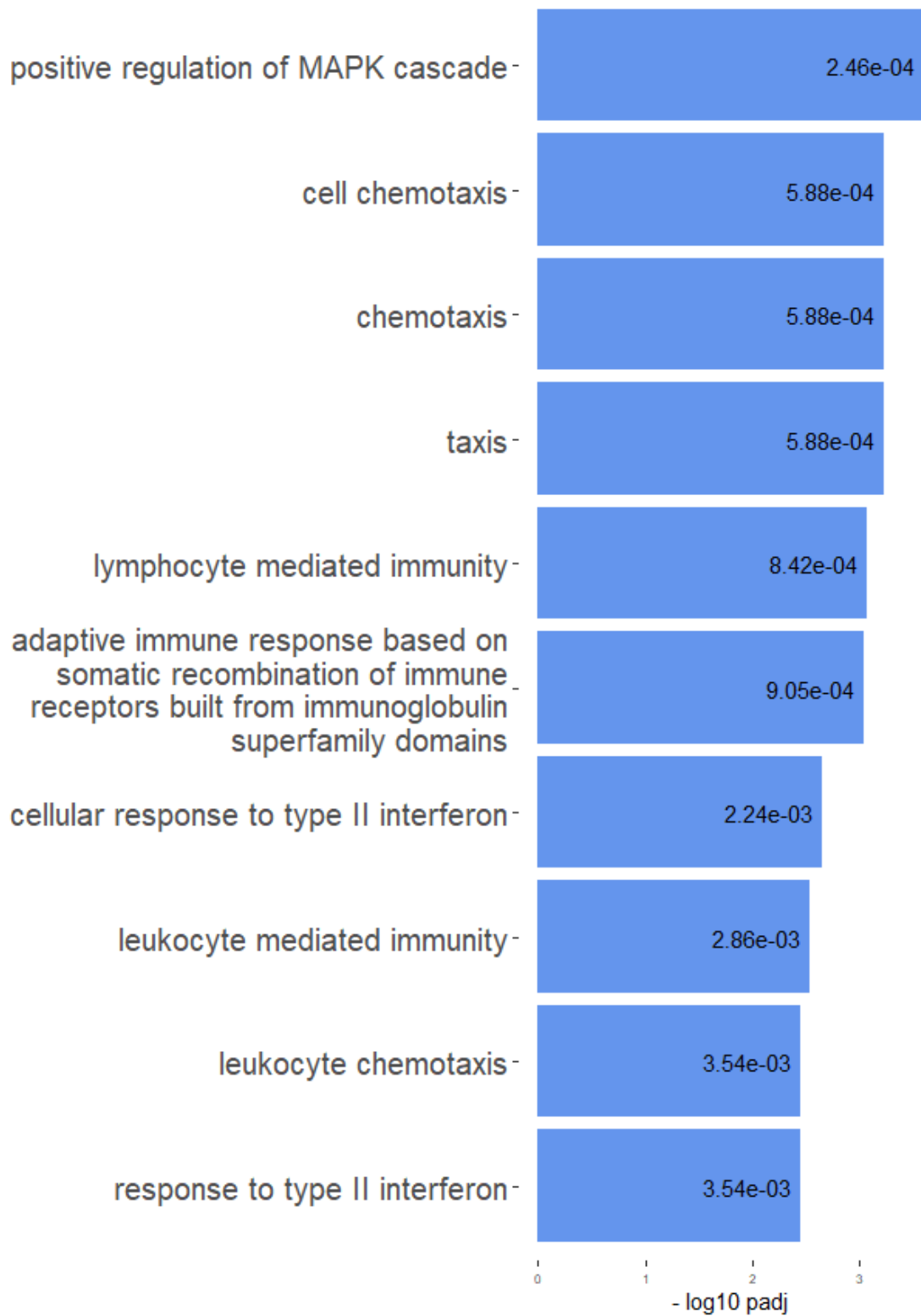
A



B

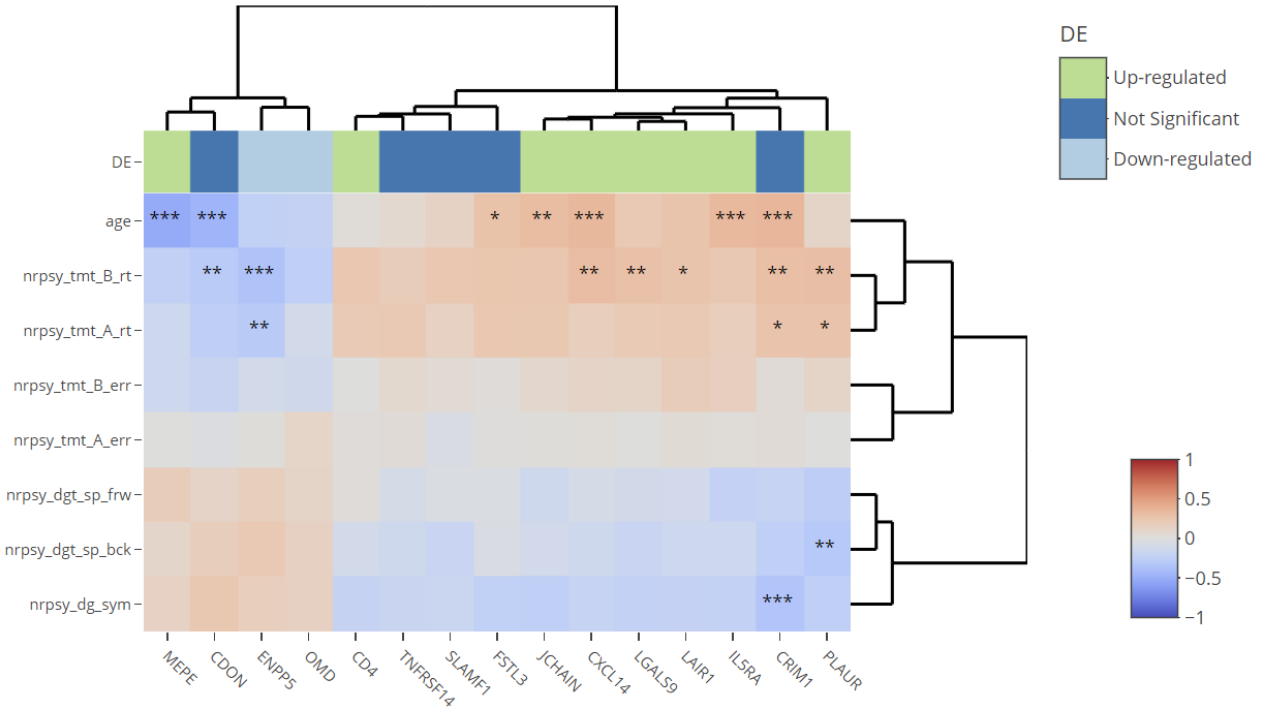


C



D

Spearman correlation



Supplementary Table I

Sex Proportions across the clusters for each diagnosis and results of their comparisons (X^2).

Diagnosis	Low Severity (Male)	Low Severity (Female)	High Severity (Male)	High Severity (Female)	X^2 statistic	X^2 p-value	X^2 adjusted p-value (BH)
Bipolar-I Disorder	26(5,87%)	24(5,42%)	20(4,51%)	24(5,42%)	3,76E-02	0,8462253	1
Bipolar-II Disorder	25(5,64%)	33(7,45%)	34(7,67%)	40(9,03%)	0,00E+00	1	1
Major Depressive Disorder	28(6,32%)	24(5,42%)	24(5,42%)	43(9,71%)	1,67E-31	1	1
Schizophrenia	20(4,51%)	25(5,64%)	19(4,29%)	19(4,29%)	3,18E-01	0,5728472	1
Schizoaffective Disorder	24(5,42%)	28(6,32%)	27(6,09%)	20(4,51%)	1,27E+00	0,2605416	1

3.3 Discussion et perspective

En me basant sur les liens entre le SI et les TPS développés dans l'introduction ([Section 1.3](#)), j'ai recherché des signatures biologiques des TPS et de la sévérité de leurs symptômes à partir des prélèvements sanguins des participants de l'étude PsyCourse. L'avantage de chercher des biomarqueurs dans le sang est d'avoir un accès non-invasif et rapide aux échantillons. Pour atteindre cet objectif, j'ai utilisé deux approches complémentaires.

3.3.1 Analyse du miRNAome sur des groupes élargis de patients

Dans un premier temps, j'ai regroupé les participants de l'étude PsyCourse selon les classifications partagées de leurs maladies sous la condition élargie des troubles du spectre de la schizophrénie ou du spectre des troubles thymiques. Un troisième groupe formé par des individus neurotypique fut également inclus pour servir de base lors des comparaisons de l'expression des miARN. Dans ce projet, j'ai utilisé plusieurs approches dont des analyses d'expression différentielles, des TWAS pour identifier les miARN dont l'expression est liée au risque génétique de la SCZ ou des TB, ainsi que des modèles réseaux de neurones construit par un stagiaire que j'ai encadré. Ces modèles avaient pour objectif de différencier les individus neurotypiques des deux groupes de patients en se basant sur l'expression des miARN, tout en identifiant les miARN les plus influents pour ces classifications.

Les analyses d'expression différentielles ont permis l'identification de 191 miARN dont 108 qui n'ont pas été identifiés dans des études précédentes sur les TPS. Les TWAS ont permises l'identification de miARN associés aux TB (1 miARN) ou à la SCZ (8 miARN) soulignant l'importance du génome dans l'étiologie de ces pathologies. Enfin, les modèles de classifications ont montré des performances prometteuses pour distinguer les individus neurotypiques des patients des groupes "psychotique" ou "thymique". Ces modèles pouvant identifier des relations non linéaires entre l'expression des miARN et les TPS, les 20 miARN contribuant le plus à ces modèles pour les rajouter dans nos analyses ultérieures.

Après avoir identifié les gènes cibles de ces miARN, un filtrage a été effectué pour ne conserver que les gènes exprimés dans le sang ou le cerveau et ciblés par au moins 2

miARN différents. Ces gènes cibles ont été répartis en 3 catégories, en fonction des analyses dans lesquelles les miARN les ciblant ont été identifiés, afin de préciser si ces miARN étaient importants pour un seul des groupes de patients ou dans les deux. L'investigation des fonctions biologiques de ces gènes a révélé un enrichissement de termes de GO représentant des voies biologiques. Certaines, comme celles associées à la régulation de l'ARN-polymérase II étaient communes aux deux groupes de patients ce qui suggère des mécanismes biologiques partagés entre les deux groupes élargis. D'autre type de termes présentaient des enrichissements distincts dans un seul groupe. Par exemple, j'ai observé un enrichissement de termes liés au développement anatomique principalement chez les patients du groupe "psychotique", tandis qu'un enrichissement de termes de GO, associé au stress cellulaire, a été distingué dans le groupe "thymique". Ces résultats corroborent les études précédentes qui ont montré des différences structurales du cerveau associées aux processus physiopathologiques de la SCZ, ainsi qu'une altération des réponses cellulaires au stress chez les patients atteints de TB²³⁰⁻²³⁴.

L'enrichissement de termes liés au stress, tels que les "réponse cellulaire au stimulus de la dexaméthasone" ou encore la "réponse cellulaire au facteur inhibiteur de la leucémie", chez les patients atteints de troubles affectifs (et, dans une moindre mesure, ceux atteints de troubles psychotiques) renforce l'hypothèse d'un lien entre le SI et les TPS. Il a déjà été démontré que les cellules T des patients atteints de troubles affectifs sont résistantes à la dexaméthasone, un glucocorticoïde à action anti-inflammatoire qui a un rôle neuroprotecteur en réduisant l'inflammation au niveau du cerveau²³⁵. De plus, comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ma thèse ([Section 1.2.4.2](#) et [Section 1.3.2.2](#)) les corticostéroïdes, comme la dexaméthasone, peuvent affecter le SNC via l'axe HHS et provoquer des symptômes de manie, d'hypomanie et de dépression. Ces symptômes font partis des effets indésirables des médicaments basées sur ces molécules²³⁶. Le gène du facteur inhibiteur de la leucémie, qui a également une action anti-inflammatoire dans les tissus périphériques, a été associé à la susceptibilité de développer la SCZ²³⁷. Ce facteur est connu pour réguler la différenciation des cellules précurseurs neuronales en astrocytes²³⁸. Les cellules gliales sont nécessaires pour la

plasticité cellulaire, une inhibition de l'expression du facteur inhibiteur de la leucémie par des miARN pourrait augmenter la susceptibilité de développer des TPS²³⁹.

L'ensemble de ces résultats souligne le rôle du SI dans la pathophysiologie des TPS, ainsi que le rôle régulateur des miARN dans ces troubles. Ils suggèrent également que les gènes associés aux voies biologiques enrichies pourraient constituer des biomarqueurs, mesurables dans le sang, de ces troubles. Les gènes les plus ciblés par les miARN associés aux TPS sont particulièrement intéressants, car cette convergence pourrait indiquer un rôle clé dans l'étiologie de ces maladies. Dans cette optique, une recherche bibliographique menée par un stagiaire sous ma supervision a révélé que 8 des 10 gènes les plus ciblés ont déjà été associés à des troubles psychiatriques ou neurodéveloppementaux. Par exemple, le gène QKI est un régulateur de la différenciation et de la maturation des cellules astrocytaires et pourrait être associé au développement et à la progression des TPS²⁴⁰, tandis que NFIB, un gène nécessaire à la transcription de l'ADN en ARN via l'ARN polymérase II, est associé à la déficience intellectuelle et la macrocéphalie²⁴¹. D'autres de ces gènes comme DYRK1A sont associés à des voies de signalisation, à l'épissage des ARN comme MBNL1, ou CELF2²⁴²⁻²⁴⁴. En considérant leurs capacités à réguler de nombreuses voies biologiques cruciales pour le développement et la fonction cérébrale, il est plausible que l'altération de l'expression de ces gènes contribue à l'étiologie des TPS en influençant la maturation des cellules neuronales ou encore la plasticité cérébrale²⁴⁵⁻²⁴⁷. Leur identification dans cette étude revient donc à enrichir la liste des possibles biomarqueurs de ces maladies mais il serait nécessaire de réaliser des analyses de régulation entre les miARN et les ARNm dans le cerveau pour confirmer leur utilité. Cette étude permet donc de renforcer l'hypothèse d'un lien entre le SI et les TPS.

A travers ces analyses, ce projet a également permis l'identification de plusieurs miARN et de leurs gènes cibles qui peuvent potentiellement contribuer à l'étiologie des TPS et qu'il serait possible de quantifier dans le sang des patients. Cependant, le manque de cohorte de validation m'a empêché d'investiguer l'utilité de ces miARN pour l'identification des états pathologiques. De plus, cette étude a été réalisée à partir d'échantillons d'individus allemands. Pour augmenter la fiabilité de mes résultats, il sera nécessaire que les études suivantes sur le sujet incorporent des cohortes plus

diversifiées ethniquement et géographiquement pour augmenter la robustesse des résultats.

3.3.2 Analyse du SI basée sur des groupes de sévérité des TPS

Dans ma deuxième étude, je n'ai fait aucune distinction entre les différents troubles psychiatriques. Les groupes étudiés ont été identifiés grâce à une classification semi-supervisée, fondée uniquement sur les données longitudinales de la sévérité collectées lors de l'étude PsyCourse. Cette méthodologie a permis d'identifier deux groupes de patients qui se distinguent par la sévérité des symptômes psychiatriques tels que les symptômes de manie, de dépression, ou encore de la SCZ. Ces différences étaient observables à travers les échelles de symptômes tels que le PANSS ou le EGF qui ont été utilisés pour établir ces groupes, que des variables indépendantes tel que l'évaluation de l'évolution de la maladie, liste de contrôle des critères opérationnels, en anglais, operational criteria checklist (OPCRIT)²⁴⁸. Cette dernière mesure indique une évolution plus sévère des TPS dans un groupe par rapport à l'autre. Bien que le groupe présentant une sévérité plus élevée possède une proportion plus importante d'individus atteints de SCZ et une proportion moindre d'individus atteints de TB, ces différences de répartition entre les deux groupes n'étaient pas statistiquement significatives. Cela souligne le chevauchement important des symptômes entre les TPS et remet en question la pertinence des frontières mises en place entre ces troubles par les classifications catégoriques.

Concernant les facteurs de risques, l'absence de différences significative entre les deux groupes en termes de PRS est un résultat important. Cela suggère que les variants génétiques identifiés par les GWAS sont davantage liés à la prédisposition des individus aux différents TPS, qu'à la sévérité de ces troubles. De plus, bien que les deux groupes ne soient pas statistiquement différents en termes de proportion de la présence de traumatismes dans l'enfance, il y a une tendance vers une plus grande proportions de ces traumatismes chez les patients avec les symptômes les plus sévères. Cette observation est cohérente avec les études qui ont liés les traumatismes enfantins avec la sévérité des troubles psychiatriques^{249,250}. De façon générale, ces observations confirme l'importance des facteurs non-génétiques dans la trajectoire des TPS, en

complément des facteurs génétiques qui influence la susceptibilité de développer ces troubles.

Après avoir identifié ces groupes de patients, j'ai comparé leurs méthylome, miRNAome, et protéome avec l'objectif d'identifier des signatures biologiques de la sévérité des TPS. Les analyses du méthylome et du miRNAome des groupes n'ont pas permis d'identifier des différences significatives entre les deux groupes ce qui soulève plusieurs hypothèses. Premièrement, les altération épigénétiques liées à la sévérité des TPS peuvent ne pas être reflétées dans le sang périphérique, et des études utilisant des échantillons de cerveaux post-mortem seraient plus appropriées pour les étudier. Deuxièmement, les modification épigénétiques sont souvent relativement stables dans le temps et il est possible que la fenêtre temporelle de deux ans qu'ait duré l'étude PsyCourse, menée par l'IPPG, ne soit pas suffisante pour capturer ces modifications. Enfin, le fait que je n'ai pas identifié de différence d'expression des miARN entre les deux groupes de patients indique que les modifications d'expression de ces ARN sont plus liées au type de symptômes (et donc de troubles) qu'à la sévérité de ces symptômes.

En revanche, l'étude du protéome, restreinte à un ensemble de cytokines liées au SI a révélée des différences intéressantes entre les groupes. Les patients avec les symptômes les plus sévères avait une plus grande proportion de cytokines associées à des voies biologiques pro-inflammatoires tandis que leurs sérums contiennent moins de cytokines associées à la régulation de l'IL-13, une cytokine anti-inflammatoire. Ces résultats suggèrent un lien potentiel entre l'inflammation systémique et la sévérité des symptômes des TPS, en accord avec des études antérieures qui ont démontré une augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le sang des patients atteints de TPS^{3,4}. Ces résultats indiquent donc un rôle du SI dans l'aggravation des symptômes psychiatriques.

Les capacités cognitives d'un individu étant révélatrices de la sévérité des TPS, j'ai identifié 7 protéines corrélées avec les variables des tests neuropsychologiques mesurés lors de l'études PsyCourse. Ce résultat suggère un lien entre la dysrégulation du protéome dans le sérum et les fonctions cognitives des participants. Il est particulièrement intéressant de remarquer que PLAUR et CD4, surexprimées dans le sérum des patients avec les symptômes les plus sévères, sont négativement corrélés

avec les capacités cognitives des participants. Cela pourrait indiquer que ces protéines ont un rôle dans le déclin cognitif des patients atteints de TPS. En revanche, l'expression de la protéine ENPP5 est positivement corrélée à ces capacités cognitives, suggérant un rôle protecteur ou compensatoire. Parmi ces protéines, PLAUR se distingue par le fait que son expression est corrélée au plus grand nombre de variables des tests neuropsychologiques. Cette corrélation avec les aptitudes cognitives est bien documentée dans la littérature. Cette protéine est exprimée dans le SNC par les cellules microgliales et son inactivation est connue pour induire des changements dans la sous-unité A des récepteurs GABA²⁵¹. Cette protéine fait également partie du système d'activation du plasminogène de type urokinase qui est impliqué dans le recrutement de leucocytes et la dégradation de la BHE²⁵²⁻²⁵⁴. La surexpression de cette protéine dans le sang pourrait donc induire une dégradation de la BHE qui comme je l'ai indiqué dans mon introduction serait propice à la mise en place et l'aggravation d'une neuro-inflammation qui à son tour aggraverait les symptômes psychiatriques ([Section 1.3.2.2](#)). Cela fait de cette protéine un candidat particulièrement prometteur en tant que biomarqueur de la sévérité des TPS.

Il est à noter que comme mon premier projet, cette étude est basée uniquement sur les participants de l'étude PsyCourse, ce qui m'a limité pour évaluer la reproductibilité de mes résultats. De plus, les financements de ma thèse ne m'ont pas permis d'analyser plus qu'une partie des échantillons de la 1^{ère} visite de l'étude PsyCourse. Si cela m'a été suffisant pour réaliser les analyses présentées, je n'ai pu tester si des mesures biologiques permettent ou non de vérifier l'appartenance à l'un des groupes identifiés. En effet, ce type d'analyse nécessiterait la mise en place de modèles d'apprentissage automatiques. Bien que j'ai essayé de créer plusieurs modèles, dont des réseaux de neurones, et des arbres de décision, le faible nombre d'échantillon à ma disposition ne m'a pas permis de m'assurer que les modèles en question n'étaient pas sujets à des problèmes de surapprentissage. Les résultats de ces modèles n'étaient donc fiables et présentables. Les résultats que j'ai obtenus avec les analyses que j'ai présentées restent cependant intéressants car ils soulignent l'importance des réponses inflammatoires pour l'aggravation de la sévérité des symptômes des TPS. Plus largement, ils s'inscrivent dans la continuité des appels précédents en faveur d'une

réévaluation des modèles catégoriels traditionnels des troubles psychiatriques pour la recherche scientifiques^{216,217}. En intégrant des approches dimensionnelles, basées sur un ensemble précis de symptômes, il serait possible d'améliorer la classification et le traitement des patients atteints de TPS. Lors de ce projet, les groupes de patients ont été identifiés avec l'utilisation de l'ensemble des données longitudinales concernant la sévérité des différents symptômes évalués lors de l'étude PsyCourse. Cela inclus les symptômes de la SCZ, de la manie, et de la dépression, évalués à l'aide d'échelles de symptômes comme le PANSS, ainsi que les capacités cognitives évaluées avec des tests neuropsychologiques. Les groupes de patients identifiés présentent donc des différences de sévérité englobant l'ensemble de ces informations et ne sont pas représentatif d'une dimension symptomatique précise. Il serait intéressant de refaire ce type d'analyse en se concentrant sur un seul type de symptôme. Cela pourrait permettre d'identifier des voies biologiques dont les dérégulations sont responsables du déclenchement et de l'aggravation de la sévérité d'un symptôme précis. Les recherches futures devraient viser à élucider davantage le rôle exact de l'inflammation dans l'aggravation des symptômes des TPS en se concentrant autant que possible sur des dimensions précises de symptômes.

3.3.3 Limitations de cette thèse

Ma thèse présente des résultats prometteurs mais certaines limites doivent être prises en compte pour les interpréter et il me semble nécessaire de les énoncer ici même si certaines l'on déjà été dans les parties précédentes.

Premièrement, l'homogénéité de la cohorte PsyCourse (constituée uniquement de participants allemands) limite la généralisation des résultats. Une meilleure représentation des divers groupes ethniques et géographique permettrait d'évaluer la robustesse des résultats que j'ai obtenu, car des variations génétiques et environnementales pourraient influencer les signatures biologiques identifiées.

Deuxièmement, l'ensemble des analyses que j'ai réalisé est basé sur des prélèvements sanguins. Si ce type d'échantillon est représentatif des changements systémiques provoqués par des maladies et accessible facilement, il est probable, qu'il ne représente pas de manière précise, les altérations qui se produisent spécifiquement

dans le cerveau, qui est l'organe principalement affecté par les TPS. L'utilisation de techniques permettant l'étude des tissus cérébraux ou du LCR, pourrait fournir des informations supplémentaires cruciales pour mieux comprendre la biologie de ces troubles.

Troisièmement, les approches épigénétiques et transcriptomiques menées à partir de la classification réalisée avec les données de l'étude PsyCourse, sur une période de deux ans, pourraient ne pas capturer certaines dynamiques à plus long terme. Des études longitudinales sur des périodes plus longues seraient nécessaires pour mieux comprendre l'évolution de ces altérations moléculaires dans le temps.

Enfin, l'absence de cohorte de validation m'a empêché de tester la robustesse et la généralisation des signatures identifiées. Il sera important que des recherches futures évaluent la reproductibilité et la pertinence clinique de ces résultats sur des populations indépendantes pour vérifier si les gènes identifiés au cours de cette thèse peuvent être utilisés comme biomarqueurs des TPS ou de la sévérité de leurs symptômes.

3.3.4 Conclusion et perspectives

Les deux études de cette thèse abordent les TPS sous des angles différents, ce qui permet de mettre en évidence des aspects complémentaires de la biologie de ces troubles.

Bien que j'aie critiqué les classifications diagnostiques traditionnelles dans mon introduction, je dois admettre qu'elles ont l'avantage de donner aux patients des indications claires sur les symptômes qui les affectent. Dans ma première étude, j'ai donc utilisé une approche centrée sur les classifications diagnostiques traditionnelles qui a permis de renforcer les associations de certains miARN, réalisées par des études précédentes, aux TPS et en identifiant de nouveaux miARN potentiellement impliqués dans ces pathologies. Cette approche met en lumière des voies biologiques distinctes mais aussi partagées entre les troubles thymiques et les troubles psychotiques, soulignant l'importance du SI dans l'étiologie de ces troubles. Cette thèse renforce également le rôle des miARN en tant que biomarqueurs potentiels des TPS, ouvrant la voie à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à ces troubles.

En revanche, ma seconde étude s'écarte des classifications diagnostiques catégorielles pour se concentrer sur la sévérité des symptômes à travers une approche dimensionnelle. Cette méthodologie a été utilisée pour identifier des protéines, principalement des cytokines, dans le sérum qui sont associées au SI et à la gravité des symptômes psychiatriques et non aux entités diagnostiques (SCZ, TB, ...) elles-mêmes. Cette étude met en évidence un lien potentiel entre inflammation et sévérité des symptômes des TPS indépendamment des diagnostics traditionnels. Cela apporte une nouvelle perspective sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces troubles. En particulier, l'expression de la protéine PLAUR se distingue par une forte corrélation avec les performances cognitives, ce qui suggère un rôle potentiel dans les altérations cognitives observées chez certains patients atteints de TPS via la dégradation de la BHE et la mise en place d'une neuro-inflammation aggravant le déclin cognitif des patients. Ces résultats pourraient guider de futures études visant à élucider les mécanismes moléculaires des déficits cognitifs dans les TPS.

Ainsi que je l'ai déjà indiqué dans mon introduction, les TPS sont des troubles complexes avec des facteurs de risques génétiques et non génétiques ([Section 1.2.4](#)). Je me suis donc intéressé lors de mes analyses aux liens entre le génotype et les TPS et leurs symptômes. Dans mon premier projet, les TWAS que j'ai réalisées ont permises l'identification de miARN dont l'expression régulée par le génotype est associée aux phénotypes (TB ou SCZ), renforçant le lien entre le génotype et les diagnostics traditionnels. Cependant, lorsque dans mon deuxième projet, j'ai comparé, entre mes deux groupes de sévérités, les PRS des différents troubles dont les participants étaient diagnostiqués, je n'ai pas identifié de différences statistiquement significatives. Cela suggère que le génotype influence davantage la susceptibilité de développer les TPS que la sévérité des symptômes liés à ces maladies. Il faut cependant prendre en compte le fait que je n'ai comparé que les PRS, sans réaliser de GWAS à cause du faible nombre d'individus disponibles. Il serait intéressant que dans le futur, des cohortes plus importantes soient utilisées pour obtenir des groupes de sévérité similaires à ceux que j'ai construits ou se focalisant sur un seul type de symptômes (manie, dépression, cognition, ...) pour réaliser des GWAS.

En conclusion, ces deux études montrent que la classification des patients selon leurs diagnostics reste utile pour identifier des signatures spécifiques à une maladie ou un ensemble de maladie, et notamment des facteurs de risques tels que les facteurs génétiques. Cependant, une approche dimensionnelle basée sur la sévérité peut mettre en lumière des mécanismes biologiques supplémentaires associés à un type précis de symptômes, potentiellement communs à plusieurs types de TPS. Cette distinction ouvre la voie à une meilleure compréhension des différents facteurs contribuant à l'étiologie et à la progression des TPS, ainsi qu'à l'identification de cibles thérapeutiques plus précises pour la prise en charge des patients. Il apparaît donc crucial que dans le futur, davantage d'études adoptent des approche dimensionnelles similaire à celle utilisée dans mon second projet, où la sévérité des TPS est analysée indépendamment du diagnostic clinique traditionnel. En se concentrant sur un symptôme en particulier, une telle approche pourrait permettre de mieux cerner les mécanismes sous-jacents de ces symptômes et favoriser le développement de stratégies thérapeutiques plus ciblées et personnalisées. Mes résultats apportent donc des pistes prometteuses pour la recherche sur les TPS, mais elles devront être approfondies par des études postérieures intégrant des populations plus diversifiées.

Références

1. Beveridge, N. J. & Cairns, M. J. [MicroRNA dysregulation in schizophrenia](#). *Neurobiology of Disease* **46**, 263–271 (2012).
2. Fries, G. R., Carvalho, A. F. & Quevedo, J. [The miRNome of bipolar disorder](#). *Journal of Affective Disorders* **233**, 110–116 (2018).
3. Żurawek, D. & Turecki, G. [The miRNome of Depression](#). *IJMS* **22**, 11312 (2021).
4. Delaney, S. et al. [Inflammatory biomarkers in psychosis and clinical high risk populations](#). *Schizophrenia Research* **206**, 440–443 (2019).
5. Watson, J. D. & Crick, F. H. [Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid](#). *Nature* **171**, 737–738 (1953).
6. Meselson, M. & Stahl, F. W. [THE REPLICATION OF DNA IN ESCHERICHIA COLI](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 671–682 (1958).
7. Temin, H. M. & Mizutani, S. [RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus](#). *Nature* **226**, 1211–1213 (1970).
8. Jacob, F. & Monod, J. [Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins](#). *J Mol Biol* **3**, 318–356 (1961).
9. Fyodorov, D. V., Zhou, B.-R., Skoultchi, A. I. & Bai, Y. [Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function](#). *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 192–206 (2018).
10. Bird, A. [DNA methylation patterns and epigenetic memory](#). *Genes Dev.* **16**, 6–21 (2002).
11. Hannon, E. et al. [DNA methylation meta-analysis reveals cellular alterations in psychosis and markers of treatment-resistant schizophrenia](#). *eLife* **10**, e58430 (2021).
12. Allfrey, V. G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. [ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 786–794 (1964).

13. Gavin, D. P. & Sharma, R. P. [Histone modifications, DNA methylation, and Schizophrenia](#). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **34**, 882–888 (2010).
14. Smigielski, L., Jagannath, V., Rössler, W., Walitza, S. & Grünblatt, E. [Epigenetic mechanisms in schizophrenia and other psychotic disorders: A systematic review of empirical human findings](#). *Mol Psychiatry* **25**, 1718–1748 (2020).
15. Chen, Y. [On the epigenetic regulation of the human reelin promoter](#). *Nucleic Acids Research* **30**, 2930–2939 (2002).
16. Mitchell, C. P., Chen, Y., Kundakovic, M., Costa, E. & Grayson, D. R. [Histone deacetylase inhibitors decrease Reelin promoter methylation in Vitro](#). *Journal of Neurochemistry* **93**, 483–492 (2005).
17. Gürel, Çevik, Kuşçu, G. C., Yavaşoğlu, A. & Biray Avcı, Çığır. [The clues in solving the mystery of major psychosis: The epigenetic basis of schizophrenia and bipolar disorder](#). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **113**, 51–61 (2020).
18. Hoffman, G. E. et al. [CommonMind Consortium provides transcriptomic and epigenomic data for Schizophrenia and Bipolar Disorder](#). *Sci Data* **6**, 180 (2019).
19. Tokar, T. et al. [mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions](#). *Nucleic Acids Res* **46**, D360–D370 (2018).
20. Petretera, A. et al. [Multiplatform Approach for Plasma Proteomics: Complementarity of Olink Proximity Extension Assay Technology to Mass Spectrometry-Based Protein Profiling](#). *J. Proteome Res.* **20**, 751–762 (2021).
21. Gusev, A. et al. [Integrative approaches for large-scale transcriptome-wide association studies](#). *Nature Genetics* **48**, 245–252 (2016).
22. [Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019](#). *The Lancet Psychiatry* **9**, 137–150 (2022).
23. Ormel, J., Hollon, S. D., Kessler, R. C., Cuijpers, P. & Monroe, S. M. [More treatment but no less depression: The treatment-prevalence paradox](#). *Clinical Psychology Review* **91**, 102111 (2022).

24. Ormel, J. & Emmelkamp, P. M. G. [More Treatment, but Not Less Anxiety and Mood Disorders: Why? Seven Hypotheses and Their Evaluation](#). *Psychotherapy and Psychosomatics* **92**, 73–80 (2023).
25. Yamada, Y., Matsumoto, M., Iijima, K. & Sumiyoshi, T. [Specificity and Continuity of Schizophrenia and Bipolar Disorder: Relation to Biomarkers](#). *Curr Pharm Des* **26**, 191–200 (2020).
26. Koreen, A. R. et al. [Depression in first-episode schizophrenia](#). *Am J Psychiatry* **150**, 1643–1648 (1993).
27. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5 (Depressive Disorders). in 155–188 (American Psychiatric Association, 2013).
28. Bromet, E. et al. [Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode](#). *BMC Medicine* **9**, 90 (2011).
29. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5 (Bipolar and Related Disorder). in 123–154 (American Psychiatric Association, 2013).
30. Ousdal, O. T. et al. [The Neurobiological Effects of Electroconvulsive Therapy Studied Through Magnetic Resonance: What Have We Learned, and Where Do We Go?](#) *Biological Psychiatry* **91**, 540–549 (2022).
31. Perrin, J. S. et al. [Electroconvulsive therapy reduces frontal cortical connectivity in severe depressive disorder](#). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 5464–5468 (2012).
32. Cuijpers, P., Van Straten, A., Warmerdam, L. & Andersson, G. [Psychotherapy versus the combination of psychotherapy and pharmacotherapy in the treatment of depression: A meta-analysis](#). *Depress. Anxiety* **26**, 279–288 (2009).
33. Merikangas, K. R. et al. [Prevalence and Correlates of Bipolar Spectrum Disorder in the World Mental Health Survey Initiative](#). *Archives of General Psychiatry* **68**, 241 (2011).

34. Guilbert, J. J. [The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life](#). *Education for Health (Abingdon, England)* **16**, 230 (2003).
35. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5 (Schizophrenia Spectrum and Other Psychotic Disorders). in 87–122 (American Psychiatric Association, 2013).
36. Meyer, F. & Meyer, T. D. [The misdiagnosis of bipolar disorder as a psychotic disorder: Some of its causes and their influence on therapy](#). *Journal of Affective Disorders* **112**, 174–183 (2009).
37. [The acute schizoaffective psychoses. 1933 \[classical article\]](#). *American Journal of Psychiatry* **151**, 144–154 (1994).
38. Nucifora, F. C., Woznica, E., Lee, B. J., Cascella, N. & Sawa, A. [Treatment resistant schizophrenia: Clinical, biological, and therapeutic perspectives](#). *Neurobiol Dis* **131**, 104257 (2019).
39. Teplin, L. A., McClelland, G. M., Abram, K. M. & Weiner, D. A. [Crime victimization in adults with severe mental illness: Comparison with the National Crime Victimization Survey](#). *Archives of General Psychiatry* **62**, 911–921 (2005).
40. Thornicroft, G., Brohan, E., Rose, D., Sartorius, N. & Leese, M. [Global pattern of experienced and anticipated discrimination against people with schizophrenia: A cross-sectional survey](#). *The Lancet* **373**, 408–415 (2009).
41. Van Zelst, C. [Stigmatization as an Environmental Risk in Schizophrenia: A User Perspective](#). *Schizophrenia Bulletin* **35**, 293–296 (2009).
42. Mullins, N. *et al.* [Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology](#). *Nature Genetics* **53**, 817–829 (2021).
43. The Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke, S., Walters, J. T. & O'Donovan, M. C. [Mapping genomic loci prioritises genes and implicates synaptic biology in schizophrenia](#). (2020) doi:[10.1101/2020.09.12.20192922](https://doi.org/10.1101/2020.09.12.20192922).

44. Tomasik, J. et al. [Association of Insulin Resistance With Schizophrenia Polygenic Risk Score and Response to Antipsychotic Treatment](#). *JAMA Psychiatry* **76**, 864 (2019).
45. Tesli, M. et al. [Polygenic risk score and the psychosis continuum model](#). *Acta Psychiatr Scand* **130**, 311–317 (2014).
46. Lichtenstein, P. et al. [Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: A population-based study](#). *Lancet (London, England)* **373**, 234–239 (2009).
47. Cardno, A. G. & Owen, M. J. [Genetic relationships between schizophrenia, bipolar disorder, and schizoaffective disorder](#). *Schizophrenia Bulletin* **40**, 504–515 (2014).
48. Faridi, K., Pawliuk, N., King, S., Jooper, R. & Malla, A. K. [Prevalence of psychotic and non-psychotic disorders in relatives of patients with a first episode psychosis](#). *Schizophr Res* **114**, 57–63 (2009).
49. Craddock, N. & Owen, M. J. [The beginning of the end for the Kraepelinian dichotomy](#). *Br J Psychiatry* **186**, 364–366 (2005).
50. Dean, K. & Murray, R. M. [Environmental risk factors for psychosis](#). *Dialogues Clin Neurosci* **7**, 69–80 (2005).
51. AbdelMalik, P., Husted, J., Chow, E. W. C. & Bassett, A. S. [Childhood head injury and expression of schizophrenia in multiply affected families](#). *Arch Gen Psychiatry* **60**, 231–236 (2003).
52. Molloy, C., Conroy, R. M., Cotter, D. R. & Cannon, M. [Is traumatic brain injury a risk factor for schizophrenia? A meta-analysis of case-controlled population-based studies](#). *Schizophr Bull* **37**, 1104–1110 (2011).
53. Horan, W. P. et al. [Stressful life events in recent-onset schizophrenia: Reduced frequencies and altered subjective appraisals](#). *Schizophrenia Research* **75**, 363–374 (2005).
54. Kendler, K. S., Karkowski, L. M. & Prescott, C. A. [Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression](#). *AJP* **156**, 837–841 (1999).

55. Koenders, M. A. et al. [Stressful life events in bipolar I and II disorder: Cause or consequence of mood symptoms?](#) *Journal of Affective Disorders* **161**, 55–64 (2014).
56. Vardaxi, C. Ch., Gonda, X. & Fountoulakis, K. N. [Life events in schizoaffective disorder: A systematic review.](#) *Journal of Affective Disorders* **227**, 563–570 (2018).
57. Wang, Q. et al. [Relationship between stressful life events, coping styles, and schizophrenia relapse.](#) *Int J Ment Health Nurs* **30**, 1149–1159 (2021).
58. Liu, R. T. & Alloy, L. B. [Stress generation in depression: A systematic review of the empirical literature and recommendations for future study.](#) *Clin Psychol Rev* **30**, 582–593 (2010).
59. Marconi, A., Di Forti, M., Lewis, C. M., Murray, R. M. & Vassos, E. [Meta-analysis of the Association Between the Level of Cannabis Use and Risk of Psychosis.](#) *Schizophr Bull* **42**, 1262–1269 (2016).
60. Ortiz-Medina, M. B. et al. [Cannabis consumption and psychosis or schizophrenia development.](#) *Int J Soc Psychiatry* **64**, 690–704 (2018).
61. Quigley, H. & MacCabe, J. H. [The relationship between nicotine and psychosis.](#) *Ther Adv Psychopharmacol* **9**, 2045125319859969 (2019).
62. Šagud, M. et al. Smoking in Schizophrenia: An Updated Review. *Psychiatr Danub* **30**, 216–223 (2018).
63. Müller, N., Weidinger, E., Leitner, B. & Schwarz, M. J. [The role of inflammation in schizophrenia.](#) *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
64. Muneer, A. [Bipolar Disorder: Role of Inflammation and the Development of Disease Biomarkers.](#) *Psychiatry Investig* **13**, 18 (2016).
65. Osimo, E. F., Cardinal, R. N., Jones, P. B. & Khandaker, G. M. [Prevalence and correlates of low-grade systemic inflammation in adult psychiatric inpatients: An electronic health record-based study.](#) *Psychoneuroendocrinology* **91**, 226–234 (2018).
66. Goldstein, B. I. et al. [Inflammatory Markers Among Adolescents and Young Adults With Bipolar Spectrum Disorders.](#) *J. Clin. Psychiatry* **76**, 1556–1563 (2015).

67. Capuron, L. *et al.* [Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: Phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions.](#) *Neuropsychopharmacology* **26**, 643–652 (2002).
68. De Bock, M. & Sienaert, P. [Corticosteroids and mania: A systematic review.](#) *World J Biol Psychiatry* **25**, 161–174 (2024).
69. Murray, R. M. *et al.* [A developmental model for similarities and dissimilarities between schizophrenia and bipolar disorder.](#) *Schizophrenia Research* **71**, 405–416 (2004).
70. Galasko, D., Kwo-On-Yuen, P. F. & Thal, L. [Intracranial Mass Lesions Associated With Late-Onset Psychosis and Depression.](#) *Psychiatric Clinics of North America* **11**, 151–166 (1988).
71. Romero-Luna, G. *et al.* Schizophrenia-Like Psychosis Presented in a Patient With a Temporal Lobe Tumor: A Case Report. *Cureus* (2022) doi:[10.7759/cureus.29034](https://doi.org/10.7759/cureus.29034).
72. Maldonado, K. A. & Alsayouri, K. [Physiology, Brain.](#) in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2024).
73. Thau, L., Reddy, V. & Singh, P. [Anatomy, Central Nervous System.](#) in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2024).
74. Sato, K., Ogoh, S., Hirasawa, A., Oue, A. & Sadamoto, T. [The distribution of blood flow in the carotid and vertebral arteries during dynamic exercise in humans.](#) *The Journal of Physiology* **589**, 2847–2856 (2011).
75. 'Angeles Fern'andez-Gil, M., Palacios-Bote, R., Leo-Barahona, M. & Mora-Encinas, J. P. [Anatomy of the Brainstem: A Gaze Into the Stem of Life.](#) *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* **31**, 196–219 (2010).
76. Rudolph, S. *et al.* [Cognitive-Affective Functions of the Cerebellum.](#) *J Neurosci* **43**, 7554–7564 (2023).
77. Andreasen, N. C. & Pierson, R. [The role of the cerebellum in schizophrenia.](#) *Biol Psychiatry* **64**, 81–88 (2008).

78. Fischer, N. M. *et al.* [Brainstem Pathologies Correlate With Depression and Psychosis in Parkinson's Disease](#). *Am J Geriatr Psychiatry* **29**, 958–968 (2021).
79. Fisman, M. [The brain stem in psychosis](#). *Br J Psychiatry* **126**, 414–422 (1975).
80. Herrero, M.-T., Barcia, C. & Navarro, J. M. [Functional anatomy of thalamus and basal ganglia](#). *Childs Nerv Syst* **18**, 386–404 (2002).
81. Yamashina, F. *et al.* [Daily expression of a clock gene in the brain and pituitary of the Malabar grouper \(Epinephelus malabaricus\)](#). *Gen Comp Endocrinol* **280**, 9–14 (2019).
82. Salas, C., Rodríguez, F., Vargas, J. P., Dur'an, E. & Torres, B. [Spatial learning and memory deficits after telencephalic ablation in goldfish trained in place and turn maze procedures](#). *Behav Neurosci* **110**, 965–980 (1996).
83. McKinney, R. A. *et al.* [Relational memory in the early stage of psychotic bipolar disorder](#). *Psychiatry Res* **294**, 113508 (2020).
84. Panov, G., Dyulgerova, S. & Panova, P. [Cognition in Patients with Schizophrenia: Interplay between Working Memory, Disorganized Symptoms, Dissociation, and the Onset and Duration of Psychosis, as Well as Resistance to Treatment](#). *Biomedicines* **11**, 3114 (2023).
85. Sheffield, J. M., Karcher, N. R. & Barch, D. M. [Cognitive Deficits in Psychotic Disorders: A Lifespan Perspective](#). *Neuropsychol Rev* **28**, 509–533 (2018).
86. Shenoy, S. S. & Lui, F. [Neuroanatomy, Ventricular System](#). in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2024).
87. Javed, K., Reddy, V. & Lui, F. [Neuroanatomy, Choroid Plexus](#). in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2024).
88. Møllgård, K. *et al.* [A mesothelium divides the subarachnoid space into functional compartments](#). *Science* **379**, 84–88 (2023).
89. Derk, J. *et al.* [Formation and function of the meningeal arachnoid barrier around the developing mouse brain](#). *Developmental Cell* **58**, 635–644.e4 (2023).

90. Johanson, C. E., Stopa, E. G. & McMillan, P. N. [The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance](#). in *The Blood-Brain and Other Neural Barriers* (ed. Nag, S.) vol. 686 101–131 (Humana Press, 2011).
91. Oliver, C., Ben-Jonathan, N., Mical, S. & Porter, J. C. [Transport of Thyrotropin-Releasing Hormone from Cerebrospinal Fluid to Hypophysial Portal Blood and the Release of Thyrotropin](#). *Endocrinology* **97**, 1138–1143 (1975).
92. Spector, R. [Nutrient transport systems in brain: 40 years of progress](#). *Journal of Neurochemistry* **111**, 315–320 (2009).
93. Bjorefeldt, A., Illes, S., Zetterberg, H. & Hanse, E. [Neuromodulation via the Cerebrospinal Fluid: Insights from Recent in Vitro Studies](#). *Front Neural Circuits* **12**, 5 (2018).
94. Xu, X. *et al.* [Understanding immune microenvironment alterations in the brain to improve the diagnosis and treatment of diverse brain diseases](#). *Cell Commun Signal* **22**, 132 (2024).
95. Rua, R. & McGavern, D. B. [Advances in Meningeal Immunity](#). *Trends Mol Med* **24**, 542–559 (2018).
96. Mapunda, J. A., Tibar, H., Regragui, W. & Engelhardt, B. [How Does the Immune System Enter the Brain?](#) *Front. Immunol.* **13**, 805657 (2022).
97. Shah, T. *et al.* [Arachnoid granulations are lymphatic conduits that communicate with bone marrow and dura-arachnoid stroma](#). *Journal of Experimental Medicine* **220**, e20220618 (2023).
98. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. [The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications](#). *Neurobiol Dis* **16**, 1–13 (2004).
99. Betz, A. L., Firth, J. A. & Goldstein, G. W. [Polarity of the blood-brain barrier: Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells](#). *Brain Res* **192**, 17–28 (1980).
100. Rössler, K. *et al.* [Expression of leucocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier \(BBB\)](#). *J Neurosci Res* **31**, 365–374 (1992).

101. Santa-Maria, A. R. *et al.* [Flow induces barrier and glycocalyx-related genes and negative surface charge in a lab-on-a-chip human blood-brain barrier model.](#) *J Cereb Blood Flow Metab* **41**, 2201–2215 (2021).
102. Chaves, J. C. S., Dando, S. J., White, A. R. & Oikari, L. E. [Blood-brain barrier transporters: An overview of function, dysfunction in Alzheimer’s disease and strategies for treatment.](#) *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1870**, 166967 (2024).
103. Oldendorf, W. H., Cornford, M. E. & Brown, W. J. [The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat.](#) *Ann Neurol* **1**, 409–417 (1977).
104. Baeten, K. M. & Akassoglou, K. [Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke.](#) *Dev Neurobiol* **71**, 1018–1039 (2011).
105. Xu, L., Nirwane, A. & Yao, Y. [Basement membrane and blood-brain barrier.](#) *Stroke Vasc Neurol* **4**, 78–82 (2019).
106. D’iaz-Flores, L. *et al.* [Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche.](#) *Histol Histopathol* **24**, 909–969 (2009).
107. Winkler, E. A., Bell, R. D. & Zlokovic, B. V. [Central nervous system pericytes in health and disease.](#) *Nat Neurosci* **14**, 1398–1405 (2011).
108. Armulik, A. *et al.* [Pericytes regulate the blood-brain barrier.](#) *Nature* **468**, 557–561 (2010).
109. Hamilton, N. B., Attwell, D. & Hall, C. N. [Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: A component of neurovascular coupling in health and disease.](#) *Front Neuroenergetics* **2**, 5 (2010).
110. Thomas, W. E. [Brain macrophages: On the role of pericytes and perivascular cells.](#) *Brain Res Brain Res Rev* **31**, 42–57 (1999).
111. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. [Astrocytes: Biology and pathology.](#) *Acta Neuropathol* **119**, 7–35 (2010).

112. Abbott, N. J. [Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability](#). *J Anat* **200**, 629–638 (2002).
113. Kiray, H., Lindsay, S. L., Hosseinzadeh, S. & Barnett, S. C. [The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination](#). *Exp Neurol* **283**, 541–549 (2016).
114. Meeks, J. P. & Mennerick, S. [Feeding hungry neurons: Astrocytes deliver food for thought](#). *Neuron* **37**, 187–189 (2003).
115. Abbott, N. J. [Dynamics of CNS barriers: Evolution, differentiation, and modulation](#). *Cell Mol Neurobiol* **25**, 5–23 (2005).
116. Duvernoy, H. M. & Risold, P.-Y. [The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization](#). *Brain Res Rev* **56**, 119–147 (2007).
117. Egleton, R. D. & Davis, T. P. [Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier](#). *NeuroRx* **2**, 44–53 (2005).
118. Hladky, S. B. & Barrand, M. A. [Fluid and ion transfer across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles](#). *Fluids Barriers CNS* **13**, 19 (2016).
119. Pardridge, W. M. [Blood-brain barrier endogenous transporters as therapeutic targets: A new model for small molecule CNS drug discovery](#). *Expert Opin Ther Targets* **19**, 1059–1072 (2015).
120. Ohtsuki, S. [New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system](#). *Biol Pharm Bull* **27**, 1489–1496 (2004).
121. Pardridge, W. M. [The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development](#). *NeuroRx* **2**, 3–14 (2005).
122. Hong, S. & Van Kaer, L. [Immune privilege: Keeping an eye on natural killer T cells](#). *J Exp Med* **190**, 1197–1200 (1999).
123. Murphy, J. B. & Sturm, E. [CONDITIONS DETERMINING THE TRANSPLANTABILITY OF TISSUES IN THE BRAIN](#). *Journal of Experimental Medicine* **38**, 183–197 (1923).

124. Louveau, A. *et al.* [Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels](#). *Nature* **523**, 337–341 (2015).
125. Engelhardt, B. [Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood–brain barrier](#). *J Neural Transm* **113**, 477–485 (2006).
126. Mucke, L. & Oldstone, M. B. A. [The expression of major histocompatibility complex \(MHC\) class I antigens in the brain differs markedly in acute and persistent infections with lymphocytic choriomeningitis virus \(LCMV\)](#). *Journal of Neuroimmunology* **36**, 193–198 (1992).
127. Brown, P. D., Davies, S. L., Speake, T. & Millar, I. D. [Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production](#). *Neuroscience* **129**, 955–968 (2004).
128. Ransohoff, R. M. & Engelhardt, B. [The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system](#). *Nat Rev Immunol* **12**, 623–635 (2012).
129. Boccazzi, M., Raffaele, S. & Fumagalli, M. [Not only myelination: The immune-inflammatory functions of oligodendrocytes](#). *Neural Regen Res* **17**, 2661–2663 (2022).
130. Gimsa, U., Mitchison, N. A. & Brunner-Weinzierl, M. C. [Immune privilege as an intrinsic CNS property: Astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation](#). *Mediators Inflamm* **2013**, 320519 (2013).
131. Madeira, M. M., Hage, Z. & Tsirka, S. E. [Beyond Myelination: Possible Roles of the Immune Proteasome in Oligodendroglial Homeostasis and Dysfunction](#). *Front Neurosci* **16**, 867357 (2022).
132. Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. [The myeloid cells of the central nervous system parenchyma](#). *Nature* **468**, 253–262 (2010).
133. Colombo, E. & Farina, C. [Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation](#). *Trends in Immunology* **37**, 608–620 (2016).
134. Dong, Y. & Benveniste, E. N. [Immune function of astrocytes](#). *Glia* **36**, 180–190 (2001).

135. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. & Kelley, K. W. [From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain.](#) *Nat Rev Neurosci* **9**, 46–56 (2008).
136. Dantzer, R. [Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa.](#) *Physiol Rev* **98**, 477–504 (2018).
137. Dyatlova, A. S., Novikova, N. S., Yushkov, B. G., Korneva, E. A. & Chereshnev, V. A. [The Blood-Brain Barrier in Neuroimmune Interactions and Pathological Processes.](#) *Her Russ Acad Sci* **92**, 590–599 (2022).
138. Galea, I. [The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation.](#) *Cell Mol Immunol* **18**, 2489–2501 (2021).
139. Takata, F., Nakagawa, S., Matsumoto, J. & Dohgu, S. [Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction.](#) *Front Cell Neurosci* **15**, 661838 (2021).
140. Lenz, K. M. & Nelson, L. H. [Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function.](#) *Front Immunol* **9**, 698 (2018).
141. Brioschi, S. *et al.* [Heterogeneity of meningeal B cells reveals a lymphopoietic niche at the CNS borders.](#) *Science* **373**, eabf9277 (2021).
142. Louveau, A. *et al.* [CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature.](#) *Nat Neurosci* **21**, 1380–1391 (2018).
143. Aspelund, A. *et al.* [A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules.](#) *J Exp Med* **212**, 991–999 (2015).
144. Janelins, M. C. *et al.* [Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice.](#) *Am J Pathol* **173**, 1768–1782 (2008).
145. Janelins, M. C. *et al.* [Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression](#)

[specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice.](#) *J Neuroinflammation* **2**, 23 (2005).

146. Lieberman, A. P., Pitha, P. M., Shin, H. S. & Shin, M. L. [Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6348–6352 (1989).

147. Didier, N. *et al.* [Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability.](#) *J Neurochem* **86**, 246–254 (2003).

148. Jirik, F. R. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol* **142**, 144–147 (1989).

149. Maimone, D. *et al.* [Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: Synergism with IL-1 \$\beta\$ and TNF \$\alpha\$.](#) *Journal of Neuroimmunology* **47**, 73–81 (1993).

150. Reyes, T. M., Fabry, Z. & Coe, C. L. [Brain endothelial cell production of a neuroprotective cytokine, interleukin-6, in response to noxious stimuli.](#) *Brain Research* **851**, 215–220 (1999).

151. Kawanokuchi, J. *et al.* [Production of interferon-gamma by microglia.](#) *Mult Scler* **12**, 558–564 (2006).

152. Neumann, H., Schmidt, H., Wilharm, E., Behrens, L. & Wekerle, H. [Interferon gamma gene expression in sensory neurons: Evidence for autocrine gene regulation.](#) *J Exp Med* **186**, 2023–2031 (1997).

153. Gruol, D. L. [IL-6 regulation of synaptic function in the CNS.](#) *Neuropharmacology* **96**, 42–54 (2015).

154. Huang, Y., Smith, D. E., Ib'añez-Sandoval, O., Sims, J. E. & Friedman, W. J. [Neuron-specific effects of interleukin-1 \$\beta\$ are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein.](#) *J Neurosci* **31**, 18048–18059 (2011).

155. Park, K. M. & Bowers, W. J. [Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction.](#) *Cell Signal* **22**, 977–983 (2010).

156. Probert, L. [TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects](#). *Neuroscience* **302**, 2–22 (2015).
157. Reale, M., Costantini, E. & Greig, N. H. [Cytokine Imbalance in Schizophrenia. From Research to Clinic: Potential Implications for Treatment](#). *Front. Psychiatry* **12**, 536257 (2021).
158. Bonney, S. *et al.* [Gamma Interferon Alters Junctional Integrity via Rho Kinase, Resulting in Blood-Brain Barrier Leakage in Experimental Viral Encephalitis](#). *mBio* **10**, e01675–19 (2019).
159. Chen, A.-Q. *et al.* [Microglia-derived TNF- \$\alpha\$ mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke](#). *Cell Death Dis* **10**, 487 (2019).
160. Hauptmann, J. *et al.* [Interleukin-1 promotes autoimmune neuroinflammation by suppressing endothelial heme oxygenase-1 at the blood-brain barrier](#). *Acta Neuropathol* **140**, 549–567 (2020).
161. Yang, S. *et al.* [Anesthesia and Surgery Impair Blood-Brain Barrier and Cognitive Function in Mice](#). *Front Immunol* **8**, 902 (2017).
162. Yang, J. *et al.* [Burns Impair Blood-Brain Barrier and Mesenchymal Stem Cells Can Reverse the Process in Mice](#). *Front Immunol* **11**, 578879 (2020).
163. Zhang, W., Xiao, D., Mao, Q. & Xia, H. [Role of neuroinflammation in neurodegeneration development](#). *Sig Transduct Target Ther* **8**, 267 (2023).
164. Marchetti, L. & Engelhardt, B. [Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation](#). *Vasc Biol* **2**, H1–H18 (2020).
165. Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. & Vizi, E. S. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. *Pharmacol Rev* **52**, 595–638 (2000).
166. Kipnis, J. *et al.* [Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4+CD25+ regulatory T-cell activity: Implications for neurodegeneration](#). *J Neurosci* **24**, 6133–6143 (2004).

167. Prado, C. *et al.* [Stimulation of dopamine receptor D5 expressed on dendritic cells potentiates Th17-mediated immunity.](#) *J Immunol* **188**, 3062–3070 (2012).
168. Wong, C. H. Y., Jenne, C. N., Lee, W.-Y., L'eger, C. & Kubes, P. [Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke.](#) *Science* **334**, 101–105 (2011).
169. Bellinger, D. L., Lorton, D., Felten, S. Y. & Felten, D. L. [Innervation of lymphoid organs and implications in development, aging, and autoimmunity.](#) *Int J Immunopharmacol* **14**, 329–344 (1992).
170. Nance, D. M. & Sanders, V. M. [Autonomic innervation and regulation of the immune system \(1987-2007\).](#) *Brain Behav Immun* **21**, 736–745 (2007).
171. Ai, S. & Klein, R. S. [Update on T cells in the virally infected brain: Friends and foes.](#) *Curr Opin Neurol* **33**, 405–412 (2020).
172. Frosch, M., Amann, L. & Prinz, M. [CNS-associated macrophages shape the inflammatory response in a mouse model of Parkinson's disease.](#) *Nat Commun* **14**, 3753 (2023).
173. Wagner, C. A., Roqu'e, P. J., Mileur, T. R., Liggitt, D. & Goverman, J. M. [Myelin-specific CD8+ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity.](#) *J Clin Invest* **130**, 203–213 (2020).
174. Turnbull, A. V. & Rivier, C. L. [Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: Actions and mechanisms of action.](#) *Physiol Rev* **79**, 1–71 (1999).
175. Wolf, O. T. [HPA axis and memory.](#) *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **17**, 287–299 (2003).
176. Young, A. H. [The effects of HPA axis function on cognition and its implications for the pathophysiology of bipolar disorder.](#) *Harv Rev Psychiatry* **22**, 331–333 (2014).
177. Bellavance, M.-A. & Rivest, S. [The HPA "Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain.](#) *Front. Immunol.* **5**, (2014).
178. Cain, D. W. & Cidlowski, J. A. [Immune regulation by glucocorticoids.](#) *Nat Rev Immunol* **17**, 233–247 (2017).

179. Louveau, A., Harris, T. H. & Kipnis, J. [Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege](#). *Trends in Immunology* **36**, 569–577 (2015).
180. Shrestha, R., Millington, O., Brewer, J. & Bushell, T. [Is central nervous system an immune-privileged site?](#) *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* **11**, 102–107 (2013).
181. Sundman, E. & Olofsson, P. S. [Neural control of the immune system](#). *Adv Physiol Educ* **38**, 135–139 (2014).
182. Ahmad, M. A. *et al.* [Neuroinflammation: A Potential Risk for Dementia](#). *Int J Mol Sci* **23**, 616 (2022).
183. Ermakov, E. A., Mednova, I. A., Boiko, A. S., Buneva, V. N. & Ivanova, S. A. [Chemokine Dysregulation and Neuroinflammation in Schizophrenia: A Systematic Review](#). *Int J Mol Sci* **24**, 2215 (2023).
184. Chaves-Filho, A., Eyres, C., Blöbaum, L., Landwehr, A. & Tremblay, M. The emerging neuroimmune hypothesis of bipolar disorder: An updated overview of neuroimmune and microglial findings. *J Neurochem* (2024) doi:[10.1111/jnc.16098](#).
185. Hodes, G. E., Kana, V., Menard, C., Merad, M. & Russo, S. J. [Neuroimmune mechanisms of depression](#). *Nat Neurosci* **18**, 1386–1393 (2015).
186. Smyth, A. M. & Lawrie, S. M. [The neuroimmunology of schizophrenia](#). *Clin Psychopharmacol Neurosci* **11**, 107–117 (2013).
187. Leboyer, M. *et al.* [Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease?](#) *Journal of Affective Disorders* **141**, 1–10 (2012).
188. Leonard, B. E., Schwarz, M. & Myint, A. M. [The metabolic syndrome in schizophrenia: Is inflammation a contributing cause?](#) *J Psychopharmacol* **26**, 33–41 (2012).
189. McIntyre, R. S., Konarski, J. Z. & Yatham, L. N. [Comorbidity in bipolar disorder: A framework for rational treatment selection](#). *Hum Psychopharmacol* **19**, 369–386 (2004).
190. Schoepf, D., Uppal, H., Potluri, R. & Heun, R. [Physical comorbidity and its relevance on mortality in schizophrenia: A naturalistic 12-year follow-up in general hospital admissions](#). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **264**, 3–28 (2014).

191. Laumet, G. [Peripheral somatosensory neurons listen and orchestrate the immune response](#). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **153**, 977–979 (2024).
192. Miller, R. J., Jung, H., Bhangoo, S. K. & White, F. A. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb Exp Pharmacol* 417–449 (2009) doi:[10.1007/978-3-540-79090-7_12](#).
193. Quan, N., Whiteside, M. & Herkenham, M. [Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide](#). *Neuroscience* **83**, 281–293 (1998).
194. Vitkovic, L. *et al.* [Cytokine signals propagate through the brain](#). *Mol Psychiatry* **5**, 604–615 (2000).
195. Banks, W. A. [The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology](#). *Neurol Clin* **24**, 413–419 (2006).
196. Laricchiuta, D. *et al.* [The role of glial cells in mental illness: A systematic review on astroglia and microglia as potential players in schizophrenia and its cognitive and emotional aspects](#). *Front. Cell. Neurosci.* **18**, 1358450 (2024).
197. Naggan, L. *et al.* [Suicide in bipolar disorder patients is associated with hippocampal microglia activation and reduction of lymphocytes-activation gene 3 \(LAG3\) microglial checkpoint expression](#). *Brain, Behavior, and Immunity* **110**, 185–194 (2023).
198. Watkins, C. C., Sawa, A. & Pomper, M. G. [Glia and immune cell signaling in bipolar disorder: Insights from neuropharmacology and molecular imaging to clinical application](#). *Transl Psychiatry* **4**, e350–e350 (2014).
199. Zhuo, C. *et al.* [Microglia and cognitive impairment in schizophrenia: Translating scientific progress into novel therapeutic interventions](#). *Schizophrenia (Heidelb)* **9**, 42 (2023).
200. Geloso, M. C. & D’Ambrosi, N. [Microglial Pruning: Relevance for Synaptic Dysfunction in Multiple Sclerosis and Related Experimental Models](#). *Cells* **10**, 686 (2021).

201. Zhu, W. & Zhang, X. [Research progress of miRNA in different depression model samples](#). *AETR* **1**, 497 (2022).
202. Ghafelehbashi, H., Pahlevan Kakhki, M., Kular, L., Moghbelinejad, S. & Ghafelehbashi, S. H. [Decreased Expression of IFNG-AS1, IFNG and IL-1B Inflammatory Genes in Medicated Schizophrenia and Bipolar Patients](#). *Scand J Immunol* **86**, 479–485 (2017).
203. Hänninen, K. *et al.* [Interleukin-1 beta gene polymorphism and its interactions with neuregulin-1 gene polymorphism are associated with schizophrenia](#). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **258**, 10–15 (2008).
204. Kim, H.-J. *et al.* [Roles of interferon-gamma and its target genes in schizophrenia: Proteomics-based reverse genetics from mouse to human](#). *Proteomics* **12**, 1815–1829 (2012).
205. Lv, M. H. *et al.* [Decreased serum TNF-alpha levels in chronic schizophrenia patients on long-term antipsychotics: Correlation with psychopathology and cognition](#). *Psychopharmacology (Berl)* **232**, 165–172 (2015).
206. Subbanna, M. *et al.* [Role of IL-6/RORC/IL-22 axis in driving Th17 pathway mediated immunopathogenesis of schizophrenia](#). *Cytokine* **111**, 112–118 (2018).
207. Zhou, X., Tian, B. & Han, H.-B. [Serum interleukin-6 in schizophrenia: A system review and meta-analysis](#). *Cytokine* **141**, 155441 (2021).
208. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*. (American Psychiatric Association, 2013).
209. Shen, H., Zhang, L., Xu, C. & Zhu, J. [Analysis of Misdiagnosis of Bipolar Disorder in An Outpatient Setting](#). *Shanghai Archives of Psychiatry* **30**, 93–101 (2018).
210. Baryshnikov, I. *et al.* [Diagnostic conversion from unipolar depression to bipolar disorder, schizophrenia, or schizoaffective disorder: A nationwide prospective 15-year register study on 43 495 inpatients](#). *Bipolar Disord* **22**, 582–592 (2020).

211. Florentin, S., Reuveni, I., Rosca, P., Zwi-Ran, S. R. & Neumark, Y. [Schizophrenia or schizoaffective disorder? A 50-year assessment of diagnostic stability based on a national case registry.](#) *Schizophr Res* **252**, 110–117 (2023).
212. Feighner, J. P. Overview of antidepressants currently used to treat anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* **60 Suppl 22**, 18–22 (1999).
213. Prasad, A. [Successful treatment of obsessive-compulsive disorder with zimelidine, a serotonin re-uptake inhibitor.](#) *Indian J Psychiatry* **25**, 226–228 (1983).
214. Rybakowski, J. K. [Application of Antipsychotic Drugs in Mood Disorders.](#) *Brain Sciences* **13**, 414 (2023).
215. Os, J. van & Kapur, S. [Schizophrenia.](#) *The Lancet* **374**, 635–645 (2009).
216. Hyman, S. E. [The diagnosis of mental disorders: The problem of reification.](#) *Annu Rev Clin Psychol* **6**, 155–179 (2010).
217. Insel, T. et al. [Research Domain Criteria \(RDoC\): Toward a New Classification Framework for Research on Mental Disorders.](#) *AJP* **167**, 748–751 (2010).
218. Keshavan, M. S. et al. [A dimensional approach to the psychosis spectrum between bipolar disorder and schizophrenia: The Schizo-Bipolar Scale.](#) *Schizophrenia Research* **133**, 250–254 (2011).
219. Möller, H. J. et al. [The Munich 15-year follow-up study \(MUFUSSAD\) on first-hospitalized patients with schizophrenic or affective disorders: Assessing courses, types and time stability of diagnostic classification.](#) *European Psychiatry* **26**, 231–243 (2011).
220. Cuthbert, B. N. & Insel, T. R. [Toward the future of psychiatric diagnosis: The seven pillars of RDoC.](#) *BMC Med* **11**, 126 (2013).
221. Kotov, R. et al. [The Hierarchical Taxonomy of Psychopathology \(HiTOP\): A dimensional alternative to traditional nosologies.](#) *Journal of Abnormal Psychology* **126**, 454–477 (2017).
222. Monaghan, C. & Bizumic, B. [Dimensional models of personality disorders: Challenges and opportunities.](#) *Front. Psychiatry* **14**, 1098452 (2023).

223. Morey, L. C. & Hopwood, C. J. Expert Preferences for Categorical, Dimensional, and Mixed/Hybrid Approaches to Personality Disorder Diagnosis. *Journal of Personality Disorders* 1–8 (2019) doi:[10.1521/pedi_2019_33_398](https://doi.org/10.1521/pedi_2019_33_398).
224. Crittenden, K. *et al.* [S37. CROSS-CULTURAL DIFFERENCES IN PANSS ITEM RATINGS: COMPARISONS OF SIX GEO-CULTURAL REGIONS](#). *Schizophrenia Bulletin* **46**, S46–S46 (2020).
225. McEvoy, J. P. *et al.* [Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine, and risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment](#). *Am J Psychiatry* **163**, 600–610 (2006).
226. Hurmuz, M. *et al.* [Quality of Life in Patients with Chronic Psychotic Disorders: A Practical Model for Interventions in Romanian Mental Health Centers](#). *Medicina (Kaunas)* **58**, 615 (2022).
227. Budde, M. *et al.* [A longitudinal approach to biological psychiatric research: The PsyCourse study](#). *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* **180**, 89–102 (2019).
228. Solomon, P. *et al.* Integrative Analysis of miRNA Expression Profiles Reveals Distinct and Common Molecular Mechanisms Underlying Broad Diagnostic Groups of Severe Mental Disorders. (2024) doi:[10.21203/rs.3.rs-4279982/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4279982/v1).
229. Hornik, K., Stinchcombe, M. & White, H. [Multilayer feedforward networks are universal approximators](#). *Neural Networks* **2**, 359–366 (1989).
230. Kim, Y., Santos, R., Gage, F. H. & Marchetto, M. C. [Molecular Mechanisms of Bipolar Disorder: Progress Made and Future Challenges](#). *Front Cell Neurosci* **11**, 30 (2017).
231. Madre, M. *et al.* [Structural abnormality in schizophrenia versus bipolar disorder: A whole brain cortical thickness, surface area, volume and gyrification analyses](#). *Neuroimage Clin* **25**, 102131 (2020).
232. Nelson, J. C. & Davis, J. M. [DST studies in psychotic depression: A meta-analysis](#). *Am J Psychiatry* **154**, 1497–1503 (1997).

233. Pfaffenseller, B. *et al.* [Impaired endoplasmic reticulum stress response in bipolar disorder: Cellular evidence of illness progression.](#) *Int J Neuropsychopharmacol* **17**, 1453–1463 (2014).
234. Schumacher, M. M. & Santambrogio, J. [Cortisol and the Dexamethasone Suppression Test as a Biomarker for Melancholic Depression: A Narrative Review.](#) *J Pers Med* **13**, 837 (2023).
235. Zeng, Z., Wei, L., Zhang, H., Chen, W. & Wang, S. [The Effect of Dexamethasone on Neuroinflammation and Cerebral Edema in Rats With Traumatic Brain Injury Combined With Seawater Drowning.](#) *Cureus* **16**, e55309 (2024).
236. Brown, E. S. & Chandler, P. A. [Mood and Cognitive Changes During Systemic Corticosteroid Therapy.](#) *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* **3**, 17–21 (2001).
237. Okahisa, Y. *et al.* [Leukemia inhibitory factor gene is associated with schizophrenia and working memory function.](#) *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **34**, 172–176 (2010).
238. Koblar, S. A. *et al.* [Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor.](#) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3178–3181 (1998).
239. Bains, J. S. & Oliek, S. H. R. [Glia: They make your memories stick!](#) *Trends Neurosci* **30**, 417–424 (2007).
240. Aberg, K., Saetre, P., Jareborg, N. & Jazin, E. [Human QKI, a potential regulator of mRNA expression of human oligodendrocyte-related genes involved in schizophrenia.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7482–7487 (2006).
241. Schanze, I. *et al.* [NFIB Haploinsufficiency Is Associated with Intellectual Disability and Macrocephaly.](#) *The American Journal of Human Genetics* **103**, 752–768 (2018).
242. Do, C. *et al.* [Mechanisms and Disease Associations of Haplotype-Dependent Allele-Specific DNA Methylation.](#) *The American Journal of Human Genetics* **98**, 934–955 (2016).

243. Voss, D. M., Sloan, A., Spina, R., Ames, H. M. & Bar, E. E. [The Alternative Splicing Factor, MBNL1, Inhibits Glioblastoma Tumor Initiation and Progression by Reducing Hypoxia-Induced Stemness.](#) *Cancer Res* **80**, 4681–4692 (2020).
244. Wegiel, J., Gong, C.-X. & Hwang, Y.-W. [The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases.](#) *FEBS J* **278**, 236–245 (2011).
245. Chen, L. et al. [CELF RNA binding proteins promote axon regeneration in C. Elegans and mammals through alternative splicing of Syntaxins.](#) *eLife* **5**, e16072 (2016).
246. Kotlyarenko, Y. et al. Nfib regulates progenitor competence in maturation of GABAergic neurons. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.03.18.585524> (2024) doi:[10.1101/2024.03.18.585524](https://doi.org/10.1101/2024.03.18.585524).
247. Lee, K.-Y., Chang, H.-C., Seah, C. & Lee, L.-J. [Deprivation of Muscleblind-Like Proteins Causes Deficits in Cortical Neuron Distribution and Morphological Changes in Dendritic Spines and Postsynaptic Densities.](#) *Front. Neuroanat.* **13**, 75 (2019).
248. McGuffin, P. [A Polydiagnostic Application of Operational Criteria in Studies of Psychotic Illness: Development and Reliability of the OPCRIT System.](#) *Arch Gen Psychiatry* **48**, 764 (1991).
249. Alvarez, M.-J. et al. [Prevalence and Clinical Impact of Childhood Trauma in Patients With Severe Mental Disorders.](#) *Journal of Nervous & Mental Disease* **199**, 156–161 (2011).
250. Bailey, T. et al. [Childhood Trauma Is Associated With Severity of Hallucinations and Delusions in Psychotic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis.](#) *Schizophrenia Bulletin* **44**, 1111–1122 (2018).
251. Eagleson, K. L. et al. [Genetic disruption of the autism spectrum disorder risk gene PLAUR induces GABAA receptor subunit changes.](#) *Neuroscience* **168**, 797–810 (2010).
252. Garcia-Monco, J. C., Coleman, J. L. & Benach, J. L. [Soluble urokinase receptor \(uPAR, CD 87\) is present in serum and cerebrospinal fluid in patients with neurologic diseases.](#) *Journal of Neuroimmunology* **129**, 216–223 (2002).

253. Washington, R. A., Becher, B., Balabanov, R., Antel, J. & Dore-Duffy, P. [Expression of the activation marker urokinase plasminogen-activator receptor in cultured human central nervous system microglia.](#) *J Neurosci Res* **45**, 392–399 (1996).
254. Winkler, F., Kastenbauer, S., Koedel, U. & Pfister, H. W. [Role of the urokinase plasminogen activator system in patients with bacterial meningitis.](#) *Neurology* **59**, 1350–1355 (2002).
255. Chaumette, T. *et al.* [Monocyte Signature Associated with Herpes Simplex Virus Reactivation and Neurological Recovery after Brain Injury.](#) *Am J Respir Crit Care Med* **206**, 295–310 (2022).

4. Annexes

4.1 Monocyte Signature Associated with Herpes Simplex Virus Reactivation and Neurological Recovery after Brain Injury

L'article intitulé [Monocyte Signature Associated with Herpes Simplex Virus Reactivation and Neurological Recovery after Brain Injury](#) a été soumis et publié en 2022 à l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine²⁵⁵.

J'ai contribué à ce projet en réalisant des analyses d'expression différentielle et de co-expression d'ARNm et en participant à l'intégration des résultats que j'ai obtenu avec les résultats de mes collègues.

Monocyte Signature Associated with Herpes Simplex Virus Reactivation and Neurological Recovery after Brain Injury

Tanguy Chaumette^{1,2*}, Raphael Cinotti^{1*}, Alice Mollé^{2*}, Pierre Solomon^{2*}, Louise Castain^{2,3}, Cynthia Fourgeux², Hamish E. G. McWilliam^{4,5}, Barbara Misme-Aucouturier¹, Alexis Broquet², Cédric Jacqueline², Mickael Vourc'h^{1,2}, Delphine Fradin⁶, Celine Bossard⁷, Laurent David^{2,8}, Emmanuel Montassier^{2,9}, Cecile Braudeau^{2,10}, Régis Josien^{2,10}, Jose A. Villadangos^{4,5}, Karim Asehounne^{1,2}, Celine Bressollette-Bodin^{2,3‡}, Jeremie Poschmann^{2‡}, and Antoine Roquilly^{1,2‡}

¹Anesthésie Réanimation, CIC 1413, ²Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, F-44000, Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, Nantes, France; ³Nantes Université, CHU Nantes, Service de virologie, Hôtel Dieu, Nantes, France; ⁴Department of Biochemistry and Pharmacology, Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia; ⁵Department of Microbiology and Immunology, The University of Melbourne, The Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, Melbourne, Victoria, Australia; ⁶Nantes Université, INSERM, CRC2INA, Nantes, France; ⁷Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie de Nantes Angers, Service d'anatomie et cytologie pathologique, Nantes, France; ⁸Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, CNRS, UMS BioCore, INSERM UMS 016, CNRS UMS 3556, Nantes, France; ⁹Service des Urgences, Nantes, France and ¹⁰Laboratoire d'Immunologie, CIMNA, CHU Nantes, Nantes Université, Hôtel Dieu, Nantes, F-44000 Nantes, France

ORCID IDs: 0000-0002-9613-5297 (J.P.); 0000-0002-1029-6242 (A.R.).

Abstract

Rationale: Brain injury induces systemic immunosuppression, increasing the risk of viral reactivations and altering neurological recovery.

Objectives: To determine if systemic immune alterations and lung replication of herpesviridae are associated and can help predict outcomes after brain injury.

Methods: We collected peripheral blood mononuclear cells in patients with severe brain injury requiring invasive mechanical ventilation. We systematically searched for respiratory herpes simplex virus (HSV) replications in tracheal aspirates. We also performed chromatin immunoprecipitation sequencing, RNA-sequencing, and *in vitro* functional assays of monocytes and CD4 T cells collected on Day 1 to characterize the immune response to severe acute brain injury. The primary outcome was the Glasgow Outcome Scale Extended at 6 months.

Measurements and Main Results: In 344 patients with severe brain injury, lung HSV reactivations were observed in 39% of the

232 patients seropositive for HSV and independently associated with poor neurological recovery at 6 months (hazard ratio, 1.90; 95% confidence interval, 1.08–3.57). Weighted gene coexpression network analyses of the transcriptomic response of monocytes to brain injury defined a module of 721 genes, including PD-L1 and CD80, enriched for the binding DNA motif of the transcriptional factor Zeb2 and whose ontogenic analyses revealed decreased IFN- γ -mediated and antiviral response signaling pathways. This monocyte signature was preserved in a validation cohort and predicted the neurological outcome at 6 months with good accuracy (area under the curve, 0.786; 95% confidence interval, 0.593–0.978).

Conclusions: A specific monocyte signature is associated with HSV reactivation and predicts poor recovery after brain injury. The alterations of the immune control of herpesviridae replication are understudied and represent a novel therapeutic target.

Keywords: brain injury; herpes simplex virus; monocytes; pneumonia; controlled human infection

(Received in original form October 13, 2021; accepted in final form April 28, 2022)

*These authors contributed equally to this study.

‡These authors jointly directed this study.

Supported by the European Commission Horizon 2020 Research and Innovation Program under grant agreement number 847782 and the Agence National de la Recherche (ANR) PROGRAM project and the CHU Nantes (Appel d'offre interne) (A.R.). J.A.V. is supported by a Principal Research Fellowship (1154502), a program grant (1113293), and a project grant (1163090) from the National Health and Medical Research Council (NHMRC) of Australia. H.E.G.M. is supported by an NHMRC Ideas Grant (2003192). J.P. is supported by Etoiles Montantes region pays de la Loire grant Epicellome.

Am J Respir Crit Care Med Vol 206, Iss 3, pp 295–310, Aug 1, 2022

Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.202110-2324OC on April 29, 2022

Internet address: www.atsjournals.org

At a Glance Commentary

Scientific Knowledge on the

Subject: Brain injury induces systemic immunosuppression, which is associated with bacterial hospital-acquired pneumonia. It remains unknown whether systemic immune alterations and lung replication of Herpesviridae are associated and can help predict outcomes after brain injury.

What This Study Adds to the

Field: In a cohort of 344 mechanically ventilated brain-injured patients, systematic screening by PCR of Herpesviridae replication in tracheal aspirates revealed frequent herpes simplex virus reactivation. Herpes simplex viral lung reactivation was independently associated with hospital-acquired pneumonia, longer time to liberation from mechanical ventilation, and poor neurological outcome at six months. We also define a monocyte transcriptional signature that develops from day one and is characterized by decreased IFN- γ -mediated and antiviral response signaling pathways. This module of 721 genes, including PD-L1 and CD80, regulates CD4 T cell functions and correlates with blood cytokine levels. This gene network was differentially organized in patients with herpes simplex virus reactivation. This monocyte signature predicted the neurological outcome at six months with good accuracy in discovery and validation cohorts. Our study highlights alterations of the immune control of Herpesviridae as a critical, modifiable contributor to the neurological recovery of brain-injured patients.

Each year, more than 80 million individuals worldwide suffer acute brain injury from all causes, such as trauma, stroke, or encephalitis (1). The rate of in-hospital mortality after severe brain injury has steadily decreased in the last decades. Nevertheless, the rate of incomplete recovery remains high, causing the world millions of years of life lived with severe disability (2, 3). Although some brain-targeted interventions have been proven to increase recovery, the interest in preventing secondary systemic aggression of the brain has gained importance (4, 5). Respiratory tract infections are a frequent systemic complication associated with aggravation of brain damage and death (6). Better prevention of respiratory complications is expected to help enhance patient neurological recovery.

We have demonstrated that the susceptibility to pneumonia in patients with brain injury is associated with a state of critical illness-related immunosuppression (7–11). Herpes simplex virus (HSV) persists in a latent state in sensory neurons and can replicate in various tissues, including the central nervous system and the respiratory tract. Herpesviridae reactivations are frequent in patients who are immunocompromised, notably after graft or chemotherapy (12), and are associated with poor outcomes in patients with sepsis-induced immunosuppression (13–15). However, little data on HSV and cytomegalovirus (CMV) reactivations after brain injury are available, and no recommendations are available.

We hypothesized that brain injury-induced immunosuppression exposes patients to HSV reactivations and could alter neurological recovery. We then systematically searched for viral reactivation of HSV and CMV in a prospective cohort of 344 patients hospitalized in ICUs and investigated associations between the immune response to brain injury, viral

reactivation, and outcomes. Some of the results of this study have been previously reported in the form of an abstract (16).

Methods

Study Design and Population

We conducted a monocenter, prospective observational cohort to investigate the rate of HSV and CMV reactivation in patients with brain injury hospitalized in ICUs and investigated the immunological causes. The study protocol was registered in December 2013 at <https://clinicaltrials.gov/> (trial registration: NCT02003196). The Ethics Committee approved the study protocol of Ouest II Angers (France, reference number 2013/20) in November 2013. The Immunity after Brain Injury Study Virus study was conducted according to the Declaration of Helsinki. A patient's legal surrogate provided written consent for participation when possible. Patients who had recovered sufficient capacity to provide consent were asked to consent to continue in the trial up to 6 months after the trauma.

Patients were enrolled from January 2013 to May 2019 in two French surgical ICUs of one university hospital (Nantes). Inclusion criteria were brain injury (Glasgow Coma Scale) below or equal to 12, abnormal brain computed tomography scan, and age between 18 and 75 years. Exclusion criteria were cancer in the previous 5 years, immunosuppressive drugs, and pregnancy. Control samples were collected from 100 matched healthy blood donors recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang). For each analysis, 10 to 25 patients with and without HSV reactivation were randomly selected from the available samples. Then, 10 to 25 healthy control samples were selected on the basis of sample availability and matching (age \pm 10 years, same sex, same race) with the randomly selected patients.

Author Contributions: T.C. performed experiments, contributed to the study design, data analyses, interpretation of results, and revision of the manuscript. R.C. contributed to clinical study design, patient inclusion, data analyses, interpretation of results, and revision of the manuscript. A.M., P.S., L.C., C.F., H.E.G.M., B.M.-A., A.B., C.J., M.V., D.F., C. Bossard, C. Braudeau, and E.M. performed experiments, contributed to interpretation of results, and revision of the manuscript. L.D., R.J., J.A.V., and K.A. contributed to the interpretation of results and manuscript revision. C.B.-B. J.P., and A.R. contributed to the study design, data analyses, interpretation of results, and revision of the manuscript. All authors have approved the final manuscript for publication.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Antoine Roquilly, M.D., Ph.D., Institut de Recherche en Santé 2 Nantes Biotech, Nantes University, 44000 Nantes, France. E-mail: antoine.roquilly@chu-nantes.fr; or Jeremie Poschmann, CR2TI UMR1064, Université de Nantes, Inserm, Nantes, France. E-mail: jeremie.poschmann@univ-nantes.fr.

This article has a related editorial.

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org.

Clinical Variables and Definitions

Glasgow Outcome Scale Extended (GOS-E) at 6 months was scored by an assessor kept blinded to the reactivation status, according to a standardized approach (17). The eight-point scale assesses the autonomy of patients in daily activity. A GOS-E score of 1 indicates death; 2 (vegetative state) indicates the inability to obey commands and speechlessness; 3 (lower end of severe disability) indicates dependence on others for care; 4 (upper end of severe disability) indicates partial independence at home; 5 (lower end of moderate disability) indicates the inability to work; 6 (upper end of moderate disability) indicates reduced work capacity; 7 (lower end of good recovery) indicates an ability to resume previous activities with some injury-related problems, and 8 (upper end of good recovery) indicates the absence of trauma-related problems. As previously described, a poor outcome was defined as a GOS-E between 1 (death) and 4 (severe disability) (18).

Virology Tests

HSV and CMV serostatus was determined using Liaison CMV IgG and HSV1/2 IgG on Liaison XL (DiaSorin S.p. A). HSV and CMV DNA detection and quantification on tracheal aspirates and whole blood were performed using two laboratory-developed multiplex quantitative real-time PCRs that comprise internal control. Differentiation between HSV1 and HSV2 was made using specific fluorescent probes.

RNA Sequencing

RNA was extracted from fluorescence-activated cell sorting sorted cells using the QIAGEN RNEasy plus minikit. For 3' digital gene expression profiling, the RNA sequencing protocol was performed according to our implementation of the protocol from Soumillon and colleagues (Kilens and colleagues, 2018; Soumillon and colleagues, 2014). Briefly, the libraries were prepared from 10 ng of total RNA. The mRNA poly(A) tails were tagged with universal adapters, well-specific barcodes, and unique molecular identifiers during template-switching reverse transcription. Barcoded complementary DNAs from multiple samples were then pooled, amplified, and tagmented using a transposon fragmentation approach which enriches for 3' ends of complementary DNA. A library of 350 to 800 bp was run on a 100-cycle S Prime run on Nova seq6000 at the Genomics

Atlantic platform (Nantes) platform facility (Nantes). An average of 5 million 75 bp single-end reads were obtained for each sample. Samples were demultiplexed and aligned to the hg19 genome using the DGE bioinformatics pipeline (19).

Bioinformatic analysis. Differential expression and acetylation analyses were realized using the DESeq2 package for chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) analysis; the fraction of reads in the peaks variable was taken into account in the design. Low abundance genes and peaks were filtered, leaving 14,378 (CD14) and 10,054 (CD4) genes and 45,024 peaks for subsequent analysis. Differentially acetylated peaks were selected using DESeq2's Wald test (20), adjusted by multiple hypothesis correction (Benjamini-Hochberg Q value ≤ 0.05) and log₂ fold-change of -1 for downregulated peaks and 1 for upregulated peaks, which was chosen on the basis of associated gene ontology results as we have previously described (9, 21, 22). For RNA sequencing, gene ontology analysis was realized using the topGo R package. We filtered the enriched term by their adjusted P value to keep only the five most significant. Odds ratios were computed as (IA/foreground)/(IB/background), with IA the number of genes in the foreground and IB the number of genes in the background related to the gene ontology term. GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool) was used with basal plus extension association rule and a cutoff of 20 observed gene hits to determine gene ontology enrichment in upregulated peaks and transcription factor motifs binding was assessed using Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment. Single-gene enrichment was performed using Fisher's exact test by comparing associated genes in up or downregulated peaks or background set of peaks consisting of consensus peaks on which the differential analysis was performed. Data were plotted using the ggplot2 R package.

WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis). We used the WGCNA R package to generate a gene coexpression signed network using the CD14 samples (23). We chose a soft power of 11 using the function "pickSoftThreshold" to follow an approximate scale-free topology. Modules were defined as branches of a hierarchical cluster tree using the "cutreeHybrid" function of WGCNA (minClusterSize = 150, deepSplit = 4, and cutHeight = 0.9999).

Modules with module eigengenes correlations ($r > 0.85$) were merged. We computed the correlation between the module eigengenes and the sample conditions using a Pearson correlation. In addition, module features of the brown module were ranked according to their value importance in projection (VIP) that measures their weight in the partial least square regression, using the partial least square R package. Module features that have high VIP values were assumed important for predicting the response variable (healthy, HSV⁻, and HSV⁺ conditions).

Statistical Analysis

Data were plotted using GraphPad Prism and unpaired t test and Mann-Whitney unpaired test with two-tailed P values and 95% confidence intervals (CIs). One-way ANOVA with Bonferroni correction (*post hoc* tests) were used for multiple comparisons. The rates of hospital-acquired pneumonia, invasive mechanical ventilation discharge, ICU discharge, and death in a time-to-event analysis were calculated via Kaplan-Meier plots and were analyzed using Cox regression models. A linear regression test investigated correlations. Statistical details of experiments (exact number of mice per group, exact P values, dispersion, and precision measures) can be found in the figure legends. $P < 0.05$ for statistical significance. For details of other METHODS, see the online supplement.

Results

Viral Reactivations Were Associated with Poor Neurological Outcomes

We prospectively included 344 patients with brain injury in a prospective observational cohort with a 6-month follow-up (Table 1). Although no HSV replication was recorded at the time of injury, 91 (39%) out of the 232 patients were seropositive and had respiratory HSV replication within 2 weeks after brain injury, as compared with 2 (1%) patients who were seronegative (Figure 1A), demonstrating that these were reactivations induced by the brain injury, and neither primoinfection nor reactivations concomitant to the brain injury. Susceptibility to viral reactivations was not specific to HSV because CMV replication was observed in 11% of patients seropositive for CMV (Figure 1B).

Table 1. Demographic Characteristics of Patients with Brain Injury with or without Herpes Simplex Virus Reactivation

	Serology HSV-negative	Serology HSV-positive		P value*
		No reactivation	With reactivation	
Number of patients, <i>n</i>	112	141	91	
mean (SD)	40 (18)	45 (17)	54 (15)	0.02
Male, <i>n</i> (%)	92 (82)	103 (72.5)	60 (66.7)	0.02
Pathology, <i>n</i> (%)				0.4
Trauma	85 (75.9)	102 (71.8)	65 (72.2)	—
Subarachnoid hemorrhage	16 (14.3)	21 (14.8)	14 (15.6)	—
Stroke	9 (8)	14 (10)	8 (9)	—
median (25–75th percentile)	6 (3–9)	6 (4–9)	6 (3–8)	0.7
median (25–75th percentile)	42 (35–50)	43 (34–54)	51 (41–62)	0.1
Blood median (25–75th percentile)				
Total leukocytes	16.5 (13.4–20)	14.2 (11.3–18.6)	14.9 (11.2–17.5)	0.4
Lymphocytes	1.5 (0.9–2.4)	1.5 (1–2.5)	1.4 (0.8–2.4)	0.9
Monocytes	1.1 (0.8–1.3)	1 (0.7–1.5)	0.9 (0.6–1.4)	0.3
Neutrophils	13.2 (9.2–17.6)	11.3 (8.3–15.6)	11.3 (7.5–14.5)	0.2
Bacterial hospital-acquired pneumonia				
Yes, <i>n</i> (%)	73 (6)	71 (50)	72 (80)	<0.005
PaO ₂ /F _i O ₂ ratio	157 (108–206)	149 (120–222)	148 (125–199)	0.6
Acute respiratory distress syndrome, <i>n</i> (%)	34 (30)	27 (19)	24 (26.7)	0.1
HSV replication, <i>n</i> (%)	2 (1.8)	0 (0)	91 (100)	<0.005
Lungs	1 (0.9)	0 (0)	86 (95.6)	<0.005
Blood	1 (0.9)	0 (0)	18 (20)	<0.005
Mechanical ventilation median (25–75th percentile) [†]	12 (7–23)	10 (4–19)	18 (11–25)	0.05
ICU length of median (25–75th percentile) [†]	17 (10–31)	13 (7–26)	25 (17–34)	0.04

Definition of abbreviation: HSV = herpes simplex virus.

*For comparison between no reactivation versus with reactivation.

[†]Calculated from a log-rank test with consideration of death as censure.

Asymptomatic HSV replications are frequent in latently infected people (24), and we questioned if HSV replications were associated with respiratory and neurological outcomes in patients with brain injury. As compared with patients without HSV reactivation, patients with HSV reactivation had an increased risk of hospital-acquired pneumonia (relative risk, 1.54; 95% CI, 1.11–2.13) (Figure 1C) and a longer duration of ICU hospitalization (relative risk, 1.57; 95% CI, 1.22–2.03) (Figure 1D). We did not find an association between HSV reactivation and the relative risk of death at day 90 (relative risk, 1.21; 95% CI, 0.72–2.06) (Figure 1E). At 6 months, HSV reactivation was associated with unfavorable neurological outcomes assessed by the GOS-E between 1 and 4 ($P = 0.014$) (Figure 1F). Differences in patient baseline and brain injury characteristics were taken into account by using multivariate analysis to limit the bias resulting from confounding factors in observational cohorts, and the adjusted hazard ratio for poor neurological outcome at 6 months was 1.9 (95% CI,

1.08–3.57; $P = 0.03$) in case of HSV reactivation (Table 2). The demonstration that HSV respiratory reactivations are an independent risk factor for poor neurological recovery after brain injury prompted us to investigate their causes.

Epigenetic Regulation of Monocytes and CD4 T Cells in Patients with Brain Injury

Epigenetic immune modifications are well described after sepsis and can be associated with susceptibility or resistance to infections (25). Thus, we profiled peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 25 healthy donors and 20 patients with brain injury (9 with and 11 without HSV reactivation) using histone H3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) ChIP-seq, an epigenetic histone mark of active enhancers and promoters which is involved in immune regulation during inflammation (Figure 2A) (26). In the CD4-enriched PBMCs, that were composed on average of 85% of CD4⁺ T cells and 15% of CD14⁺ cells (Figure 2B), we first defined a set of peaks common to all samples and quantified peak heights as a function of normalized reads counts in each sample (*see*

online supplement) (9, 21). We selected 618 differentially acetylated peaks (DAPs) that were increased and 596 that were decreased in patients (Figure 2C). Principal component analysis indicated that the disease state was significantly associated with the first and second principal components (Figure 2D; Figure E1A in the online supplement). We noted that HSV⁺ and HSV[−] status was not distinguishable (Figure E1B). To gain a more comprehensive overview of the pathway altered, the DAPs were analyzed for gene ontology enrichment using GREAT (27). The ontology analysis showed that the epigenetic reprogramming of PBMCs is centered at the molecular level on the response to lipopolysaccharide/bacterium and to the regulation of the inflammatory process (Figure 2E).

To identify important putative genes in epigenetic regulation, we assigned peaks to their nearest genes and tested for enrichment of DAPs within each gene (22). The gene coding for Zeb2, a transcriptional inhibitor involved in the terminal maturation of monocytes (28), was the hot spot of the epigenetic regulation with 11 upregulated DAPs (Fisher's exact test

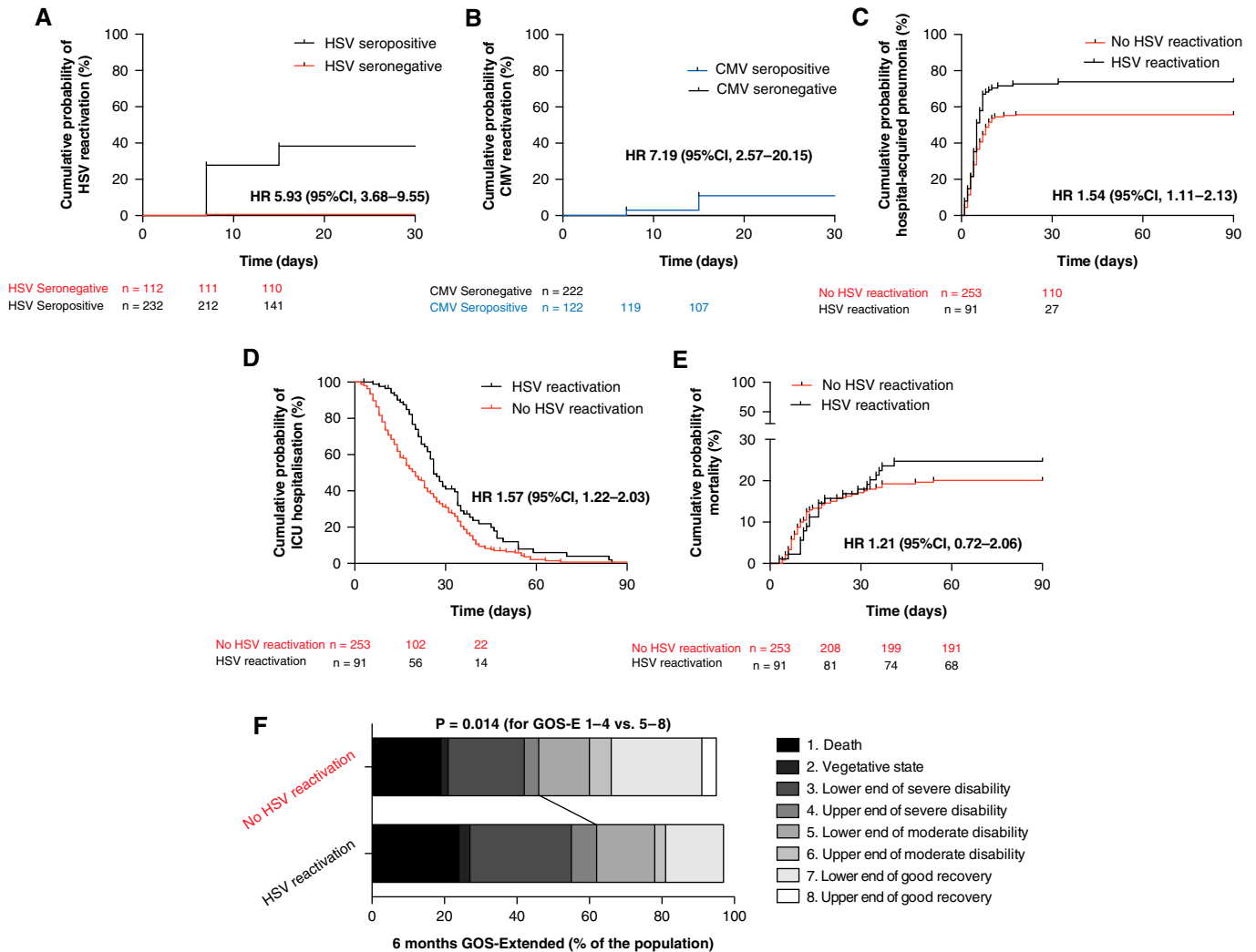


Figure 1. Lung reactivations of herpes simplex virus (HSV) are independently associated with poor neurological recovery in patients with brain injury. (A) Kaplan-Meier estimates of the rates of HSV replication in the lungs of patients with brain injury who are HSV seropositive ($n = 232$ patients) or HSV seronegative ($n = 112$). (B) Kaplan-Meier estimates of the rates of cytomegalovirus (CMV) replication in the lungs of patients with brain injury who are CMV seropositive ($n = 122$) or CMV seronegative ($n = 222$). (C–E) Kaplan-Meier estimates of the rates of (C) hospital-acquired bacterial pneumonia, (D) hospitalization in the ICU, and (E) mortality in patients with ($n = 91$) or without ($n = 253$) HSV reactivation. (F) Distribution of Extended Glasgow Outcome Scale (GOS-E) scores 6 months after brain injury. Each cell corresponds to a score on the scale; the width of each cell represents the proportion of patients. The line between the two groups indicates the midpoint GOS-E ($n = 91$ with HSV reactivation and $n = 253$ without). (A–E) Hazard ratios were calculated with the log-rank (Mantel-Cox) test. (F) Percentages of good outcomes (GOS-E 5 to 8) were compared with a χ^2 test ($P < 0.01$ for reactivation effect). CI = confidence interval; HR = hazard ratio.

P value = $3.23e^{-8}$ (Figure 2F; Figure E1B). We also found the Zeb2 DNA binding motif in 154 upregulated DAPs and 156 downregulated DAPs, indicating that Zeb2 is upregulated and implicated in the epigenetic regulation of numerous genes after brain injury.

Transcriptomic Activity of CD4 T Cells in Patients with Brain Injury

To discriminate more thoroughly the role of CD4 T cells independently from CD14⁺

cells, we selectively sorted CD3⁺ CD4⁺ cells (purity >95%) (Figure 2G). We first studied the methylation of the promoter regions of cytokine genes, a mechanism of epigenetic programming that can change cell fate for years. DNA methylation investigation is a targeted approach, and can study a limited number of genes. We measured the methylation of the promoter regions of IL-2 and IL-4, two cytokines involved in response to HSV and mainly produced by CD4 T cells (29). The methylation of the promoter

regions of these cytokines was not different between patients and control subjects (Figure E2A). We also carried out comparative transcriptomics by RNA sequencing of sorted CD4 T cells issued from 17 patients and 13 healthy donors and confirmed that the disease state was associated with the first principal component (Figure E2B). However, we found only 10 differentially expressed genes (DEGs) between control subjects and patients (Figure 2H) and a slight difference between patients with or without HSV

Table 2. Independent Risk Factors of a Poor Neurological Outcome 6 Months after Brain Injury

	Poor Neurological Recovery (GOS-E 1–4)	Good Neurological Recovery (GOS-E 5–8)	P value	Multivariate HR	P value
Patients, <i>n</i>	226	118			
Age, mean (SD)	48 (18)	43 (17)	0.01	1.01 (1.003–1.03)	0.01
Male, <i>n</i> (%)	176 (78)	79 (67)	0.03	—	—
Pathology, <i>n</i> (%)	—	—	0.8	—	—
Trauma	163 (72)	89 (75)	—	—	—
Subarachnoid hemorrhage	34 (15)	17 (14)	—	—	—
Stroke	23 (10)	8 (7)	—	—	—
Glasgow Coma Scale median (25–75th percentile)	6 (3–8)	7 (5–10)	<0.05	0.9 (0.83–0.97)	0.004
SAPS median (25–75th percentile)	47 (39–57)	40 (32–48)	<0.05	—	—
Anisocoria, <i>n</i> (%)	55 (24)	17 (14)	0.03	1.9 (1.04–3.76)	0.04
Hemoglobin concentration on ICU admission, g/dL, median (25–75th percentile)	11.9 (10.1–14)	11.8 (10–13.3)	0.9	0.9 (0.9–1.006)	0.9
Hypotension on ICU admission, <i>n</i> (%)	167 (74)	87 (74)	0.92	1.04 (0.6–1.8)	0.9
Herpes simplex virus, <i>n</i> (%)					
Serology positive	152 (69)	80 (69)	0.9	—	—
Reactivation (blood or lung)	72 (32)	19 (16)	0.001	1.9 (1.08–3.57)	0.03
Lung reactivation	68 (30)	19 (16)	0.005	—	—
Blood reactivation	16 (7)	3 (3)	0.08	—	—
Cytomegalovirus, <i>n</i> (%)					
Seropositive	77 (37)	45 (39)	0.7	—	—
Reactivation (blood or lung)	13 (6)	2 (1.7)	0.08	—	—
Lung reactivation	9 (4)	2 (1.7)	0.3	—	—
Blood reactivation	5 (2.22)	1 (0.85)	0.4	—	—
Virus reactivation (herpes simplex virus OR cytomegalovirus), <i>n</i> (%)	77 (34)	21 (18)	0.002	—	—

Definition of abbreviations: GOS-E = Glasgow Outcome Scale Extended; HR = hazard ratio; SAPS = simplified acute physiology score. A GOS-E score of 1 indicates death; 2 indicates vegetative state (the inability to obey commands and speechlessness); 3 indicates lower severe disability (the dependency on others for care); 4 indicates upper severe disability (partial independence at home); 5 indicates lower moderate disability (the inability to work); 6 indicates upper moderate disability (reduced work capacity); 7 indicates lower good recovery (an ability to resume previous activities with some injury-related problems); and 8 indicates upper good recovery (the absence of a trauma-related problem). Boldface are for statistically significant values in multivariate analysis.

reactivation (Figures E2C–E). This series of experiments suggest that the epigenetic response to brain injury is more associated with CD14⁺ monocytes rather than CD4⁺ T cells.

Transcriptomic Activity of Monocytes in Patients with Brain Injury

To investigate the role of monocytes in the susceptibility to HSV reactivation and neurological outcome, we carried out comparative transcriptomics by RNA sequencing of sorted CD14⁺ cells collected 1 day after brain injury in 10 patients with and 9 without subsequent HSV reactivation and in 13 healthy donors (Figure 3A). Principal component analysis of the 14,378 expressed genes illustrates that the disease state was significantly associated with the first principal components (Figure 3B). This analysis indicates that the major source of transcriptional variation in this cohort was associated with the disease state, whereas age and sex were not associated with PC1 or PC2

(Figure E3). We identified 594 differentially expressed genes among control subjects and patients with brain injury (Figure 3C). We confirmed four of the top DEGs at the protein level (Figure 3D and Table E1 for the list of DEGs). This signature was likely specific to patients who had brain injury because the expressions of PD-L1 and CD80 were not altered on monocytes of patients hospitalized for severe coronavirus disease (COVID-19) pneumonia (Figure 3E). The gene ontology analysis (Figure 3F) and functional tests (Figure 3G) revealed that the activity of monocytes from patients was decreased for IFN- γ -mediated signaling and defense against HSV, suggesting a role for monocytes in the susceptibility to HSV of patients with brain injury.

Association of the Monocyte Signature with CD4 T-Cell Functions

Top DEGs included PD-L1 and CD80, genes critical for antigen presentation to T cells. We thus questioned the impact of the

monocyte signature on the functions of T cells. We observed that CD4 T cells can normally divide (Figures 4A and 4B and E4A for CD4 T-cell proliferation in mixed PBMCs) but were polarized toward an antiinflammatory Th2 phenotype (i.e. GATA3⁺ IL4⁺ IFN- γ ^{low}) (Figures 4C and E4B–E for CD4 T-cell subsets). The capacity of proliferation and the production of IFN- γ by CD8 T cells remained unchanged in patients (Figure E4A). Direct CD4 T cells/CD14⁺ cell contacts were frequent in the spleen of patients with brain injury (Figure 4D), and we found a correlation between the monocyte signature and CD4 T-cell functional polarization (Figure 4E). This series of results suggest that the monocyte signature induces profound alteration of the T-cell compartment. This hypothesis was confirmed by the demonstration that the production of IFN- γ and IL-4 by CD4 T cells was normalized after CD4 T-cell isolation, as well as the selective depletion of CD14⁺ cells (Figure 4F). The

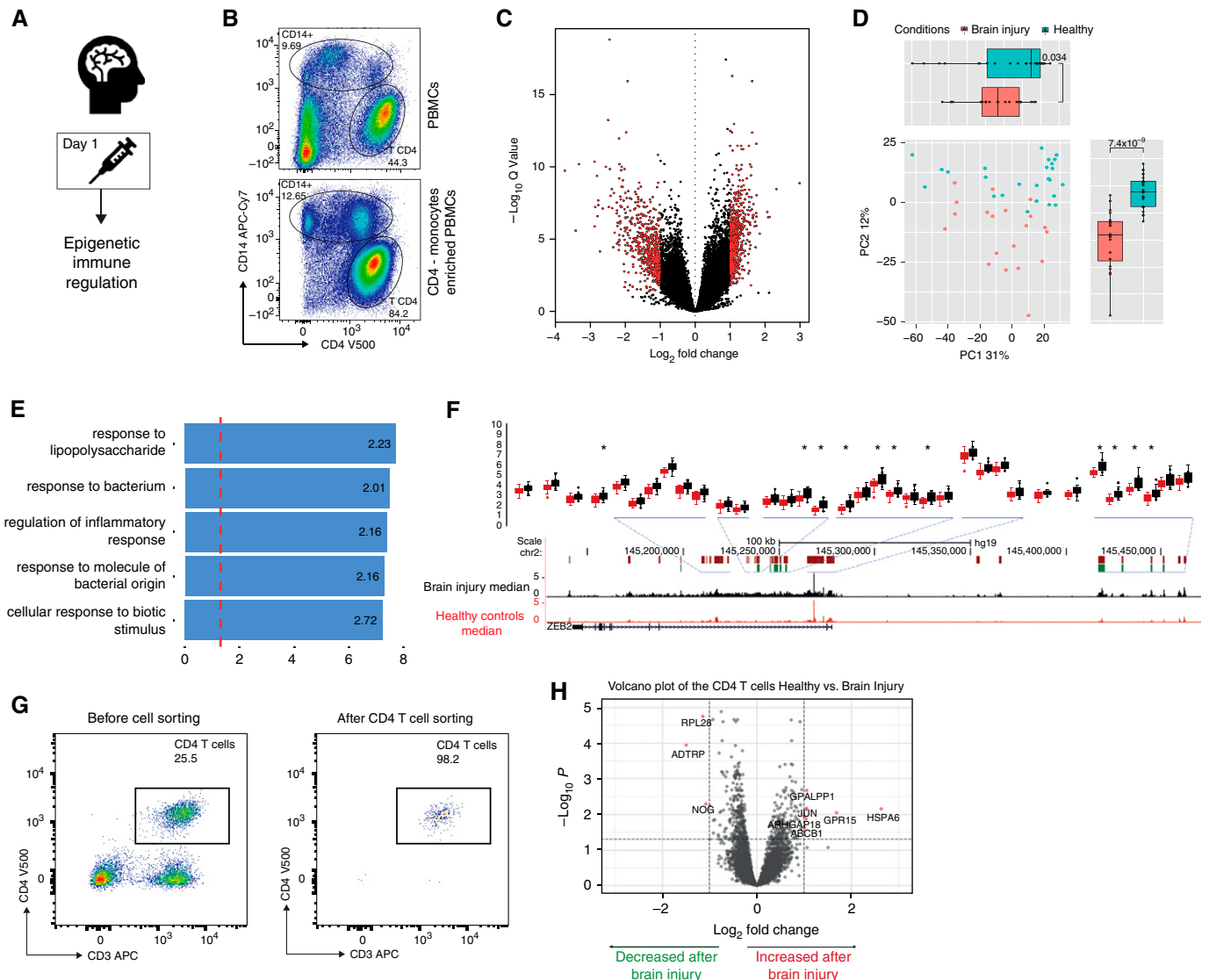


Figure 2. Epigenetic regulation of CD4-enriched peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after brain injury. (A) Study timeline. (B) Composition of CD4-enriched PBMCs used for panels (C–F) (representative of more than 10 experiments). (C) Volcano plot of genes with differential H3K27ac peak heights in CD4-enriched PBMCs between patients with brain injury ($n = 20$) and healthy controls ($n = 25$ independent samples). (D) Principal component analysis of H3K27ac peaks in CD4-enriched PBMCs in healthy controls (pink, $n = 25$) and patients with brain injury (blue, $n = 20$). Analysis was performed on 45,025 histone peak heights across all individuals. The significance of difference between each group was estimated for PC1 and PC2 with the Mann-Whitney U test. (E) Enriched gene ontology categories using GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool) in significantly ($|\log_2FC| > 1$; false discovery rate < 0.05 down and upregulated peaks) comparing CD4-enriched PBMCs from 25 patients with brain injury and 20 healthy individuals. (F) Genome browser of median H3K27 acetylation of the gene locus corresponding to *Zeb2* in patients with brain injury (black) and healthy control subjects (red) in CD4-enriched PBMCs. Boxplots representing all peak heights for each individual are added for each peak. (G) Composition of CD4 T cells after cell sorting (representative of more than 10 experiments). (H) Volcano plot of differential gene expression in transcriptomic analyses of CD4 T cells in healthy control subjects ($n = 13$) and patients with brain injury ($n = 17$). $*P < 0.05$. APC = allophycocyanin; DGE = differential gene expression; GO = gene ontology; PC = principal component.

intensity of the CD4 T cells reprogramming was higher in patients without HSV reactivation (Figure 4G). We concluded that the CD4⁺ T cells GATA3⁺IL-4⁺ polarization is not intrinsic to lymphocytes but continuously maintained by reprogrammed monocytes and is associated with a low risk of HSV reactivation.

Different Organization of the Transcriptomic Activity of Monocytes in Patients with or without HSV Reactivation

We then investigated the association between the monocyte transcriptomic activity and HSV reactivation (Figure 5A), but we found no difference in the degree of expressions of

the genes involved in response to brain injury among patients with or without HSV reactivation (Figure 5B). We thus investigated the organization of the genes involved in response to brain injury and exploited WGCNA to identify modules of coexpressed genes within this dataset (23). WGCNA is a powerful method for

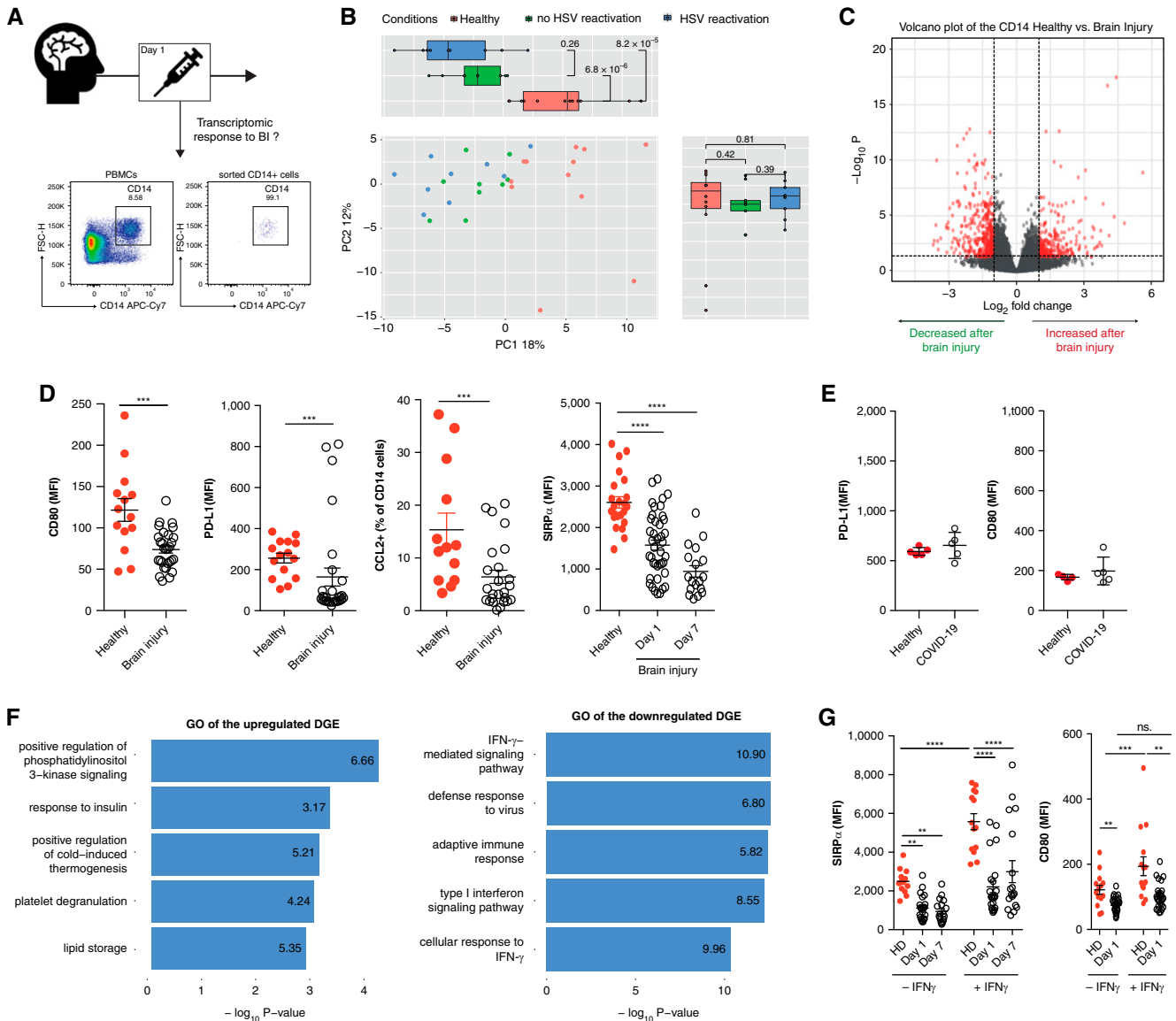


Figure 3. Monocyte response to brain injury (BI) is characterized by a decreased response to IFN- γ and defense to herpes simplex virus (HSV). (A) Study timeline and purity of CD14⁺ monocytes used for panels B and C (Representative of more than 10 experiments). (B) Principal component analysis plot of the CD14 samples from 12 healthy donors, 9 patients with HSV reactivation, and 9 without that show the characteristics of the samples according to their gene expressions. The significance of difference between each group was estimated for PC1 and PC2 with the Mann-Whitney *U* test. (C) Volcano plot of differential gene expression in transcriptome analyses of CD14 cells in healthy control subjects (*n* = 12) and patients with BI (*n* = 18). (D) CD80, PD-L1, CCL2, and SIRP α expressions by monocytes in healthy control subjects (*n* = 13) and patients at the indicated time after BI (*n* = 25). (E) PD-L1 and CD80 expression on monocytes of five healthy patients and five patients hospitalized for coronavirus disease (COVID-19) pneumonia. (F) Barplot represents the top five most significant terms of the gene ontology analysis of the up- and downregulated genes in CD14 after brain injury. The length of the bar is proportional to the negative log₁₀ *P* value. The numbers inside the bars represent the odds ratio of the terms. (G) CD80 and SIRP α expression on monocytes after overnight *in vitro* treatment with human recombinant IFN- γ (1 μ g/ml) (*n* = 12 healthy, *n* = 15–20 on Day 1 and Day 7). Data are representative of three independent sections and shown as mean (SEM). One-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparison test for post hoc test. ***P* \leq 0.01, ****P* \leq 0.001, and *****P* \leq 0.0001. APC = allophycocyanin; DGE = differential gene expression; GO = gene ontology; MFI = mean fluorescence intensity; ns = not significant; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PC = principal component.

organizing and interpreting wide-ranging transcriptional alterations in immune diseases (30, 31). Using this approach, we identified 15 gene coexpression modules associated with distinct gene ontology categories (Figure E5A and Table E2). Only

the brown module was significantly associated with HSV reactivation (Figures 5C and E5B). When investigating gene expression of the brown module, we found that the eigengene values of the brown module were lower in HSV⁻ and HSV⁺

than in healthy controls (Figure 5D). These results showed that the gene expression of the brown module (Figure 5C) and the intramodule coexpression changes (Figure 5D) are associated with the risk of HSV reactivation in patients with brain injury.

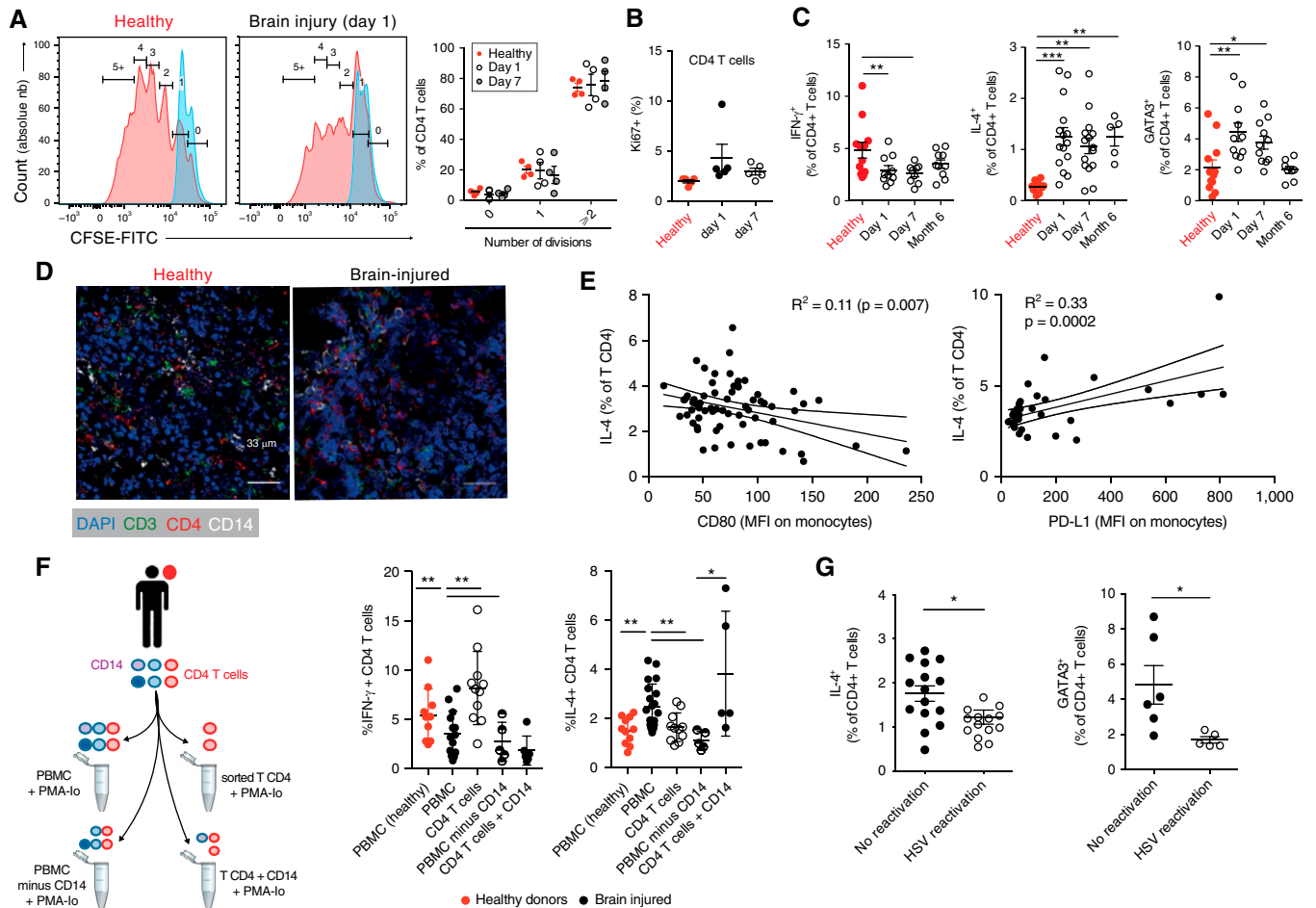


Figure 4. Pathophysiological role of the monocyte signature after brain injury. (A) CD4 T cells were obtained from Day 1 and Day 7 after brain injury or in matched healthy control subjects. Sorted T cells were stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), then cultured for 5 days after stimulation with anti-CD2, anti-CD3, and anti-CD28 microbeads. Left panels, representative histograms of CFSE-FITC + T cells (blue without stimulation, red with stimulation). Right panel, the proliferation of T cells is shown as a percentage of the cells with zero, one, or two or more divisions ($n = 4$ patients by group). Data represent two pooled independent experiments. (B) The percentage of Ki67 CD4 T cells was assessed by flow cytometry ($n = 4$ healthy control subjects and $n = 5$ patients with brain injury). Data represent two pooled independent experiments. (C) Percentages of IFN- γ ⁺, GATA3⁺, and IL-4⁺ CD4 T cells in healthy control subjects ($n = 15$) and at Day 1 ($n = 15$), Day 7 ($n = 11$), and 6 months ($n = 7$) after brain injury. IL production was assessed after 5 hours of Phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin (Io) *in vitro* stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Data represent three pooled independent experiments. (D) Immunohistochemical analyses of spleen from control (patients with abdominal trauma without associated brain injury, left image) and patients with brain injury (patients who are brain dead, right image). Blue, DAPI staining (nucleus); green, CD3 (T-cells zone); red, CD4; white, CD14 (monocytes). Scale bar, 33 μ m ($n = 3$ control subjects and $n = 3$ patients). Data are representative of three independent sections per patient. (E) Correlation between PD-L1 and CD80 monocyte expression with the percentage of IL-4 CD4 T cells after PMA-Io *in vitro* stimulation ($n = 25$). The correlation was tested by Pearson's test. (F) PBMCs with or without CD14⁺ cells and sorted CD4 T cells with or without CD14⁺ cells were stimulated *in vitro* with PMA-Io. The production of IFN- γ and IL-4 by CD4 T cells was measured by cytometry after intracellular staining ($n = 11$ healthy control subjects and $n = 5$ –10 patients per condition). Data are shown as mean (SEM) and represent three pooled independent experiments. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (G) Percentages of IL4⁺ and GATA3⁺ CD4 T cells in patients with brain injury with or without herpes simplex virus (HSV) reactivation ($n = 15$ /group for IL-4 and $n = 6$ /group for GATA3). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and *** $P \leq 0.001$. FITC = fluorescein isothiocyanate; MFI = mean fluorescence intensity.

We chose to investigate the brown module further and found that it was associated with IFN signaling, response to virus, and antigen presentation (Figures 5E and E5C). We also observed a positive correlation between epigenetic regulation markers (from Figure 2) and gene expression ($R = 0.23$; P value $< 2.2e^{-16}$)

(Figure 5F), confirming that the monocyte transcriptomic signature was regulated at an epigenetic level. Because we had identified Zeb2, a transcription factor involved in gene repression (32), to be the most regulated transcriptional factor in response to brain injury (Figure 2), we hypothesized that the Zeb2 might regulate the genes in the brown

module. To test this, we investigated whether the Zeb2 DNA binding motif was enriched in H3K27ac promoter peaks in any of the 15 modules, and we found that the brown module was one of the two modules significantly enriched for the Zeb2 binding motif (odds ratio = 1.18; P value = 0.02) (Table E2). Further inspection of the target

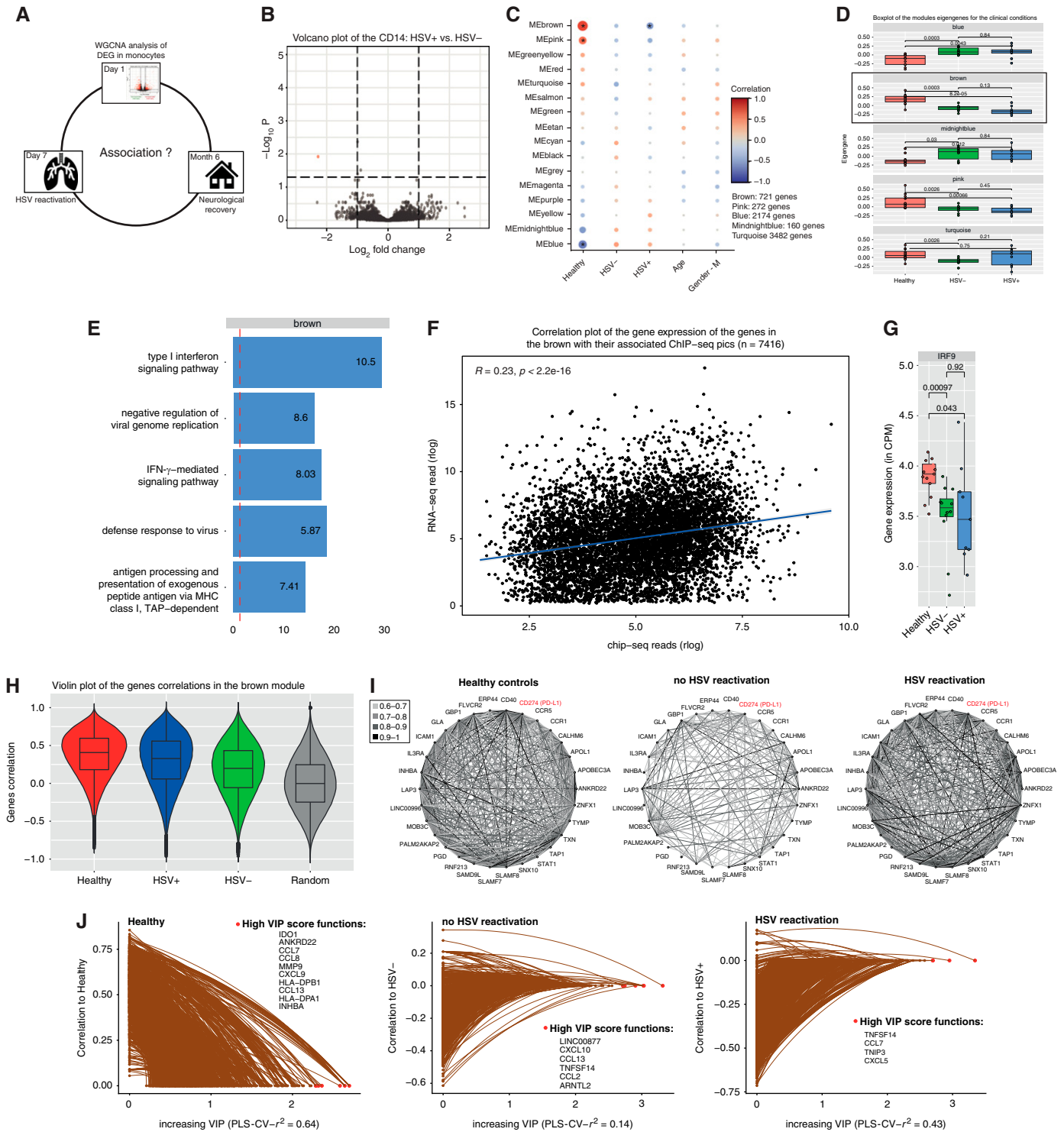


Figure 5. Coordinated monocyte response modules are associated with herpes simplex virus (HSV) reactivation. (A) Study timeline. (B) Volcano plot of differential gene expression in transcriptome analyses of CD14 cells in patients with brain injury with ($n = 10$) or without ($n = 9$) HSV reactivation. (C) Heatmap of the relation (Pearson correlation) between the module eigengenes and the different sample conditions ($n = 10$ healthy, 10 HSV⁺, and 9 HSV⁻). Red color represents a positive correlation between the modules and the samples of the condition. Blue color represents a negative correlation. The numbers inside the cases represent the value of the correlation and the associated P values. (D) Boxplot represents each condition's eigengene values for the modules that are statistically correlated with at least one of the conditions. P values calculated by Wilcoxon rank-sum tests. (E) Barplot representing the top five most significant terms of the gene ontology analysis of the downregulated genes in the brown module. The length of the bar is proportional to the negative \log_{10} P value. The numbers inside the bars

genes of Zeb2 in the brown module revealed IRF9, a transcription factor that controls the IFN gene response and antiviral immunity (33, 34). IRF9 was downregulated in the HSV⁻ and HSV⁺ patients at the transcriptional level (Figure 5G), supporting the role of Zeb2 in the induction of the monocyte signature in response to brain injury.

We thus questioned whether disease status affected the coexpression (as defined by Pearson correlation coefficient R) within the genes of the brown module in the monocytes. Although the coexpression of 721 randomly selected genes from each condition was absent (random, median = 0), the coexpression of the brown module genes was high in control subjects and HSV⁺ (median R = 0.4 and 0.32, respectively) and strongly reduced in patients with HSV⁻ (median R = 0.2) (Figure 5H), which suggested that genes within the brown module are correlated with each other, but to a lesser extent in patients with HSV⁻. Pairwise correlations between genes in the brown modules were significantly higher in healthy control subjects and HSV positive than in patients with HSV negative (Figure 5I). Using partial least squares regression to represent the brown module features according to their VIP, we found major differences in important gene nodes between control subjects, HSV⁻, and HSV⁺ (Figure 5J). Our analysis showed that the brown module, which contains genes implicated in response to viral infection and the IFN- γ pathway, was downregulated in response to brain injury. Most importantly, this gene network was differentially organized in patients who have or have not developed HSV reactivation.

External Validation of the Monocyte Signature Association with HSV Reactivation

We then tested the robustness of the brown module in a validation cohort of patients with brain injury followed in ICU for HSV

reactivation. We sorted monocytes from blood samples collected either on Day 1 ($n = 23$) or Day 7 ($n = 31$) after brain injury (Figure 6A), and we used two distinct and complementary summary statistics to test the module preservation (35). First is the composite module preservation statistic median rank, whose value decreases in preserved module (Figure 6B). Second, the Z-summary summarizes the individual Z statistic values that result from permutation tests and whose value increases with preservation (Figure 6C). In both statistics, the brown module was the most preserved module among the 15 defined in the discovery cohort.

Moreover, we observed a significant correlation between the degree of expression of the DEGs common to the discovery and validation cohorts ($R = 0.91$) (Figure 6D). We also found that the organization of the genes of the “IFN-gamma-mediated signaling pathway” correlated with the brown module eigengene in the two cohorts (Figure 6E) and that these genes similarly correlated within each cohort (Figure 6F). These results indicate that the regulation of the IFN- γ pathway is similar in the two cohorts. When investigating the association of this gene module with the risk of HSV reactivation in the validation cohort, we confirmed that the most important gene nodes were different between control subjects, HSV⁻, and HSV⁺ (Figure 6G). We also found that the eigengene value was lower in HSV⁻ than in HSV⁺ on Day 7 (Figure 6H) and that the expression of PD-L1 on monocytes was higher on Day 7 in patients with HSV⁺ than HSV⁻ (Figure 6I). All the results obtained in this validation cohort thus demonstrated the robustness of the brown module association with the risk of HSV reactivation in patients with brain injury.

Organization of the Transcriptomic Activity of CD4 T Cells in Patients with or without HSV Reactivation

Given the power of the WGCNA approach in discovering a monocyte signature

associated with HSV reactivation, we decided to reproduce this pipeline of analysis in CD4 T cells. We thus reanalyzed the transcriptomic data described in Figure 2H but could define only one module gathering all the genes (not shown). When we limited the WGCNA to the samples collected in patients, we could define six gene modules, but none of them was associated with HSV reactivation (Figure E6). These results reinforced our hypothesis that the epigenetic regulation of PBMCs after brain injury is not centered at the level of CD4 T cells but rather at the monocyte compartment.

Monocyte Signature is Associated with HSV Reactivation and Neurological Outcome

To confirm the pathophysiological relevance of this signature, we demonstrated that the monocyte signature was correlated with the duration of ICU hospitalization (Figure 7A), the rating on the GOS-E at 6 months (Figure 7B), and can predict the neurological outcome with good accuracy (area under the curve, 0.786; 95% CI, 0.593–0.978) (Figure 7C). Finally, we correlated the monocyte signature with routine clinical parameters and a panel of 34 plasma cytokines to translate the complex immune signatures into clinical use. Remarkably, neurological recovery (GOS-E score) and several cytokines (indicated by an arrow) highly correlated with the brown module (Figure 7D), thereby translating these immunological findings into promising candidates for outcome prediction.

Discussion

In this large prospective cohort of patients with severe brain injury, we first observed that lung HSV reactivations were frequent and associated with in-hospital complications and long-term neurological outcomes. After excluding a role for intrinsic modifications of conventional

Figure 5. (Continued). represent the odds ratio of the terms. (F) Correlation plot between the genes expressed in the CD14 samples (rlog) and the associated ChIP-seq peaks within 1 kb of the TSS for all expressed genes associated with a WGCNA module (number of associations = 7,746). The blue lines represent the linear regression. Pearson correlation was used. (G) Boxplot representing the reads (in CPM) of the gene *IRF9* in the different conditions. (H) Violin plot representing the Pearson correlation of the genes in the brown module for each condition, and randomly chosen genes were used as control (“random”). (I) Pairwise Spearman’s rank correlation coefficient between genes in the brown module in healthy, HSV⁻, and HSV⁺ conditions. The width of the line indicates the strength of correlation. (J) Hive plot representing the features network of the brown module, with x-axis depicting nodes ranked by their value importance in projection (VIP) scores, and y-axis depicting Pearson correlation to healthy, HSV⁻, and HSV⁺ conditions, respectively. ChIP-seq = chromatin immunoprecipitation sequencing; CPM = count per million; DEG = differentially expressed genes; ME = module expression; MHC = major histocompatibility complex; PLS-CV = partial least square-cross validation; TAP = transporter associated with antigen processing; TSS = transcriptional start site; WGCNA = weighted gene co-expression network analysis.

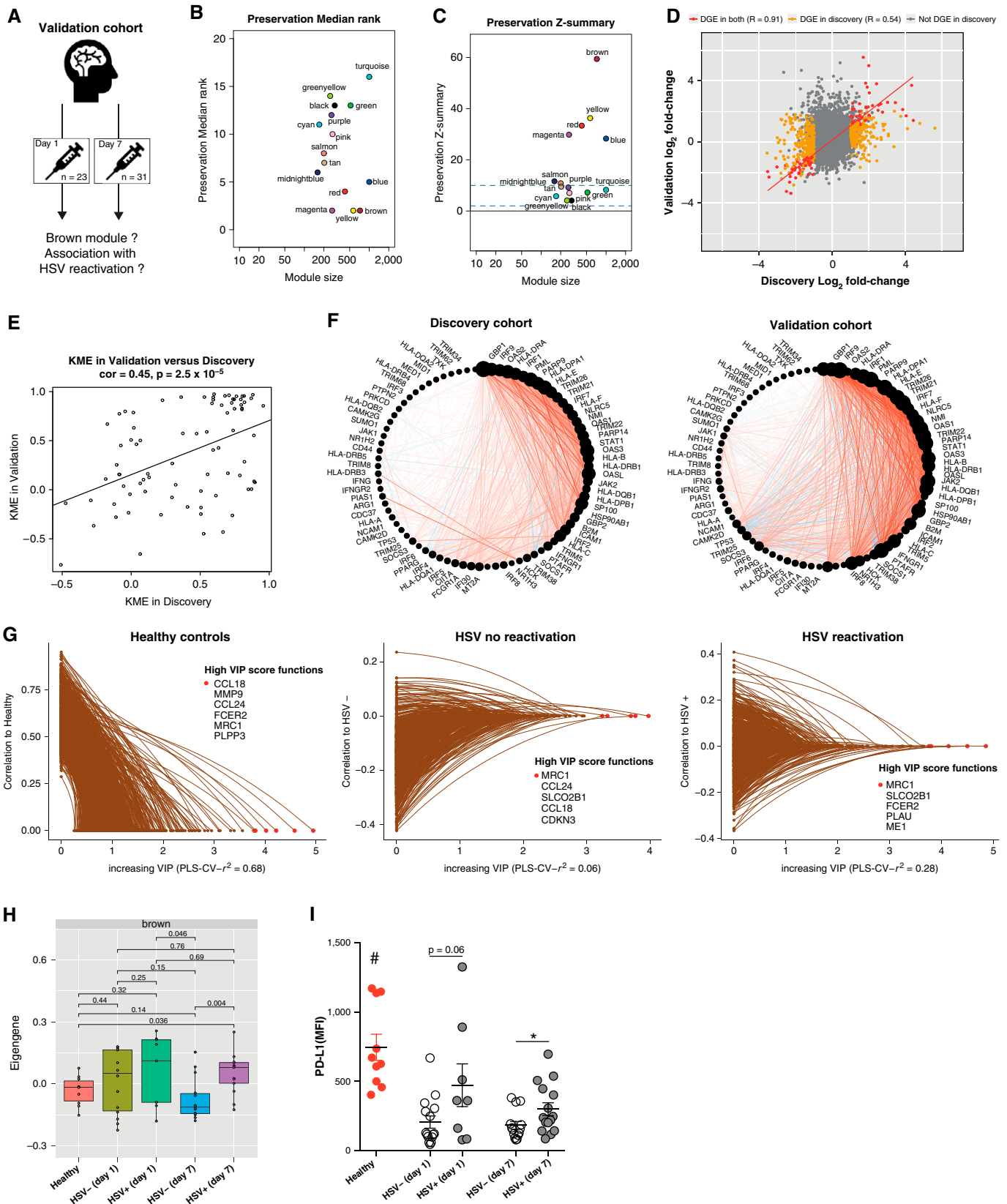


Figure 6. Conservation of the brown module in an independent cohort of patients with brain injury. (A) Validation cohort timeline. (B and C) Preservation median rank and (C) preservation Z-summary of the 15 gene modules in samples collected on Day 1 ($n = 10$ healthy, 13 HSV⁺, and 10 HSV⁻). Preserved modules are characterized by low median rank and high Z-summary. (D) Correlation of differential gene expressions

CD4 T cells, we employed deep characterization and mechanistic investigations to identify a signature of monocytes characterized by a gene module enriched for Zeb2 DNA motif binding in the peripheral blood of patients with brain injury, which is observed before lung HSV reactivation and associated with long-term outcomes. More than the degree of gene expression, we found that the organization of this gene network was the primary determinant of HSV reactivation.

We observed 91 cases of HSV reactivation out of 232 (39%) patients who were seropositive (26% of the total population), which is consistent with preceding demonstrations of herpesviridae reactivations in patients who are septic (13, 36, 37). In these prior studies, herpesviridae reactivations were associated with respiratory complications and the risk of in-hospital death. Currently, we made the novel finding that lung HSV reactivations are associated with long-term neurological sequelae in patients with brain injury. We also observed that reactivations were more frequent for HSV than CMV, which could explain why specific antiviral prophylactic treatment of CMV reactivation has failed to improve outcomes in patients who are critically ill (14). Our demonstration that brain injury induces broad alterations of the virome composition suggests that interventions aiming to prevent pathogenic viral reactivations in patients who are critically ill should have a broad viral spectrum, including HSV. In this setting, immune interventions would be an asset compared with drugs targeting a specific virus.

Immune monitoring of patients with brain injury can help predict viral reactivation and select patients who would benefit from a preventive approach (38). Although brain injury provokes changes in

the systemic lymphocyte composition, conventional CD4 T cells and natural killer cells were proposed in animal models of stroke as the most relevant population affected (39, 40). Using PBMCs and lymphoid organs from a large human cohort of patients hospitalized with severe brain injury, we failed to demonstrate intrinsic alterations or apoptosis/necrosis of the lymphocyte lineages. Instead, we demonstrated that the alterations of the cytokine production by CD4 T cells depend on monocyte response to brain injury. These results complete our previous observation that the low production of IFN- γ by natural killer cells in patients with brain injury was driven by a decreased production of IL-12 by mononuclear phagocytes and not by intrinsic alterations of innate-like lymphocytes (11). We could not discern whether altered monocytes are, per se, responsible for the loss of control of viral replication rather than a consequence of higher severity of brain injury, and more studies are required to address this question by investigating the modulation of our identified signature during HSV reactivation in patients responding or not to antiviral treatments. Similarly, we did not observe the monocyte signature in patients with COVID-19, but reproducing the analysis of monocytes in patients who were noncomatose critically ill is needed to address the specificity of our brain injury monocyte signature. Our splenic analyses (*see* Figure 4D) were performed in samples collected after brainstem death, and we thus cannot discriminate the role of brain injury from the brain-death process and its massive adrenergic surge in the reported observations.

We observed profound modifications of the transcriptional activity of monocytes associated with alterations of epigenetic regulation, which suggest that our observations are reminiscent of the phenomenon of trained innate immunity. Indeed, the two pillars of this memory of

innate immunity are epigenetic and metabolic reprogramming of mononuclear cells, mainly reported in humans after infections or vaccination (41). Our results showed that this phenomenon could develop after brain injury and link the quality of this reprogramming on Day 1 with the resistance to subsequent lung replication of a neurotropic virus. This could prove significant in a period in which COVID-19 pneumonia is a world matter of concern, and therapeutic interventions such as β -glucan could be proposed to modulate the epigenetic reprogramming of monocytes (25).

We and others have demonstrated that monocytes from patients who are critically ill are epigenetically reprogrammed toward tolerance (9) or trained immunity (42). ZEB2 is a zinc-finger E homeobox-binding transcription factor recently found to be expressed by myeloid and lymphoid cell lineages. In monocyte and macrophage cells, ZEB2 regulates critical transcriptional networks involved in cell differentiation, maintenance, and tissue-specific identities (28, 43). Our study completes this information by demonstrating a role for ZEB2 in the monocyte functional adaptation to acute brain injury.

The organization of the brown gene module, which includes PDL1 and CD80, was associated with an early risk of HSV reactivation, whereas low degrees of gene expression correlated with favorable and long-term neurological recovery. This observation questioned the relationship between HSV reactivation, immune reprogramming, and neurological recovery. We propose that the reduced expression of the brown module genes is a physiological immune adaptation promoting neurological recovery, possibly by limiting brain inflammation via resistance to IFN- γ . The persistence of normal organization of this gene network, characterized by intergene solid

Figure 6. (*Continued*). (DGEs) common to both the discovery and the validation cohorts. DGEs found in both cohorts (red), DGEs found only in the discovery cohort (yellow), and DGEs not found in the discovery cohort (grey). (E) Scatter plot of KME in the discovery and the validation cohorts of the 81 genes associated to the gene ontology "IFN-gamma-mediated signaling pathway" ($R=0.45$; $P=2.5 \times 10^{-5}$). (F) Circle plots representing the pairwise Spearman's rank correlation coefficient of genes of the brown module in the discovery and the validation cohorts. The width of the line indicates the strength of correlation. Positive correlations are represented in red. (G) Hive plot representing the features network of the brown module, with x-axis depicting nodes ranked by their value importance in projection (VIP) scores, and y-axis depicting Pearson correlation to healthy, HSV⁻, and HSV⁺ conditions, respectively. (H) Boxplot represents each condition's eigengene values for the brown module that are statistically associated with HSV reactivation. P values calculated by Wilcoxon rank-sum tests. (I) PD-L1 expressions by monocytes in healthy control subjects ($n=10$) and patients with or without HSV reactivation at the indicated time after brain injury ($n=54$). One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. # $P<0.01$ versus all others and * $P<0.05$. HSV = herpes simplex virus; KME = module eigengene-based connectivity.

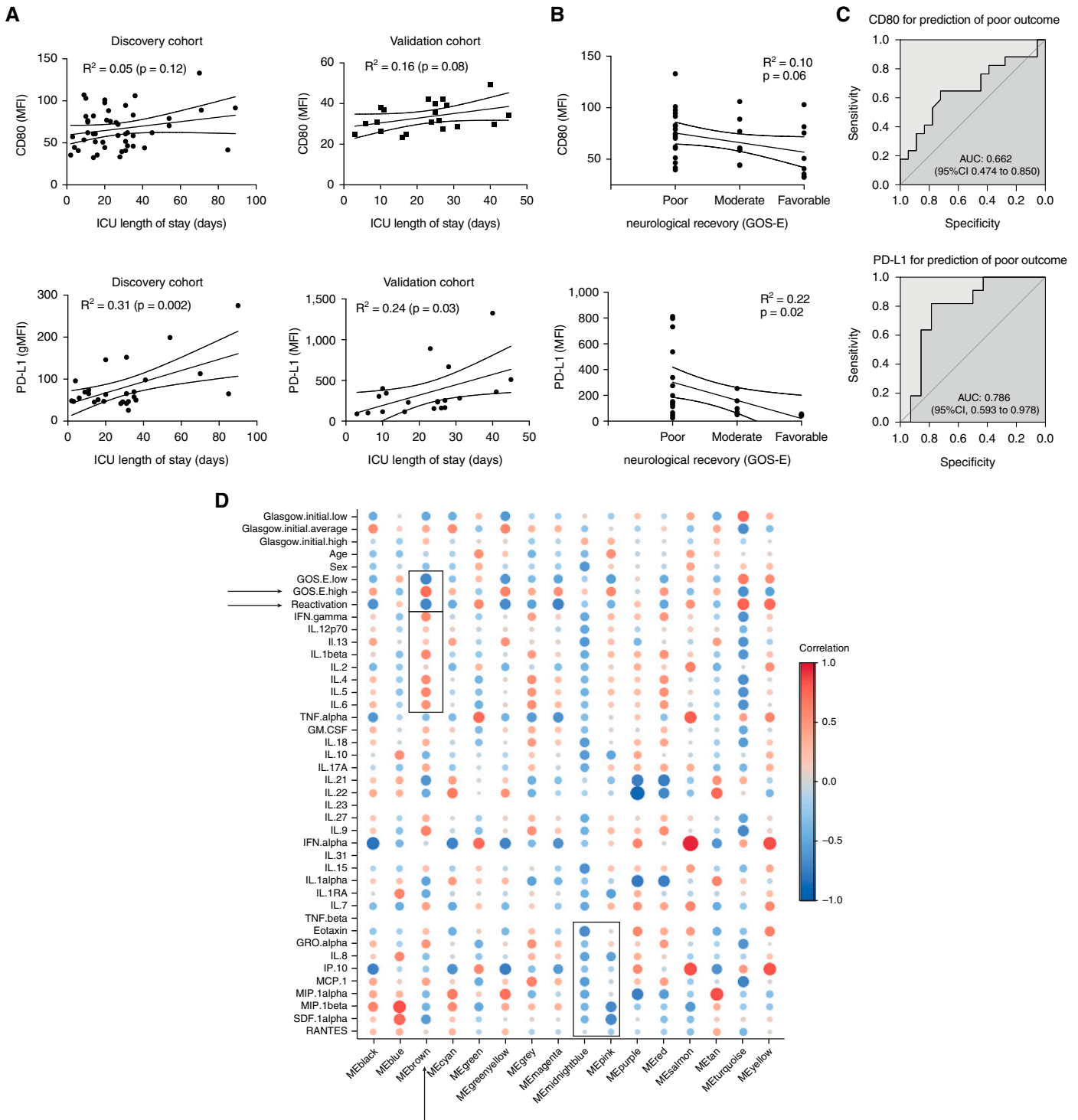


Figure 7. Brain injury-specific monocyte signature is associated with long-term neurological outcomes. (A) Association of PD-L1 and CD80 expressions on monocytes at Day 1 with ICU length of stay in the discovery ($n = 30$ for CD80 and 35 for PD-L1) and the validation cohorts ($n = 19$). Correlations were tested by Pearson’s test. (B) Association of PD-L1 and CD80 expressions on monocytes at Day 1 with neurological recovery (GOS-E [Glasgow Outcome Scale Extended] score at 6 months) in the discovery cohort. GOS-E 1–4: poor; GOS-E 5–6: moderate; GOS-E 7–8: favorable. Correlations were tested by Pearson’s test. (C) Receiver-operating characteristic curves for various cutoff amounts of CD80 and PD-L1 expression in differentiating between poor (GOS-E 1–4) and good (GOS-E 5–8) neurological recovery ($n = 30$ for CD80 and 35 for PD-L1, including all patients with available data for CD80 and PDL1 monocyte expression). (D) Correlogram of gene modules in monocytes from Day 1 only with effect size with initial severity (Glasgow initial), neurological recovery (GOS-E), and plasma cytokine ($n = 10$ HSV⁺ and 9 HSV⁻, including all patients with available data for gene module expression and plasma cytokine). Black arrows highlight highly correlating parameters. AUC = area under the curve; CI = confidence interval; HSV = herpes simplex virus; ME = module expression; MFI = mean fluorescence intensity.

correlations, thus deprives patients of a necessary adaptation of the systemic immune system to brain injury and increases the risk of HSV reactivation.

Regarding the impact of viral reactivation on outcomes, HSV is known to lyse cells and induce tissue damage in case of replication. It was thus not surprising to find an association between lung HSV reactivation and acute respiratory distress syndrome in this cohort. Of interest, we associated HSV replication with the organization of the monocyte reprogramming observed after brain injury. This suggested that HSV replication can be a marker of nonoptimal physiological systemic immune response to brain injury. However, our findings support an association, not necessarily causation, between HSV reactivation and unfavorable neurological outcomes. The efficiency of antiviral treatment to enhance neurological outcomes thus remained to be investigated in patients with severe brain injury.

Respiratory complications have been associated with in-hospital complications (44), but viral respiratory reactivation is not yet recognized as a significant determinant of neurological recovery in patients who are comatose. In patients with brain injury, we associated an early specific monocyte signature with the risk of lung reactivation of a neurotropic virus and disability at 6 months. Gene module containing PDL1 and CD80 possibly offers an easily accessible biomarker to define optimal systemic immune adaptation to brain injury and predict favorable outcome after brain injury. Our results also suggest that HSV respiratory reactivation should be systematically screened in patients with severe brain injury to define nonoptimal systemic immune adaptation and help for neuroprognosis. Because preventive antiviral approaches failed to improve patient outcomes when administrated in unselected patients who are critically ill (45), we believe that the precise

characterization of monocyte reprogramming provides new insights into acute response to brain injury and immune surveillance and will help to pave the way toward precision treatment of HSV reactivation. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

Acknowledgment: The authors thank the Biological Resource Centre for Biobanking (CHU Nantes, Hôtel Dieu, Centre de Ressources Biologiques [CRB] [BRIF: BB-0033-00040]), the Cytometry Facility "Cytocell", University of Nantes, the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell), and the Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique (CIMNA). The authors are most grateful to the Genomics Core Facility GenoA, a member of Biogenouest and France Genomique, and to the Bioinformatics Core Facility BiRD, a member of Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) for the use of their resources and their technical support.

References

- Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung Y-C, Panchak M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2018;130:1–18.
- GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 2019;18:56–87. [Published erratum appears in *Lancet Neurol* 2021;20:e7.]
- Steyerberg EW, Wieggers E, Sewalt C, Buki A, Citerio G, De Keyser V, et al.; CENTER-TBI Participants and Investigators. Case-mix, care pathways, and outcomes in patients with traumatic brain injury in CENTER-TBI: a European prospective, multicentre, longitudinal, cohort study. *Lancet Neurol* 2019;18:923–934.
- Asehounne K, Mrozek S, Perrigault PF, Seguin P, Dahyot-Fizelier C, Lasocki S, et al.; BI-VILI study group. A multi-faceted strategy to reduce ventilation-associated mortality in brain-injured patients. The BI-VILI project: a nationwide quality improvement project. *Intensive Care Med* 2017;43:957–970.
- Pelosi P, Rocco PR. The lung and the brain: a dangerous cross-talk. *Crit Care* 2011;15:168.
- Esnault P, Nguyen C, Bordes J, D'Aranda E, Montcriol A, Contargyris C, et al. Early-onset ventilator-associated pneumonia in patients with severe traumatic brain injury: incidence, risk factors, and consequences in cerebral oxygenation and outcome. *Neurocrit Care* 2017;27:187–198.
- Roquilly A, Torres A, Villadangos JA, Netea MG, Dickson R, Becher B, et al. Pathophysiological role of respiratory dysbiosis in hospital-acquired pneumonia. *Lancet Respir Med* 2019;7:710–720.
- Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, Tian Z, Cinotti R, Rimbart M, et al. Local modulation of antigen-presenting cell development after resolution of pneumonia induces long-term susceptibility to secondary infections. *Immunity* 2017;47:135–147.e5.
- Roquilly A, Jacqueline C, Davieau M, Mollé A, Sadek A, Fourgeux C, et al. Alveolar macrophages are epigenetically altered after inflammation, leading to long-term lung immunoparalysis. *Nat Immunol* 2020;21:636–648.
- Roquilly A, Braudeau C, Cinotti R, Dumonte E, Motreul R, Josien R, et al. Impaired blood dendritic cell numbers and functions after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *PLoS One* 2013;8:e71639.
- Roquilly A, David G, Cinotti R, Vourc'h M, Morin H, Rozec B, et al. Role of IL-12 in overcoming the low responsiveness of NK cells to missing self after traumatic brain injury. *Clin Immunol* 2017;177:87–94.
- Kano Y, Hiraharas K, Sakuma K, Shiohara T. Several herpesviruses can reactivate in a severe drug-induced multiorgan reaction in the same sequential order as in graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* 2006;155:301–306.
- Bruynseels P, Jorens PG, Demey HE, Goossens H, Pattyn SR, Elseviers MM, et al. Herpes simplex virus in the respiratory tract of critical care patients: a prospective study. *Lancet* 2003;362:1536–1541.
- Limaye AP, Stapleton RD, Peng L, Gunn SR, Kimball LE, Hyzy R, et al. Effect of ganciclovir on IL-6 levels among cytomegalovirus-seropositive adults with critical illness: a randomized clinical trial. *JAMA* 2017;318:731–740.
- Papazian L, Hraiech S, Lehingue S, Roch A, Chiche L, Wiramus S, et al. Cytomegalovirus reactivation in ICU patients. *Intensive Care Med* 2016;42:28–37.
- Herpesvirus simple reactivation in brain-injured patients (oral presentation, Journées Nationales d'Infectiologie, 2019, Nantes, France).
- Wilson JT, Pettigrew LE, Teasdale GM. Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the extended Glasgow Outcome Scale: guidelines for their use. *J Neurotrauma* 1998;15:573–585.
- Cooper DJ, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D'Urso P, et al.; DECRA Trial Investigators; Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *N Engl J Med* 2011;364:1493–1502.
- Charpentier E, Cornec M, Dumont S, Meistermann D, Bordron P, David L, et al. 3' RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling. 2021;doi:10.21203/rs.3.pex-1336/v1.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
- del Rosario RC-H, Poschmann J, Rouam SL, Png E, Khor CC, Hibberd ML, et al. Sensitive detection of chromatin-altering

- polymorphisms reveals autoimmune disease mechanisms. *Nat Methods* 2015;12:458–464.
22. Sun W, Poschmann J, Cruz-Herrera Del Rosario R, Parikshak NN, Hajan HS, Kumar V, *et al*. Histone acetylome-wide association study of autism spectrum disorder. *Cell* 2016;167:1385–1397.e11.
 23. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 2008;9:559.
 24. Langenberg AG, Corey L, Ashley RL, Leong WP, Straus SE; Chiron HSV Vaccine Study Group. A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2. *N Engl J Med* 1999;341:1432–1438.
 25. DiNardo AR, Netea MG, Musher DM. Postinfectious epigenetic immune modifications - a double-edged sword. *N Engl J Med* 2021;384:261–270.
 26. Phan AT, Goldrath AW, Glass CK. Metabolic and epigenetic coordination of T cell and macrophage immunity. *Immunity* 2017;46:714–729.
 27. McLean CY, Bristol D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, *et al*. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* 2010;28:495–501.
 28. Scott CL, T'Jonck W, Martens L, Todorov H, Sichien D, Soen B, *et al*. The transcription factor ZEB2 is required to maintain the tissue-specific identities of macrophages. *Immunity* 2018;49:312–325.e5.
 29. Osorio Y, Ghiasi H. Comparison of adjuvant efficacy of herpes simplex virus type 1 recombinant viruses expressing TH1 and TH2 cytokine genes. *J Virol* 2003;77:5774–5783.
 30. Chang Y-S, Turturice B, Schott C, Finn P, Perkins D. Immune network dysregulation precedes clinical diagnosis of asthma. *Sci Rep* 2020;10:12784.
 31. Voigt EA, Grill DE, Zimmermann MT, Simon WL, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, *et al*. Transcriptomic signatures of cellular and humoral immune responses in older adults after seasonal influenza vaccination identified by data-driven clustering. *Sci Rep* 2018;8:739.
 32. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, *et al*. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6566–6578.
 33. Platanitis E, Demiroz D, Schneller A, Fischer K, Capelle C, Hartl M, *et al*. A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nat Commun* 2019;10:2921.
 34. Paul A, Tang TH, Ng SK. Interferon regulatory factor 9 structure and regulation. *Front Immunol* 2018;9:1831.
 35. Langfelder P, Luo R, Oldham MC, Horvath S. Is my network module preserved and reproducible? *PLOS Comput Biol* 2011;7:e1001057.
 36. Luyt C-E, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton M-H, Nieszkowska A, Trouillet J-L, *et al*. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:935–942.
 37. Jaber S, Chanques G, Borry J, Souche B, Verdier R, Perrigault P-F, *et al*. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: associated factors and consequences. *Chest* 2005;127:233–241.
 38. Shah FA, Meyer NJ, Angus DC, Awdish R, Azoulay É, Calfee CS, *et al*. A research agenda for precision medicine in sepsis and acute respiratory distress syndrome: an official American Thoracic Society research statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;204:891–901.
 39. Liu Q, Jin W-N, Liu Y, Shi K, Sun H, Zhang F, *et al*. Brain ischemia suppresses immunity in the periphery and brain via different neurogenic innervations. *Immunity* 2017;46:474–487.
 40. Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, *et al*. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 2003;198:725–736.
 41. Divangahi M, Aaby P, Khader SA, Barreiro LB, Bekkering S, Chavakis T, *et al*. Trained immunity, tolerance, priming, and differentiation: distinct immunological processes. *Nat Immunol* 2021;22:2–6.
 42. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, *et al*. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2020;20:375–388.
 43. Scott CL, Omilusik KD. ZEBs: novel players in immune cell development and function. *Trends Immunol* 2019;40:431–446.
 44. Kitsios GD, Yang H, Yang L, Qin S, Fitch A, Wang X-H, *et al*. Respiratory tract dysbiosis is associated with worse outcomes in mechanically ventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;202:1666–1677.
 45. Limaye AP, Stapleton RD, Peng L, Gunn SR, Kimball LE, Hyzy R, *et al*. Effect of ganciclovir on IL-6 levels among cytomegalovirus-seropositive adults with critical illness: a randomized clinical trial. *JAMA* 2017;318:731–740.

Titre : Identification de profils omiques liés à la sévérité des maladies psychiatriques du spectre affectif à psychotiques

Mots clés : Trouble psychiatriques, Signature de gène, Classification non-supervisée, Transcriptome, Protéome, Épigénome

Résumé : Les troubles psychiatriques (TP), tels que la schizophrénie, et les troubles bipolaires, affectent environ 12,5% de la population mondiale en 2019. Ces troubles sont définis par une perturbation de la cognition, de l'humeur, et du comportement d'un individu. Aujourd'hui, la psychiatrie est la seule branche de la médecine moderne pour laquelle aucun biomarqueur (BM) n'a été validé pour aider à réaliser le diagnostic. Pourtant, de nombreuses études montrent qu'il existe un lien entre le système immunitaire (SI) et les TP. Il devrait donc être possible d'identifier des BM des TP dans le sang. Lors de cette thèse, j'ai utilisé des méthodes omiques pour investiguer le SI d'individus atteints de TP après les avoir regroupés par la similarité de leurs troubles ou selon la sévérité de leurs symptômes. J'ai identifié des signatures altérées de miRNA spécifiques ou

communes à des groupes élargis de TP, incluant des miARN déjà associés aux TP ainsi que d'autres qui ne l'étaient pas déjà. J'ai également étudié le SI de patients atteints de TP après les avoir classés de façon non supervisée en 2 groupes, selon la sévérité de leurs symptômes, à l'aide des données phénotypiques collectées durant l'étude longitudinale PsyCourse (IPPG, Germany). Si les analyses du méthylome et du miRNA n'ont pas permis d'identifier de différences entre les 2 groupes de sévérité, l'analyse du protéome a permis d'identifier des signatures spécifiques avec notamment une up-régulation de PLAUR, un gène connu pour être associé à la disruption de la barrière hémato-encéphalique et aux capacités cognitive des individus. Dans l'ensemble, cette thèse apporte un éclairage sur les signatures moléculaires liées à la sévérité des TB.

Titre : Identification of omics profiles linked to the severity of psychiatric illnesses from the affective to psychotic spectrum

Keywords : Psychiatric disorders, Gene signature, Unsupervised classification, Transcriptome, Proteome, Epigenome

Abstract : Psychiatric disorders (PD), such as schizophrenia, and bipolar disorder, affect approximately 12.5% of the global population in 2019. These disorders are defined by a disturbance in cognition, mood, and behaviour or an individual. Today, psychiatry is the only branch of modern medicine for which no biomarker (BM) has been validated to help make the diagnosis. However, many studies show that there is a link between the immune system (IS) and PD. It should therefore be possible to identify BMs of PDs in the blood. In this thesis, I used omics methods to investigate the IS of individuals with PD after grouping them by the similarity of their disorders or by the severity of their symptoms. I identified altered miRNA signature specific or common to broad

groups of PD, including miRNAs already associated with BD as well as others that were not already associated with BD. I also studied the proteome, methylome and miRNAome of PD patients after unsupervised classification into 2 groups, according to the severity of their symptoms, using phenotypic data collected during the longitudinal PsyCourse study (IPPG, Germany). While methylome and miRNA analyses did not identify differences between the 2 severity groups, proteome analysis identified specific signatures, including an up-regulation of PLAUR, a gene known to be associated with blood-brain barrier disruption and cognitive abilities. Overall, this thesis sheds light on the molecular signatures related to BD severity