



UNIVERSITÉ EVRY VAL D'ESSONNE

**Ecole Doctorale « Structure et Dynamique des Systèmes Vivants »
Option Sciences de la vie et de la santé
I-STEM – Equipe Neuroplasticité et Thérapeutiques
Thèse financée par l'institut de Recherche Servier**

NNT : 2015SACLE012

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 9 décembre 2015

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université d'Evry Val d'Essonne

Hélène DARVILLE

**Utilisation des cellules souches pluripotentes
pour la recherche et la validation de composés
thérapeutiques pour les formes génétiques
d'autisme liées à SHANK3**

Composition du jury

Président : Mme Brigitte ONTENIENTE, PhD, HDR, Phenocell, UEVE-SDSV

Rapporteur : M. Pierre GRESSENS, PhD, HDR, DR2, Inserm UMR 1141

Rapporteur : Mme Christel DEPIENNE, PhD, MCU-PH Hopitaux universitaires de Strasbourg

Examineur : M. Guillaume PINNA, PhD, CEA Saclay

Co-directeur de thèse : M. Marc PESCHANSKI, MD, PhD, HDR, Inserm UMR 861, ISTEM

Co-directeur de thèse : Mme Alexandra BENCHOUA, PhD, CECS, ISTEM, AFM



Remerciements

Tout d'abord je remercie les laboratoires Servier pour avoir cru en moi et financé ma thèse pendant ces trois années. Un remerciement particulier pour le docteur Marc Millan qui m'a suivi et encouragé. Merci également à toutes les personnes de chez Servier que j'ai rencontré, pour leur gentillesse et leurs précieux conseils. Enfin un remerciement spécial à Jean-Pierre Iliou pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche, et convaincue et permise de faire cette thèse.

Je remercie le docteur Marc Peschanski pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire, et de m'avoir permise d'accéder à un environnement scientifique de qualité, pour mener à bien ce projet de thèse. Je remercie également ma directrice, le docteur Alexandra Benchoua, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de son équipe et pour ce beau projet de thèse qui m'a passionné durant ces trois années.

Je souhaite également remercier le professeur Richard Delorme, le professeur Thomas Bourgeron, ainsi que les personnes de Pasteur que j'ai rencontré, pour leur connaissance qu'ils ont généreusement partagée, ainsi que pour leur encouragement et leur optimisme envers le projet.

Un grand remerciement aux membres du jury et aux membres du comité de thèse pour avoir consacré un peu de leur temps précieux pour l'évaluation de mon travail ; pour leurs remarques constructives et leurs conseils bienveillants qui m'ont permis d'avancer et de finir ce projet dans de bonnes conditions.

Un très grand merci à l'ensemble des filles de l'équipe Neuroplasticité (passées et présentes), avec qui j'ai partagé de si bons moments, qu'ils soient professionnels ou amicaux. Merci pour votre gentillesse, vos sourires et votre soutien dans les moments difficiles ! Avec un remerciement particulier à ma relectrice en chef pour son super travail ☺

Une petite pensée particulière à mes ami(e)s thésards encore présent(e)s, à qui, je leur souhaite encore un peu de courage... Notre petit groupe soudé et nos pauses au soleil vont énormément me manquer ! Je n'oublierai pas tous nos bons moments sportifs et divertissants, et la façon dont vous m'avez écoutée, soutenue et remonté le moral de si nombreuses fois...

Enfin, un grand merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à I-Stem, pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Ces trois années ne se seraient pas passées aussi bien sans vous.

Pour finir, infiniment merci à ma famille et à mes amis, d'avoir toujours été là pour moi et de m'aimer telle que je suis. Pour tous ces moments inoubliables, de partage et de complicité, qui me permettent de me surpasser et donner le meilleur de moi-même.

Merci du fond du cœur...

« Nos doutes sont des traîtres, et nous privent de ce que nous pourrions souvent gagner de bon, parce que nous avons peur d'essayer »

Shakespeare.

« Ne marche jamais sur le chemin tracé, car il ne te mène que là où d'autres sont allés »

Alexander Graham Bell.

Sommaire

Remerciements	2
Index des illustrations.....	7
Index des tableaux	9
Abréviations	10
Résumé	12
Abstract	13
Introduction	14
I. Les troubles du spectre autistique (TSA)	15
1. Classification et diagnostic.....	15
2. Epidémiologie des TSA.....	16
a. Prévalence	16
b. Ratio	17
3. Outils diagnostiques	18
4. Hétérogénéité clinique.....	19
5. Traitements pour les TSA.....	21
a. Thérapies Psycho-comportementales	21
b. Pharmacothérapie	21
6. Etiologie des TSA	28
a. Influence environnementale	28
b. Influence génétique	29
7. Le rôle de la synapse dans les TSA	31
a. Définition de la synapse excitatrice	32
b. La densité postsynaptique	34
c. Croissance synaptique/cellulaire anormale : mutations dans la voie mTOR/PI3K.....	35
d. La dysfonction synaptique et/ou le déséquilibre de la balance E/I	37
8. Modèles de souris pour les TSA.....	40
9. Nouvelles stratégies pour les TSA	41
a. Limites des études sur l'autisme	41
b. Criblage à haut débit pour la découverte de médicaments	42
II. Les cellules souches pluripotentes	47
1. Définition.....	47
2. Les cellules souches embryonnaires.....	48
a. Historique et contexte.....	48

b.	Limites des hESC	49
3.	Les cellules souches induites à la pluripotence	50
a.	Origine/Découverte	50
b.	Méthode de reprogrammation	51
c.	Limites des iPSC	51
d.	Intérêts en recherche des cellules souches pluripotentes humaines	53
e.	Différenciation des hPSC : exemple de la différenciation neurale	54
4.	Les cellules souches pluripotentes pour l'autisme	57
a.	Modélisation pathologique de l'autisme	57
b.	Criblage moléculaire thérapeutique	61
III.	Les protéines SHANK	63
1.	Implications de SHANK dans les maladies neurologiques	63
a.	SHANK3 et le syndrome de Phelan McDermid	63
b.	SHANK et les formes monogéniques d'autisme	67
c.	SHANK et les désordres bipolaires	71
d.	SHANK et la schizophrénie	71
e.	SHANK et la maladie d'Alzheimer	73
f.	Les cas de duplication de SHANK	74
2.	La famille SHANK	75
a.	Profil d'expression	76
b.	Diversité moléculaire	76
c.	Localisation subcellulaire des protéines SHANK3	77
3.	Partenaires et rôles des protéines SHANK	78
a.	Rôle de plateforme	78
b.	Formation/maturation et maintien des synapses	79
c.	Lien avec le cytosquelette d'actine	80
d.	Lien avec la transcription et la traduction	80
e.	Lien avec les récepteurs glutamatergiques et l'activité neuronale	81
f.	Autres partenaires	82
4.	Régulation de SHANK	83
5.	Modèles pour l'étude des formes d'autisme liées à SHANK3	85
a.	Modèles de souris SHANK3	85
b.	Modèles iPSC	89
Objectifs	90
Résultats	92
I.	Création des modèles cellulaires	93
1.	Protocole de différenciation	94
2.	Différenciation de lignées neuronales à partir d'iPSC saines et atteintes	95

II.	Identification et validation de composés thérapeutiques pour l'autisme.....	110
1.	Mise au point du test de criblage.....	110
2.	Criblage par HTS et validation des composés par HCS.....	113
3.	Etude mécanistique (Cdk5).....	138
III.	Recherche d'un phénotype pathologique.....	140
	Discussion.....	142
I.	Les cellules souches pluripotentes comme modèle cellulaire.....	143
1.	Criblage moléculaire thérapeutique.....	143
2.	Modélisation pathologique.....	145
II.	Les composés issus du criblage.....	149
1.	Le lithium comme potentiel traitement.....	149
2.	Le VPA comme potentiel traitement.....	154
III.	Les différentes voies possibles de régulation de SHANK3.....	155
1.	Cdk5 une possible voie de régulation de SHANK3.....	155
a.	Pertinence de Cdk5 pour la régulation de SHANK3.....	155
b.	Lien des composés issus du criblage avec l'inhibition de Cdk5.....	156
2.	5-Lipoxygénase une possible voie de régulation de SHANK3.....	157
IV.	Conclusions.....	158
	Bibliographie.....	160
	Annexes.....	186

Index des illustrations

Figure 1 : Critères spécifiques et éléments associés à considérer dans la caractérisation des TSA, d'après le DSM-V	20
Figure 2 : Vue d'ensemble des régions cytogénétiques d'intérêts associées à l'autisme	30
Figure 3 : Localisation et architecture moléculaire d'une synapse excitatrice et de sa PSD	33
Figure 4 : Classification des différents récepteurs au glutamate	34
Figure 5 : Voie de signalisation neuronale de la régulation traductionnelle	36
Figure 6 : Le processus du HTS pour la découverte d'un médicament.....	42
Figure 7 : Aperçu d'une plateforme de criblage haut débit robotisée et d'une plaque 384 puits...	43
Figure 8 : Les différents protocoles de RT-qPCR pour le HTS selon le type cellulaire et la méthode de purification d'ARN et de rétrotranscription	44
Figure 9 : Les différents types de cellules souches et leur capacité de différenciation.....	48
Figure 10 : Représentation des différents protocoles de différenciation <i>in vitro</i> pour l'obtention de sous types spécifiques neuronaux à partir d'hpSC.....	54
Figure 11 : Les principales méthodes d'induction neurale à partir d'hpSC.....	55
Figure 12 : Comparaison du processus de découverte d'un médicament entre la méthode conventionnelle ciblée-centrée et celle à partir d'iPSC de patients	61
Figure 13 : Utilisation des iPSC pour la découverte de médicaments personnalisés.....	62
Figure 14 : Lien entre les gènes <i>SHANK</i> et les maladies neurologiques.....	63
Figure 15 : Les différents variants sur les gènes <i>SHANK</i> retrouvés chez les patients atteints d'autisme	69
Figure 16 : Localisation des protéines codées par les gènes de susceptibilité de la SCZ	72
Figure 17 : Vue d'ensemble de la structure des protéines SHANK et de ses différents domaines.75	
Figure 18 : Diversité moléculaire de SHANK3	77
Figure 19 : Localisation des protéines SHANK dans les synapses.....	78
Figure 20 : Représentation schématique des domaines de SHANK3 et de leurs principales interactions protéiques à la PSD.....	79
Figure 21 : Position des îlots CpG sur les gènes <i>SHANK</i>	84
Figure 22 : Stratégies pour les essais cliniques pour l'autisme	90
Figure 23 : Protocole de différenciation utilisé	93
Figure 24 : Morphologie et marqueurs spécifiques.....	94
Figure 26 : Localisation des mutations <i>de novo</i> sur le gène <i>SHANK3</i> pour les 3 patients atteints d'autisme	95
Figure 25 : Morphologie et marqueurs des neurones glutamatergiques corticaux.....	95
Figure 27 : Caractérisation des lignées d'iPSC saines (1869, 4603) et autistes (ASD1, ASD2) et de leurs dérivés neuronaux.....	97
Figure 28 : Caractérisation des lignées d'iPSC saine (PB12) et autiste (ASD03) et de leurs dérivés neuronaux	97
Figure 29 : Sensibilité de la méthode qPCR Taqman en multiplex	112

Figure 30 : Mise au point du test de ciblage.....	113
Figure 31 : Les hits découverts du HTS	114
Figure 32 : Effet des composés sur l'augmentation de la protéine SHANK3 et le nombre de synapses incluant SHANK3 dans des neurones SA001 par immunocytochimie et HCS	115
Figure 33 : Effet des composés sur l'activité neuritique glutamatergique par technique de flux calcique en HCS dans des neurones SA001 exprimant ou non des ShRNA dirigés contre <i>SHANK3</i>	116
Figure 34 : Heat map de l'effet du lithium et du VPA sur l'expression de 150 gènes impliqués dans la plasticité synaptique et la neurotransmission glutamatergique et GABAergique.....	117
Figure 35 : Effet des composés dans des neurones dérivés d'iPSC de patients autistes portant des mutations sur le gène <i>SHANK3</i>	118
Figure 36 : Doses réponses d'autres composés de la famille des inhibiteurs de Cdk	138
Figure 37 : Dose réponse de l'inhibiteur de GSK-3 CHIR 99021	138
Figure 38 : Expression de l'ARNm de Cdk5 et de SHANK3, 48h après la lipofection de neurones J14 avec un SiRNA dirigé contre Cdk5	139
Figure 39 : Comparaison de l'expression de l'ARNm de SHANK3 entre les neurones ASD et CTRL.....	140
Figure 40 : Différences d'arborisation entre les lignées ASD et CTRL et effet des composés VPA et lithium sur celles-ci	141
Figure 41 : Evaluation clinique de la patiente AUN-003 (<i>SHANK3</i> STOP ou ASD1) avant et après un traitement au lithium	152

Index des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des agents couramment utilisés ou en développement pour le traitement de l'autisme	27
Tableau 2 : Les différentes formes monogéniques d'autisme avec déficience intellectuelle	31
Tableau 3 : Les modèles neuronaux humains de TSA créés à partir d'ESC et d'iPSC.....	60
Tableau 4 : Récapitulatif des symptômes associés au PMS	65
Tableau 5 : Les partenaires de SHANK	83
Tableau 6 : Comparaison des phénotypes synaptiques et comportementaux des modèles de souris SHANK3	88
Tableau 7 : Récapitulatif des lignées ASD et CTRL.....	96
Tableau 8 : Mise au point de la densité cellulaire d'ensemencement pour le test de criblage	110
Tableau 9 : Comparaison aspiration manuelle vs aspiration robotisée.....	111
Tableau 10 : Optimisation du temps d'incubation pour l'étape d'inactivation de la DNase.....	111
Tableau 11 : Validation de la méthode Taqman en duplex	112
Tableau 12 : Choix du gène de ménage	112
Tableau 13 : Reproductibilité du test de criblage employant l'extraction/purification des ARNm suivie de l'analyse RT-qPCR Taqman en duplex sur 66 puits.....	112

Abréviations

-/-	Homozygote	DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
+/-	Hétérozygote	EB	Corps embryoides
4E-BPs	eIF4E-binding protein	EGF	Epidermal growth factor
5-AdC	5-Aza-2'-déoxycytidine	E/I	Excitation/Inhibition
5-LO	5-lipoxygénase	eIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
β-PIX	PAX interacting exchange factor	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Aβ	β-Amyloïdes	FDA	Food and drug administration
Abi-1	Abelson tyrosine kinase interacting protein	FGF2	Basic fibroblast growth factor
ABP	Actin-binding protein	FXS	Syndrome X fragile
Abp1	Actin binding protein 1	GABA	Acide γ-aminobutyrique
AD	Maladie d'Alzheimer	GKAP	Guanylate kinase-associated protein
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder	GMP	Good Manufacturing Practices
ADN	Acide désoxyribonucléique	GRIP	Glutamate receptor-interacting protein 1
AMM	Autorisation de mise sur le marché	GRM	Récepteur métabotrope au glutamate
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate	GSK-3	Kinase glycogène synthase 3β
ANK	Ankyrine	GTP	Guanosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique	Hbs	HOMER binding
ARNm	ARN messagers	HCS	High content screening
AVP	Arginine vasopressin	HDAC	Histone deacetylase
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	hESC	Human embryonic stem cells
BMP	Bone morphogenetic protein	hnRNP	Ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes
CAMKII	Kinase calcium/calmoduline-dépendante II	hPSC	Human pluripotent stem cells
Cas	CRISPR-associated	HTS	High throughput screening
Ca _v	Canal calcique voltage-dépendant	IB2	Islet Brain 2
CdC42	Cell division control protein 42 homolog	IGF-1	Insulin-like growth factor-1
Cdk5	Kinase cycline dépendante 5	IL1B	Interleukin-1 beta
CNV	Copy number variants	IP ₃ R	Intracellular calcium channel inositoltrisphosphate receptor
Cortactine	Cortical-actin-binding protein	iPSC	Induced pluripotent stem cells
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine	ISRS	Inhibiteur de la recapture de la sérotonine
CQ	Contrôle qualité	KLF4	Kruppel-like factor 4
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	LCP	Progéniteurs corticaux tardifs
CROI	Région cytogénétique d'intérêt	LTD	Dépression à long terme
Ct	Cycle threshold	LTP	Potentialisation à long terme
CTRL	Contrôle	MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase
CYFIP1	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	MAP-2	Microtubule-Associated Protein 2
DCS	D-cycloserine	MAPK8IP2	Mitogen-Activated Protein Kinase 8-Interacting Protein 2
DMSO	Dimethyl sulfoxyde	MEA	Micro Electrode Arrays
DPI	Diagnostic pré-implantatoire	MECP2	Methyl CpG binding protein 2

Abréviations

MEF	Mouse embryonic fibroblast	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
MEF2	Myocyte enhancer factor-2	SNV	Single nucleotides variants
mEPSC	Courants postsynaptiques excitateurs miniatures	SOX2	Sex determining region Y-box 2
mGluR	Récepteurs métabotropiques au glutamate	SPAR	Spine-associated RapGAP
miR	Micro-ARN	SSEA	Stage Specific Embryonic Antigen
MMP-9	Métalloprotéinase matricielle 9	SSTR2	Somatostatin receptor 2
MSN	Medium Spiny Neurons	TALEN	Transcription activator like effector nucleases
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1	TBP	Troubles bipolaires
NEP	Cellules neuroépithéliales	TED	Troubles envahissants du développement
NF1	Neurofibromatose de type 1	TED-NOS	Troubles envahissants du développement non spécifié
NLGN	Neuroligine	TRA	Tumour Rejection Antigen
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartate	TS	Timothy Syndrome
NOS1	Nitric oxide synthase 1	TSA	Trouble du spectre autistique
NTF	Neurotrophine	TSC	Tuberous sclerosis complex
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4	Tuj-1	Neuron-specific class III beta-tubulin
P2RX7	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	VPA	Acide valproïque
PDZ	PSD-95/discs large/zone occludens-1	Zn ²⁺	Ion zinc
PI3K	Kinase phosphoinositide-3		
PMS	Phelan McDermid syndrome		
ppI	Cortactin binding		
PPIA	Cyclophiline A		
Pro	Proline-rich		
ProSAPiP1	ProSAP-interacting protein 1		
PSD	Postsynaptic density		
PSP	Plateforme postsynaptique		
Pten	Phosphatase and tensin homolog		
RABL2B	RAS Oncogene Family-Like 2B		
Rich2	Rho-GAP interacting CIP4 homolog 2		
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction		
SAM	Motif sterile alpha		
SCO	Oscillations calciques synchronisées Spontanées		
SCZ	Schizophrénie		
SH3	Src homology 3		
SHANK	SH3 and multiple ankyrin repeat domains		
ShRNA	Small hairpin RNA		
SiRNA	Small interfering RNA		
SLC6A	Solute Carrier Family 6		

Résumé

Objectifs : Le gène *SHANK3* code pour une protéine dite d'« échafaudage », localisée dans les synapses des neurones glutamatergiques, qui est cruciale pour une transmission synaptique efficace. Des anomalies génétiques, conduisant à la diminution de la protéine SHANK3, sont impliquées dans des formes génétiques de troubles du spectre autistique ainsi que dans la schizophrénie. Les mutations étant hétérozygotes, il est théoriquement possible d'augmenter l'expression de la protéine SHANK3 en augmentant la transcription de l'allèle sain par des traitements chimiques. L'objectif de mon travail de thèse a été de tirer avantage des propriétés des cellules souches pluripotentes humaines (*Human Pluripotent Stem Cells*, hPSC) pour produire une grande quantité de neurones humains glutamatergiques *in vitro* et de les utiliser afin d'identifier des modulateurs de la transcription du gène *SHANK3* par criblage à haut débit.

Résultats : Des neurones corticaux glutamatergiques ont été différenciés à partir d'une lignée de cellules souches embryonnaires humaines (SA001, 46 XY, Cellartis, Suède) dans des plaques 384 puits. Une technique de criblage automatisée et miniaturisée a été développée pour permettre l'extraction de leur ARNm et la quantification, par qPCR Taqman en duplex, des variations d'ARNm de SHANK3. Un criblage de 205 composés, incluant des inhibiteurs de kinase, des régulateurs épigénétiques et des médicaments repositionnables, a permis d'identifier 28 hits augmentant de plus de 30 % l'ARNm de SHANK3. Quinze ont pu être confirmés par des expériences de dose réponses sur l'ARNm de SHANK3. Des expériences d'immunofluorescence par imagerie à haut contenu ont montrées que 4 composés augmentaient également les niveaux de la protéine SHANK3 dans le réseau neuritique, incluant des inhibiteurs de la kinase cycline dépendante 5 avec la roscovitine et le lithium (régulateur d'humeur), l'antiépileptique acide valproïque et l'antipsychotique fluoxétine. Des mesures fonctionnelles de flux calcique ont validé l'effet du lithium et de l'acide valproïque sur la force synaptique glutamatergique. Enfin, le potentiel de ces composés a également été confirmé sur des neurones différenciés à partir de cellules souches induites à la pluripotence (*Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) d'individus autistes portant une mutation sur le gène *SHANK3*.

Conclusion : Cette étude démontre qu'il est possible d'identifier des voies de régulation de protéines synaptiques clés, comme SHANK3, par méthode de criblage à haut débit en utilisant des neurones humains dérivés d'hPSC, incluant des neurones représentatifs d'individus autistes. Cette nouvelle approche devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsable de l'autisme et la découverte de nouveaux composés thérapeutiques, personnalisables à des sous-groupes de sujets autistes classifiés en fonction du gène ou de la voie de signalisation à corriger plutôt qu'en fonction de leurs symptômes cliniques hétérogènes.

Mots clés : Troubles du spectre autistique, SHANK3, régulation de transcription, criblage, iPSC, hPSC, neurones corticaux glutamatergiques, lithium, acide valproïque.

Abstract

Aims: The *SHANK3* gene encodes for a scaffold protein, located in synapses of glutamatergic neurons. It plays a crucial role in controlling glutamatergic synaptic transmission. Genetic anomalies leading to a decrease in SHANK3 protein expression are implicated in genetic forms of autism spectrum disorders and schizophrenia. Mutations being heterozygous, treatments that increase SHANK3 protein through transcriptional regulation may be therapeutically useful. Here I took advantage of properties of human pluripotent stem cells (hPSC) to produce a large amount of human glutamatergic neurons *in vitro* and use them to identify *SHANK3* gene transcription modulators by a large-scale screening strategy.

Results: Cortical glutamatergic neurons were differentiated from a human embryonic stem cell line (SA001, 46 XY, Cellartis, Sweden) in 384-well plates. An automated and high-throughput screening test was developed to extract mRNA and quantify SHANK3 mRNA variations using duplex Taqman qPCR. A screening assay was conducted on 205 compounds, including kinase inhibitors, epigenetic regulators and repositionable marketed drugs, and 28 compounds successfully passed the hit selection criteria yielding SHANK3 mRNA increases of at least 30%. Fifteen compounds were confirmed by dose-response experiments on SHANK3 mRNA. Further immunofluorescence studies using high content imaging confirmed that 4 compounds increased levels of SHANK3 protein in the neuritic network. Thus, this screening identified as SHANK3 regulators, 2 Cyclin-dependent kinase 5 inhibitors the lead molecule, roscovitine and the mood regulator, lithium; the antiepileptic drug valproic acid and the antipsychotic fluoxetine. In addition, functional calcium flux experiments validated lithium and valproic acid effect on glutamatergic synaptic strength. Finally, the efficacy of compounds was also confirmed on neurons differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC) of autistic patients bearing SHANK3 mutation.

Conclusion: This study demonstrates that cellular pathways regulating a key synaptic protein, SHANK3, can be explored on a large scale using hPSC-derived neurons, including autistic individuals neurons. This approach should improve knowledge of the molecular mechanisms responsible of autism and promote the discovery of new therapeutic compounds, personalized to autistic subgroups of individuals stratified according to gene or pathway dysfunction rather than according to clinical heterogeneous symptoms.

Key words: Autism spectrum disorders, SHANK3, transcriptional regulation, screening, iPSC, hPSC, glutamatergic neurons, lithium, valproic acid.

Introduction

I. Les troubles du spectre autistique (TSA)

1. Classification et diagnostic

L'autisme est la forme prototypique d'un groupe de conditions appelé les troubles du spectre autistique (TSA). Le terme *autisme* est pour la première fois utilisé par le psychiatre suisse Eugen Bleuler, pour décrire une manifestation particulière observée chez des patients schizophrènes, qui est le retrait social et la perte de contact avec la réalité (Bleuler, 1911). En 1943, le pédopsychiatre américain Leo Kanner reprend ce terme indépendamment de la schizophrénie (SCZ) pour qualifier un trouble du comportement qu'il observe chez 11 enfants. Ces enfants présentaient un retrait social avec une incapacité à établir les contacts affectifs habituels, des comportements répétitifs, un désir obsessionnel d'immuabilité et des troubles sévères du langage (Kanner, 1943). Bien que certains enfants de ce groupe aient été précédemment diagnostiqués comme schizophrènes, Kanner fait remarquer que leur comportement diffère de celui décrit dans la SCZ et se manifeste dès le début de leur vie, contrairement aux patients schizophrènes qui montrent un développement essentiellement normal, suivi ensuite de modifications du comportement et d'un retrait social progressif beaucoup plus tardif.

A peu près dans la même période, en 1944, le pédiatre autrichien Hans Asperger décrit lui aussi quatre jeunes garçons présentant un manque d'empathie, une difficulté d'intégration sociale et une forte préoccupation pour des intérêts particuliers. Cependant, ces enfants se distinguent de ceux décrits par Kanner par leur particularité à présenter un niveau intellectuel normal et un langage fonctionnel (Asperger, 1944). L'article étant rédigé en allemand, ses travaux restent méconnus jusqu'en 1981, lorsque la psychiatre britannique Lorna Wing les réactualise en faisant le lien entre les descriptions d'Asperger et 34 autres enfants de sa propre clinique. Elle propose ainsi la définition du syndrome d'Asperger, et la notion de continuité entre l'autisme de Kanner et le syndrome d'Asperger en mettant en avant la triade de caractéristiques autistiques qui comprend des troubles de l'interaction sociale, des troubles de la communication et la présence de gestes répétitifs et stéréotypés (Wing, 1981 ; Wing and Gould, 1979).

Ces caractéristiques seront largement reconnues et utilisées pour notamment classer l'autisme et le Syndrome Asperger pour la première fois dans la 4^{ème} édition du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV* ou DSM IV) de l'association Américaine de Psychiatrie (American Psychiatric Association, 2000), ainsi que dans la 10^{ème} édition de la classification internationale des maladies publiée par l'organisation mondiale de la santé (World Health Organization, 1992).

Le terme TSA est ainsi utilisé pour décrire le sous ensemble des troubles envahissants du développement (TED), avec une apparition des troubles avant l'âge des trois ans, une période caractérisée par une intense synaptogénèse dans le cerveau humain (Huttenlocher and Dabholkar, 1997), qui inclut :

- l'autisme typique, considéré comme le trouble le plus sévère des TED
- le Syndrome Asperger, qui diffère de l'autisme par l'absence de retard du développement cognitif et du langage

- les troubles envahissants du développement non spécifié (TED-NOS), ou autisme atypique, qui concernent les patients qui présentent des altérations sévères et envahissantes du comportement mais qui ne remplissent pas tous les critères d'âge et de symptomatologie de l'autisme
- les troubles désintégratifs de l'enfance, qui se caractérisent par une période de développement normal de 2 à 4 ans, suivie de l'apparition de symptômes autistiques
- le syndrome de Rett, dont l'étiologie génétique est connue et qui concernent uniquement des filles qui présentent un développement normal jusqu'à l'âge de 6 à 18 mois, suivi d'une régression sur les plans moteurs et cognitifs ainsi que l'apparition de stéréotypies.

Les critères diagnostiques de l'autisme étant continuellement révisés, dans le DSM-V publié en 2013, une nouvelle classification a vu le jour. Désormais, l'autisme, le syndrome d'Asperger, le trouble désintégratif de l'enfance et les TED non spécifiés ont été regroupés dans une catégorie générale toujours appelée « trouble du spectre autistique » (TSA). Le syndrome de Rett ne fait plus partie de la classification DSM-V (American Psychiatric Association, 2013). De plus, seules deux caractéristiques de symptômes subsistent par rapport à la triade initiale. Le diagnostic de l'autisme est désormais basé sur deux déficits majeurs qui sont les problèmes de communication sociale (fusion des troubles de la communication avec les troubles de réciprocité sociale) et les problèmes de comportements verbaux et non verbaux répétitifs restreints. Le retard ou l'absence de développement du langage a été éliminé car de nombreuses études ont montré que cette caractéristique n'était ni spécifique, ni universelle des individus atteints de TSA (Hartley and Sikora, 2010 ; Matson and Neal, 2010). Outre ces symptômes spécifiques, le DSM-V encourage également l'évaluation précise des conditions associées et leur prise en compte dans l'établissement du diagnostic. Parmi ces conditions, on peut notamment citer les particularités sensorielles, fréquentes chez les patients atteints de TSA (Wiggins et al., 2009).

2. Epidémiologie des TSA

a. Prévalence

Quand il a été identifié, l'autisme était considéré comme une maladie rare de l'enfance (Lotter, 1966). Cette première étude épidémiologique avait calculé la prévalence de l'autisme au sens strict (l'autisme de Kanner), et non de l'ensemble des TSA, et portait sur une population de 78 000 enfants âgés de 8 à 10 ans du comté du Middlesex (Angleterre). Après évaluation par des questionnaires comportementaux, la prévalence avait été estimée à environ 4,5/10 000 (soit 0,04 %). Cependant la prévalence des TSA a depuis été réévaluée et n'en fait plus un trouble rare. Selon les dernières estimations de 2014 des centres pour le contrôle et la prévention des maladies, l'autisme sous toutes ses présentations cliniques affecterait 1 enfant sur 68 aux Etats-Unis (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). Ainsi, ce chiffre est plus de 30 fois supérieur à la première estimation de la prévalence de l'autisme obtenue par Lotter. Les études parues par la suite, prenant en compte l'ensemble des TSA, ont rapporté un nombre toujours croissant de la prévalence, pour atteindre aujourd'hui une valeur d'environ 1,5 %.

La notion d'une « épidémie » d'autisme a été évoquée et divers facteurs environnementaux comme la pollution, les pesticides ou autres toxines ont été incriminés, mais, à part quelques exceptions, aucune preuve scientifique établissant un lien clair avec l'environnement n'a encore été rapportée. Il semblerait que l'augmentation apparente de la prévalence de l'autisme soit surtout due aux changements de pratique des diagnostics (élargissement des critères diagnostiques, meilleure accessibilité aux services de santé et d'éducation et à des tests diagnostiques objectifs permettant un diagnostic précoce) ainsi qu'à la sensibilisation du public par une meilleure information des professionnels de la santé et de la population générale. Le phénomène de substitution de diagnostic pourrait également être une explication plausible de l'augmentation de la prévalence des TSA. En effet, de nombreux enfants ayant reçu un diagnostic initial de déficience intellectuelle ont par la suite été réévalués et diagnostiqués autistes (King and Bearman, 2009 ; Shattuck, 2006). L'augmentation de la prévalence des TSA entre 1994 et 2003 est d'ailleurs couplée à une diminution de la prévalence de la déficience intellectuelle sur cette même période (Shattuck, 2006). Cette substitution peut d'ailleurs être expliquée par le fait qu'une meilleure prise en charge et un meilleur accès thérapeutique sont proposés aux patients atteints d'autisme par rapport à ceux atteints de déficience intellectuelle. De plus, selon une étude épidémiologique réalisée en Angleterre, basée sur l'étude d'une cohorte d'enfants autistes versus des sujets « adultes » de 16 ans et plus, la prévalence estimée pour les deux cohortes est similaire (environ 1 %), suggérant que la prévalence des TSA est stable dans le temps (Brugha et al., 2011).

b. Ratio

Les TSA affectent en moyenne environ quatre fois plus de garçons que de filles (4 : 1) (Baron-Cohen et al., 2011 ; Fombonne, 2002). Ce déséquilibre de ratio garçon-fille est particulièrement marqué dans les cas d'autisme sans déficience intellectuelle ainsi que dans les cohortes de patients atteints du syndrome Asperger où le sexe ratio peut aller jusqu'à 10 : 1 (Gillberg et al., 2006 ; Roy et al., 2009). Au contraire, chez les individus atteints d'autisme avec déficience intellectuelle, le déséquilibre de ratio garçon-fille semble s'atténuer, avec un ratio plus proche de 2 : 1 (Rivet and Matson, 2011). Les causes expliquant ce déséquilibre ne sont pas encore connues, mais deux principales hypothèses ont émergées (Werling and Geschwind, 2013).

❖ Le rôle des chromosomes sexuels

De nombreux gènes localisés sur le chromosome X ont été impliqués dans l'autisme (Betancur, 2011), comme les gènes *FMRI*, *MECP2*, *NLGN3*, *NLGN4*. L'hypothèse pourrait être que les filles seraient protégées des effets délétères de mutations récessives sur le chromosome X par transcription compensatoire de leur second chromosome intact.

De plus, des études ont montrées que les personnes atteintes d'aneuploïdies des chromosomes sexuels (syndrome de klinefelter (XXY) et syndrome 47 (XYY)) avaient plus de susceptibilités de développer des TSA (Bishop et al., 2011 ; van Rijn et al., 2008 ; Ross et al., 2012). Ainsi, deux hypothèses sont envisageables : soit le chromosome Y est un facteur de risque pour le développement des TSA, soit le deuxième X a des effets protecteurs, possiblement par le processus d'inactivation de l'X. Cependant, dans la plupart des familles, la transmission de

l'autisme ne se fait pas par le chromosome X. Donc les chromosomes sexuels jouent certainement un rôle mais ne peuvent pas expliquer, à eux seuls, la différence de ratio garçon-fille.

❖ **Le rôle des effets protecteurs féminins et des facteurs de risques masculins**

Des études rapportent l'existence d'un effet protecteur féminin contre le développement des TSA, qui conférerait aux filles un seuil de tolérance plus élevé que les garçons par rapport à l'expression de la pathologie (Jacquemont et al., 2014). Ainsi, d'après cette hypothèse, les filles seraient moins sensibles aux atteintes génétiques que les garçons, et il leur faudrait une « charge étiologique » plus forte pour développer l'autisme. Une étude de 2011 appuie cette théorie en montrant une plus grande proportion de réarrangements submicroscopiques, appelés variations du nombre de copies (*Copy Number Variants*, CNV) et de SNV (*Single Nucleotides Variants*) délétères dans l'ADN des femmes autistes par rapport à celui des hommes (Levy et al., 2011). Enfin, une étude a mis en évidence la première variante autosomique héritée avec une claire différence de pénétrance selon le sexe : les garçons portant une microdélétion dans le gène *SHANK1* développent un autisme de haut niveau alors que les filles portant la même microdélétion montrent uniquement de l'anxiété et de la timidité mais ne développent pas de phénotype autistique (Sato et al., 2012).

Un lien entre le développement de TSA et l'hormone sexuelle œstrogène a récemment été mis en évidence, avec une étude qui suggère que les enfants atteints d'autisme n'auraient pas un niveau d'expression suffisant de récepteurs aux œstrogènes pour bénéficier des effets neuroprotecteurs de l'hormone. En effet, une équipe américaine, en analysant le tissu cérébral du cortex préfrontal de cerveaux d'enfants décédés autistes et sains, a mis en évidence une diminution de 35 % des niveaux de récepteurs des œstrogènes beta et une réduction de 38 % de l'enzyme aromatasase (qui transforme la testostérone en œstrogènes) chez les enfants atteints d'autisme (Crider et al., 2014). De plus, l'hypothèse qu'il y aurait des facteurs de risque spécifiques masculins, comme la testostérone, pouvant augmenter la vulnérabilité des hommes à développer des TSA par rapport aux femmes, a été évoquée (Baron-Cohen, 2002 ; Geier et al., 2012). Les facteurs de risques masculins et les facteurs protecteurs féminins ne sont pas mutuellement exclusifs mais pourraient aller de pairs pour expliquer le biais de sexe dans les TSA.

3. Outils diagnostiques

Il n'existe aucun marqueur biologique ou d'imagerie permettant l'établissement d'un diagnostic de TSA. Celui-ci est donc exclusivement réalisé par une évaluation clinique des sujets, en s'appuyant sur des outils diagnostiques standardisés. Les deux tests les plus couramment utilisés sont l'ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*, Lord et al., 1989) et l'ADI-R (*Autism Diagnostic Interview-Revised*, Lord et al., 1994). Ces deux instruments d'évaluation, adaptés à l'âge et au niveau de langage du patient, sont dits catégoriels, car ils permettent de conclure à la présence ou non de TSA. L'ADOS permet d'évaluer les comportements sociaux, la communication, l'interaction sociale réciproque et les comportements des patients, au cours de séquences de jeux et d'entretiens. L'ADI-R consiste quant à lui en un entretien avec les parents comprenant une centaine de questions, qui visent à évaluer les capacités des enfants dans les domaines des interactions sociales, de la communication et des stéréotypies.

D'autres instruments, dits dimensionnels, ont été développés afin d'évaluer quantitativement les symptômes autistiques. Il s'agit notamment de la SRS (*Social Responsiveness Scale*), qui mesure la sévérité des atteintes sociales (Constantino et al., 2003) ; la RPM (*Raven's Progressive Matrices*) et le PPVT (*Peabody Picture Vocabulary Test*) qui évaluent les fonctions cognitives et le langage des sujets (Campbell and Dommestrup, 2010 ; Raven and Court, 1998) ; ainsi que l'échelle de Vineland (*Vineland Adaptive Behavior Scale*, Sparrow et al., 1984) conçue pour mesurer le comportement adaptatif dans les domaines de la socialisation, de la communication et de l'autonomie de la vie quotidienne ou la C-GAS (*Children-Global Assessment Scale*, Endicott et al., 1976) qui évalue le retentissement fonctionnel des manifestations observées.

Il existe également d'autres échelles d'évaluation standardisées pour évaluer les symptômes associés comme l'ADHD-RS (*ADHD Rating Scale*) pour le trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité (*Attention Deficit Hyperactivity Disorders*, ADHD) ou le YMRS (*Young Mania Rating Scale*) pour les symptômes maniaques (DuPaul et al., 1998 ; Young et al., 1978).

4. Hétérogénéité clinique

Le terme TSA est utilisé pour désigner tout individu qui rencontre les critères de diagnostic cité en partie 1. Mais sous ces termes se retrouvent des sujets avec des degrés extrêmes d'hétérogénéité clinique, ayant des problèmes profonds à modérés, mais toujours avec un handicap fonctionnel. Le gradient de sévérité des atteintes, peut varier considérablement d'un individu à l'autre et chez un même individu au cours de sa vie.

Comme exemple, on peut citer l'âge variable d'apparition des troubles, les niveaux de langage très hétérogènes mais également les différents degrés d'atteintes comportementales. En plus des caractéristiques principales des TSA décrites dans la section ci-dessus, d'autres manifestations cliniques et comportementales peuvent être associées, à des fréquences variables. Certains patients atteints de TSA peuvent présenter des dysmorphies faciales, ou d'autres malformations congénitales, ou encore des anomalies neuromusculaires ou métaboliques (particulièrement lorsque l'autisme est associé à un syndrome génétique comme le syndrome X-fragile ou le syndrome de Phelan McDerimid).

En matière de fonctionnement cognitif, les individus atteints de TSA montrent là encore une grande hétérogénéité dans leurs capacités intellectuelles, allant d'une sévère déficience intellectuelle (caractérisée par un quotient intellectuel inférieur à 70) à une intelligence supérieure à la normale. L'autisme sans déficience intellectuelle est appelé autisme de haut niveau. Selon les études, entre 40 et 70 % des patients atteints de TSA possèdent un retard développemental et/ou des problèmes intellectuels (Fombonne, 2009 ; Williams et al., 2006). Ces déficiences intellectuelles, étant la composante la plus héréditaire du phénotype, elles le rendent de ce fait encore plus complexe (Szatmari et al., 2008).

S'ajoute à cela, pour certains patients, des symptômes comorbides (Figure 1), incluant :

- Phobies spécifiques et sociales (Leyfer et al., 2006 ; Simonoff et al., 2008)
- Anxiété et dépression pour environ 70 % des patients (Goldstein and Schwebach, 2004 ; Simonoff et al., 2008)

- Epilepsie qui concerne environ un tiers des patients atteints de TSA (Mouridsen et al., 1999, 2011). La fréquence varie selon l'âge des patients, leur sexe et leur niveau d'atteinte cognitive
- Trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité (Goldstein and Schwebach, 2004 ; Simonoff et al., 2008)
- Problème d'agressivité et automutilation
- Troubles du sommeil (difficultés d'endormissement, réveils nocturnes et/ou matinaux précoces) rapportés chez 50 à 80 % des enfants atteints de TSA (Kotagal and Broomall, 2012)
- Troubles bipolaires ou troubles obsessionnels compulsifs (Gillott et al., 2001 ; Leyfer et al., 2006 ; Simonoff et al., 2008)
- Problème de coordination motrice (Fournier et al., 2010).

Plus rarement, les individus atteints de TSA peuvent présenter un diagnostic additionnel de schizophrénie. D'ailleurs, certaines caractéristiques comportementales des TSA sont proches des symptômes négatifs observés dans la SCZ, en particulier l'absence d'expression d'émotions et le repli social.

Au vu de cette hétérogénéité clinique, se pose le problème évident de la prise en charge clinique des différents patients. Selon les symptômes développés, le traitement pharmacologique prescrit devra être différent et adapté spécifiquement au patient. La prochaine partie récapitule les différents traitements pour l'autisme déjà mis en place, et en cours de développement.

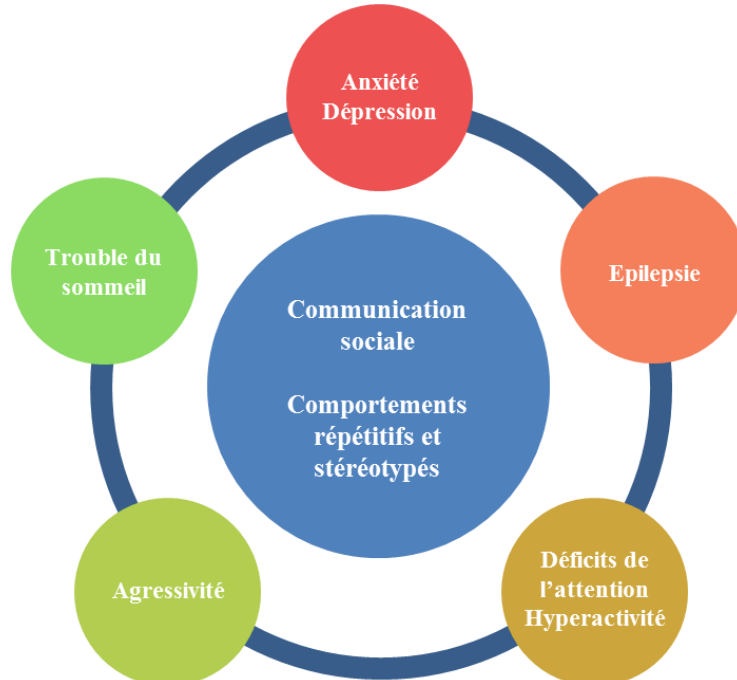


Figure 1 : Critères spécifiques et éléments associés à considérer dans la caractérisation des TSA, d'après le DSM-V. Au milieu, les symptômes spécifiques. Autour, les comorbidités et conditions la plupart du temps associées aux TSA. Adaptée de Spooren et al. 2012.

5. Traitements pour les TSA

a. Thérapies Psycho-comportementales

Les interventions éducationnelles sont la base de la gestion des TSA, cela couvre la communication, le comportement social, la vie quotidienne, le jeu, les compétences de loisirs, la réussite scolaire et les comportements inadaptés (Myers and Johnson, 2007). Ces interventions éducationnelles visent à améliorer les compétences cognitives et d'apprentissage des personnes autistes et à faciliter leur capacité à interagir avec l'extérieur et à mieux s'y adapter. Le nombre de méthodes de prise en charges des patients atteints de TSA n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années. Les programmes les plus classiques sont les thérapies comportementales cognitives, avec la méthode de l'analyse du comportement appliqué ABA (*Applied Behavioral Analysis*, Ivar, 1987) et le programme TEACCH (*Treatment and Education of Autistic and related Communication-handicapped CHildren*) qui axe plutôt sur le développement de l'autonomie de la personne (Mesibov and Shea, 2010). On peut citer également la méthode PECS (*Picture Exchange Communication System*) qui propose une méthode alternative de la communication (Bondy and Frost, 2001). D'autres interventions existent et peuvent aussi être utilisées pour l'autisme comme les interventions de compétences sociales (facilitation des interactions sociales), les interventions focalisées sur les interactions et les jeux (interactions entre enfants et parents ou autres), les formations des parents, et les interventions ciblées sur les problèmes de sommeil. Cependant, selon la revue faite par Warren et al., les preuves sont insuffisantes pour connaître l'efficacité de la plupart de ces approches et des données d'essais cliniques contrôlés de plus grandes tailles sont attendues (Warren et al., 2011).

b. Pharmacothérapie

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour les TSA. Certains composés thérapeutiques ont démontré une certaine efficacité, mais ne résolvent pas les déficits majeurs de communication et d'interaction. Ils visent uniquement les symptômes spécifiques de l'autisme ou les symptômes comorbides liés, comme l'hyperactivité, les difficultés d'attention, l'agressivité, l'irritabilité, l'anxiété, les comportements stéréotypés et les troubles du sommeil. Ils sont malgré tout très utiles car ils permettent de canaliser les comportements inadaptés associés aux TSA ou les comorbidités psychiatriques qui peuvent interférer avec les thérapies éducationnelles, les progrès éducatifs, la socialisation, et la qualité de vie du patient et de la famille (Myers and Johnson, 2007). Ainsi ces symptômes gênants peuvent être traités en utilisant des agents pharmacologiques qui agiront en synergie avec les thérapies comportementales et éducatives ; les traitements médicamenteux n'étant souvent envisagés qu'après l'échec de celles-ci.

Beaucoup d'agents pharmacologiques dans le cadre de l'autisme ont été étudiés plus en détail et ont produit des résultats conflictuels dans des essais cliniques contrôlés. Ils ne sont en général efficaces que dans des sous-groupes de patients, ce qui reflète une certaine hétérogénéité du génotype et du phénotype des sujets. Cette hétérogénéité complique de ce fait la prescription de médicaments et le développement de nouveaux composés pour l'autisme. Ainsi, cela a entraîné beaucoup de traitements médicamenteux différents, prescrits au cas par cas, et qui sont généralement utilisés sans autorisation, non approuvés pour l'utilisation de l'autisme, et souvent

restrictifs pour l'utilisation des enfants. Le Tableau 1 récapitule les composés thérapeutiques qui sont déjà indiqués pour le traitement de l'autisme ou en cours d'investigation.

❖ Les neuroleptiques classiques

Ce sont les médicaments les plus prescrits pour le traitement des TSA chez l'enfant et l'adolescent. Ils bloquent les récepteurs dopaminergiques, cholinergiques, α_1 -adrénergiques, histaminiques et sérotoninergiques. Des études ont montré l'efficacité des composés tels que l'halopéridol ou la chlorpromazine sur les symptômes d'agressivité, d'hyperactivité et d'impulsivité. Mais leur très mauvaise tolérance, impliquant généralement de nombreux effets secondaires, de type neurovégétatifs, anticholinergiques (hypotension artérielle et tachycardie), neurologiques (sommolences, retentissement cognitif), neuroendocriniens (prise de poids, hyperprolactinémie) et cardiovasculaires, est un frein à la prescription de ces molécules (Campbell and Overall, 1989 ; Campbell et al., 1997).

❖ Les neuroleptiques atypiques

Cette famille de composés est mieux tolérée par les enfants et adolescents atteints d'autisme. Deux antipsychotiques atypiques sont majoritairement prescrits : la rispéridone et l'aripiprazole. Ce sont les deux seuls médicaments approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration* ou FDA) pour le traitement de problèmes de comportement de type irritabilité (agression, hyperactivité, automutilation) associé à l'autisme chez l'enfant et l'adolescent. Ces deux médicaments auraient également un effet positif sur les stéréotypies (Aman et al., 2005 ; Ching and Pringsheim, 2012 ; Farmer and Aman, 2011 ; McCracken et al., 2002). Des améliorations dans les interactions sociales et la réciprocité ont également été observées, mais ce serait plutôt une conséquence indirecte d'une réduction globale de comportements mal-adaptés, plutôt qu'un effet thérapeutique primaire de ces médicaments.

La rispéridone (Risperdal®) est un neuroleptique, antagoniste de la sérotonine (récepteur 5-HT_{2A}) et agoniste des récepteurs dopaminergiques D₂, qui réduit efficacement les comportements agressifs et l'irritabilité. Plusieurs études en double aveugle versus un placebo ont démontré une efficacité clinique de la rispéridone sur l'irritabilité, l'agressivité, l'hyperactivité, et les comportements stéréotypés (McCracken et al., 2002 ; Shea et al., 2004). D'autres études ont également démontrées que ces effets bénéfiques observés étaient maintenus sur le long terme (McDougle et al., 2005 ; Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network, 2005a). En revanche aucune amélioration significative de la communication et de l'interaction sociale n'a été observée chez les patients traités à la rispéridone (McCracken et al., 2002 ; McDougle et al., 2005). Quelques effets secondaires ont été observés, les plus fréquents étant une prise de poids, de la fatigue, une légère augmentation de la fréquence cardiaque et de la tension artérielle.

L'aripiprazole (Abilify®) est un antipsychotique atypique, dit de troisième génération, également utilisé pour le traitement de la schizophrénie et des troubles bipolaires. Dans deux études contrôlées, l'aripiprazole montre chez des enfants et adolescents autistes des effets bénéfiques sur l'irritabilité, l'hyperactivité et la stéréotypie (Marcus et al., 2009 ; Owen et al., 2009). De plus, l'effet de l'aripiprazole est maintenu à long terme dans des traitements de longue durée (Findling

et al., 2014 ; Marcus et al., 2011a). Les effets secondaires les plus fréquents sont la somnolence, la sensation de fatigue, les nausées et vomissements, la prise de poids et certains effets indésirables métaboliques (glycémie, cholestérolémie, triglycéridémie) (Marcus et al., 2011a, 2011b).

Ces effets secondaires sont particulièrement marqués chez les enfants par rapport aux adultes, car des doses plus importantes doivent leur être administrées pour des effets thérapeutiques similaires. Ainsi, compte tenu des effets secondaires lourds, ces médicaments sont réservés aux patients avec de sévères problèmes de comportements. Un suivi systématique et régulier des sujets tout au long du traitement est vivement recommandé (Pappadopulos et al., 2003).

D'autres agents neuroleptiques atypiques, comme la clozapine, l'olanzapine (Hollander et al., 2006a), la ziprasidone (Malone et al., 2007) ou la paliperidone (Stigler et al., 2012) ont également montré des améliorations vis-à-vis des comportements agressifs et de l'hyperactivité chez des patients atteints de TSA.

❖ Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine

Les arguments en faveur de la prescription d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) pour le traitement des TSA ont été en partie tirés de l'observation d'hypersérotoninémie chez 30 % des patients (Leboyer et al., 1999) et d'une dérégulation de la synthèse de sérotonine au cours du développement de l'enfant autiste (Chugani et al., 1999).

L'ISRS fluoxétine est ainsi envisagée pour le traitement des comportements ritualisés (dont les rituels verbaux), des obsessions et des stéréotypies, ainsi que pour le traitement de la dépression parfois associée aux TSA. Elle dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne chez l'enfant, mais uniquement pour le traitement de la dépression (modérée à sévère). Plusieurs études ont montré des résultats plutôt divergents, rendant l'efficacité de la fluoxétine encore incertaine. Des études ouvertes ont tout d'abord montré sur les enfants et adolescents atteints de TSA une amélioration de l'irritabilité, des stéréotypies, des comportements ritualisés et des troubles du langage (Alcamí Pertejo et al., 2000 ; DeLong et al., 2002 ; Fatemi et al., 1998). Deux études contrôlées menées par Hollander et al., en 2005 et 2012, montrent un effet plutôt bénéfique de la fluoxétine sur les troubles obsessionnels et ritualisés d'enfants et adolescents atteints de TSA par rapport à un placebo (Hollander et al., 2005, 2012). Au contraire, l'autisme Trial Network en 2009, dans leur étude non publiée, ne rapporte pas d'amélioration de la fluoxétine par rapport à un placebo vis-à-vis des comportements répétitifs associés à l'autisme (Autism Speaks press release, 2009). Les effets indésirables, plutôt modérés parfois observés, sont de l'irritabilité, des problèmes d'humeur, des troubles du sommeil (insomnie) et une diminution de l'appétit.

La fluvoxamine est un autre ISRS potentiellement intéressant. En effet, il a été premièrement jugé efficace dans un traitement à court terme par rapport à un placebo sur les symptômes autistiques d'adultes atteints d'autisme, notamment sur les comportements répétitifs et mal adaptés, les défauts de langage et l'agressivité (McDougle et al., 1996). De plus, Fukuda et al. rapportent dans leur étude contrôlée une amélioration du contact visuel et du langage des patients autistes traités à la fluvoxamine (Fukuda et al., 2001). Le citalopram a également été étudié mais donne des résultats mitigés quant à son efficacité sur les symptômes compulsifs et les conduites répétitives (King et al., 2009 ; Namerow et al., 2003).

❖ Les médicaments ciblant les troubles de l'attention avec hyperactivité

Le méthylphénidate est un psychostimulant pour le traitement des ADHD. Il commence à être préconisé pour le traitement du déficit attentionnel et/ou de l'hyperactivité avec impulsivité, symptômes fréquents chez les patients atteints de TSA. En effet quelques études contrôlées ont montré chez les patients atteints d'autisme, avec des efficacités variables, une amélioration de leur hyperactivité, impulsivité et troubles attentionnels (Handen et al., 2000 ; Di Martino et al., 2004 ; Pearson et al., 2013 ; Quintana et al., 1995 ; Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network, 2005b). De plus, une étude a récemment mis en évidence de possibles effets positifs du méthylphénidate sur l'attention conjointe, la communication sociale et les manifestations d'affection chez des patients autistes (Jahromi et al., 2009).

L'atomoxetine est un médicament utilisé pour les troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité, qui n'est pas un psychostimulant, mais un inhibiteur hautement sélectif des transporteurs pré-synaptiques de la noradrénaline. Deux études ont montré une efficacité de ce médicament sur les symptômes ADHD chez des enfants autistes (Harfterkamp et al., 2012, 2013).

La clonidine est un médicament agoniste des récepteurs adrénergiques de type α_2 utilisé également dans le trouble du déficit de l'attention qui a également fait ses preuves chez des enfants autistes atteints de ces symptômes (Fankhauser et al., 1992).

❖ Les médicaments antiépileptiques

Quelques études ont montré que le valproate pouvait être efficace dans le traitement de l'irritabilité et des stéréotypies chez les enfants autistes (Hollander et al., 2006b, 2010). En revanche, son efficacité est contestable car une autre étude ne montre, quant à elle, pas d'amélioration de l'irritabilité avec un traitement au valproate (Hellings et al., 2005).

D'autres antiépileptiques comme le lamotrigine et le levetiracetam ont été étudiés et ne montrent pas d'efficacité dans l'amélioration des comportements autistiques (Belsito et al., 2001 ; Wasserman et al., 2006). Le topiramate a montré, quant à lui, une efficacité en combinaison avec la rispéridone, sur le comportement des enfants autistes (Rezaei et al., 2010).

D'autres études sont nécessaires pour conclure sur un réel effet des antiépileptiques en monothérapie ou en combinatoire avec des antipsychotiques tels que la rispéridone.

❖ La mélatonine pour les troubles du sommeil

Les troubles du sommeil ont une répercussion certaine sur le comportement, l'apprentissage et les progrès que pourrait faire le patient dans la journée. Ainsi, la mélatonine, une neuro-hormone impliquée dans le contrôle des cycles du sommeil et du rythme circadien, et qui est anormalement synthétisée chez plus de 60 % des patients (due à une diminution de l'activité de l'enzyme acétylsérotinine-O-méthyltransférase qui intervient dans la synthèse de mélatonine) (Melke et al., 2008), peut être prescrite pour réguler les troubles de sommeil largement observés chez les patients atteints de TSA (Cortesi et al., 2012 ; Malow et al., 2012). Une étude large a démontré plus précisément que l'utilisation de la mélatonine couplée à de la thérapie comportementale cognitive était la méthode la plus efficace pour réduire les symptômes d'insomnies, venait ensuite la mélatonine seule, puis la thérapie comportementale cognitive seule (Cortesi et al., 2012).

❖ Les modulateurs des récepteurs GABAergiques et glutamatergiques

Une altération ou un déséquilibre de la balance des courants inhibiteurs et excitateurs a été récemment impliqué dans l'autisme. Ainsi, au cours de ces dernières années, des modulateurs des récepteurs au NMDA (acide N-méthyl-D-aspartate) et au GABA (acide γ -aminobutyrique) ont été investigués, comme potentiels traitements pour l'amélioration des symptômes et des problèmes de comportement. Malgré des données précliniques encourageantes, les essais cliniques ont cependant été généralement décevants. C'est le cas des antagonistes des récepteurs au NMDA amantadine et riluzole (King et al., 2001 ; The United States National Institute of Health., 2015). En revanche le N-acétylcystéine a montré une efficacité sur l'irritabilité d'enfants atteints d'autisme dans une petite étude (Hardan et al., 2012) et la mémantine, dans 8 études différentes, a montré une efficacité notamment sur leur comportements sociaux (Erickson et al., 2007). Des études de traitements combinatoires de ces molécules avec la rispéridone ont tout de même montré un bénéfice certain de ces nouveaux composés sur le comportement des patients atteints de TSA comparé aux patients traités à la rispéridone seule (Ghaleiha et al., 2013a, 2013b ; Ghanizadeh and Moghimi-Sarani, 2013 ; Mohammadi et al., 2013).

L'arbaclofen, un agoniste des récepteurs GABA, a été suggéré efficace sur la fonction sociale dans une étude concernant une population de patients X fragile (Berry-Kravis et al., 2012).

La D-cyclosérine (DCS), un agoniste partiel des récepteurs au NMDA, a été, quant à lui, jugé efficace dans des études précliniques chez des souris autistes déficientes du gène *SHANK2* (Won et al., 2012) et chez des souris déficientes du gène *neuroligine 1 (NLGN1)* (Blundell et al., 2010). Elle corrige respectivement les défauts d'interaction sociale et les comportements répétitifs de ces souris. S'en sont suivi trois études cliniques, dont la première a reporté que la DCS améliorait la sociabilité de 40 % des sujets atteints d'autisme (Posey et al., 2004). Vingt autres sujets ont fait l'objet d'une deuxième étude qui a montré l'amélioration de leurs comportements stéréotypés (Urbano et al., 2014). Enfin, un essai clinique en double aveugle sur 20 adolescents et jeunes adultes atteints d'autisme a prouvé l'amélioration significative des comportements sociaux avec un traitement à la DCS (Urbano et al., 2015).

❖ Autres agents

L'effet du bumétanide, un diurétique modulateur des récepteurs GABA, antagoniste du canal importateur d'ions chlorure NKCC1 est un nouveau médicament prometteur pour le traitement de l'autisme. En effet, l'effet paradoxal des benzodiazépines (agonistes du GABA) parfois observé chez des patients autistes traités avait suscité, à Lemonnier et ses collaborateurs, l'hypothèse d'une action anormale excitatrice du GABA, due (comme dans l'épilepsie) à une concentration intracellulaire en ions chlorure trop élevée. Ainsi, un essai clinique en double-aveugle sur 54 enfants atteints de TSA a permis de montrer que le bumétanide améliorait de façon globale les comportements autistiques. Ce médicament est d'autant plus prometteur que le seul effet secondaire constaté était une légère hypokaliémie observée chez quelques enfants seulement pouvant être facilement traitée par un apport en potassium (Lemonnier et al., 2012).

L'oxytocine, une hormone synthétisée par l'hypothalamus et impliquée dans la reconnaissance sociale, l'anxiété ou encore les comportements maternels, a également prouvé une efficacité vis à vis de l'autisme. Il aurait a priori le même mode d'action que le bumétanide, en réduisant l'action

anormale excitatrice du GABA par correction de la concentration intracellulaire en ions chlorures (Tyzio et al., 2014). Des anomalies de la concentration sanguine en oxytocine ont tout d'abord été décrites dans l'autisme et ont permis de désigner cette hormone comme potentiel traitement. De récentes études ont montré que l'administration intranasale d'oxytocine améliore les comportements sociaux et la prise de décision chez des patients autistes (Andari et al., 2010 ; Guastella et al., 2010). Ses résultats très encourageants ont ouvert la voie à plus d'une douzaine d'essais cliniques en cours de recrutement (The United States National Institute of Health., 2015). Une étude réalisée par Gordon et al. montre que l'oxytocine intranasale augmente l'activité du cerveau suite à des stimuli sociaux et à l'inverse atténue les réponses vis à vis des stimuli non sociaux (Gordon et al., 2013). Il est à noter tout de même que deux études menées sur des patients autistes n'ont pas montré d'efficacité (Dadds et al., 2014 ; Guastella et al., 2015).

Quatre études, dont deux essais cliniques contrôlés en double aveugle versus un placebo, ont reporté que la galantamine pouvait améliorer les symptômes chez des individus atteints de TSA. La première étude contrôlée portant sur 20 enfants atteints, a montré l'amélioration significative de l'irritabilité, du contact visuel, de l'hyperactivité et de la parole, lorsque les patients étaient traités à la galantamine par rapport à un placebo (Niederhofer et al., 2002). La seconde étude contrôlée, menée en 2013, a été réalisée sur 40 enfants atteints, et a montré qu'un traitement combinatoire de la galantamine avec du rispéridone avait un effet positif significatif sur leur irritabilité et leur léthargie/retrait social par rapport à un traitement rispéridone et placebo. Aucun effet indésirable particulier n'a été observé (Ghaleiha et al., 2013c). Ainsi la galantamine a montré des résultats encourageants pour l'amélioration des symptômes propres au TSA et des symptômes associés, mais des essais cliniques de plus grande échelle devront être conduits pour juger de son efficacité.

Pour conclure, à l'heure actuelle, aucun médicament ne traite efficacement l'ensemble des symptômes autistiques. Devant la prévalence grandissante de ce trouble, le besoin en agents pharmacologiques efficaces devient de plus en plus nécessaire. La recherche de nouveaux composés thérapeutiques est donc un domaine encore très en demande pour les TSA. Des études récentes de pharmacothérapie ayant fonctionnées sur des modèles animaux de formes monogéniques d'autisme, comme les inhibiteurs de mGluR5 pour le syndrome X fragile ou l'IGF-1 pour les formes impliquant SHANK3 offrirait néanmoins de nouvelles perspectives de traitement (Bozdagi et al., 2013 ; Michalon et al., 2012). De plus, elles supportent l'hypothèse que l'autisme n'est pas irréversible, et qu'il serait possible de traiter ce trouble, même si le traitement est commencé tardivement. Cependant, les nouveaux traitements pour l'autisme devront prendre en compte le degré extrême d'hétérogénéité clinique et étiologique, et ce dès les essais cliniques, pour que l'effet réel de ces composés soit étudié. Des progrès quant à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'autisme devraient permettre de développer des stratégies thérapeutiques mieux adaptées à des sous-groupes de patients atteints d'autisme en fonction des différentes voies biologiques impliquées. La possibilité de traitements multiples, pour cibler les différents types de symptômes, devra être fortement envisagée.

Tableau 1 : Récapitulatif des agents couramment utilisés ou en développement pour le traitement de l'autisme. Adapté de Spooen et al., 2012 et Young and Findling, 2015.

	Composés	Indication	Stage de développement	Mécanisme d'action
Neuroleptiques classiques	Halopéridol	Agressivité/Hyperactivité		Antagoniste Dopamine
	Chlorpromazine	Agressivité/Hyperactivité		Antagoniste Dopamine
Neuroleptiques atypiques	Aripiprazole	Agressivité/Irritabilité	Approuvé par la FDA	Agoniste partiel D2 et 5-HT1 Antagoniste 5-HT2
	Rispéridone	Agressivité/Irritabilité	Approuvé par la FDA	Agoniste D2 Antagoniste 5-HT2A
	Olanzapine	Agressivité/Irritabilité	Phase II/III	Antagoniste D2 Antagoniste 5-HT
	Paliperidone	Agressivité/Irritabilité	Phase III	Antagoniste 5-HT2A Antagoniste D2
	Ziprasidone	Agressivité/Irritabilité	Phase II	Antagoniste 5-HT2A Antagoniste D2
Antidépresseurs	Fluoxétine	Comportements répétitifs	Phase III	ISRS
	Fluvoxamine	Comportements répétitifs	Phase III	ISRS
	Citalopram	Comportements répétitifs	Phase II	ISRS
Médicaments contre l'ADHD	Méthylphénidate	ADHD	Phase IV	Inhibiteur de la recapture des catécholamines
	Clonidine	ADHD		Agoniste récepteurs adrénergiques
	Atomoxetine	ADHD	Phase IV	Inhibiteur sélectif des transporteurs de la noradréline
Antiépileptiques	Valproate	Irritabilité Comportement répétitifs	Phase II/III/IV	Modulateur GABAergique Inhibiteur HDAC
	Lamotrigine	Déficits sociaux	Phase II	Modulateur glutamatergique
	Topiramate	Comportements répétitifs		Modulateur glutamatergique
Agents Glutamatergiques et GABAergiques	N-acétylcystéine	Irritabilité	Phase II	Antagoniste NMDA
	Amantadine	Déficits sociaux	Phase II	Antagoniste NMDA
	Mémantine	Déficits sociaux	Phase IV	Antagoniste NMDA
	Riluzole	Comportements répétitifs	Phase II FXS : Phase IV	Antagoniste NMDA
	Arbaclofen	Irritabilité FXS : déficits sociaux	Phase III FXS : phase III	Agoniste GABA
	D-Cyclosérine	Déficits sociaux Comportements répétitifs	Phase III	Agoniste NMDA
	Bumétanide	Troubles du comportement	Phase III	Antagoniste du canal importateur ion chlorure
Autres agents	Oxytocine	Déficits sociaux	Phase III	Hormone
	Mélatonine	Troubles du sommeil	Phase II	Hormone
	Galantamine	Déficits de communication	Phase III	Inhibiteur de l'acétylcholinesterase

6. *Etiologie des TSA*

Bien que Leo Kanner ait suggéré dans son étude le caractère inné des comportements anormaux qu'il observait chez ses jeunes patients, le rôle des facteurs génétiques dans l'étiologie des TSA ne sera reconnu que 20 ans plus tard. Il est désormais établi que les facteurs génétiques jouent un rôle majeur dans l'apparition de la maladie. Pourtant, une cause génétique n'est identifiée que chez un faible nombre de personnes atteintes. On parle alors d'autisme syndromique, quand l'anomalie génétique causale est bien connue et entraîne un syndrome spécifique incluant le développement de troubles autistiques. Mais pour la majorité des cas autistiques, dit autisme non syndromique, la cause n'est pas connue, et la combinaison d'une multitude de facteurs est probablement mise en jeu pour le développement du phénotype autistique. L'hétérogénéité de ces troubles, déjà évoquée du point de vue clinique, se retrouve ainsi dans la diversité des facteurs génétiques impliqués, avec probablement également le rôle d'éléments environnementaux.

a. *Influence environnementale*

Les facteurs de risque environnementaux considérés pour l'autisme sont particulièrement liés à la grossesse, comme des infections maternelles ou des expositions prénatales à des agents tératogènes ou à des toxines. Ainsi, certaines études ont montré que des infections maternelles virales telles que la rubéole (Chess, 1971 ; Chess et al., 1978) ou le cytomégalovirus (Sweeten et al., 2004 ; Yamashita et al., 2003) seraient impliquées dans l'étiologie de l'autisme. De plus, une exposition aux toxines due à une hypothyroïdie de la mère non traitée (Andersen et al., 2014) ainsi que la consommation d'alcool (Stevens et al., 2013) ou la prise de l'antiépileptique acide valproïque (Christensen et al., 2013) pendant la grossesse, sont des facteurs prénataux pouvant être impliqués dans le développement de l'autisme.

D'autres facteurs environnementaux potentiellement associés à l'autisme seraient périnataux ou néonataux. On suspecte notamment l'implication des naissances prématurées, de la souffrance fœtale ou de l'hyper-bilirubinémie (Guinchat et al., 2012). Certains métaux, en particulier le zinc et le cuivre, pourraient également engendrer un syndrome autistique, en influant sur le fonctionnement du système GABAergique (Bjorklund, 2013). Mais les preuves sont insuffisantes pour savoir si ces risques sont causals ou jouent simplement un rôle secondaire dans le développement des symptômes autistiques chez des personnes à vulnérabilité génétique.

Enfin, l'étude des facteurs épigénétiques potentiellement impliqués dans l'autisme est un domaine en pleine expansion. Les facteurs épigénétiques regroupent des aspects physiques (composés biochimiques actifs) et des aspects psychologiques (comme le stress) qui modifient la chimie du cerveau en modifiant l'expression des gènes, à des moments précis, comme au cours du développement. Ainsi l'hypothèse serait que des facteurs environnementaux pourraient moduler les facteurs génétiques responsables de la manifestation des TSA au cours de l'enfance. Peu d'évidences convaincantes ont été apportées pour le moment mais les facteurs épigénétiques pourraient révéler de nouvelles pistes étiologiques. L'observation des différences de méthylation entre les génomes de jumeaux discordants pour l'autisme, indiquent que ce phénomène pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de la maladie (Wong et al., 2014).

Ces causes environnementales avérées n'expliquent de toute manière qu'une faible fraction de cas. L'importance relative de ces facteurs est controversée, et un lien clair entre ces éléments environnementaux et le développement de l'autisme manque dans la plupart des cas.

b. Influence génétique

Les études de familles et les études de jumeaux ont mis en évidence une large contribution génétique et un haut degré d'héritabilité dans les TSA. De plus, la description de maladies monogéniques rares avec une présentation typique de l'autisme dans leurs symptômes, ainsi que des formes liées à des remaniements chromosomiques ont également mis en avant la contribution des facteurs génétiques dans l'autisme.

Les études sur les jumeaux ont rapporté pour la première fois l'existence d'une contribution génétique dans les TSA. En effet, ces études ont montré que le taux de concordance pour les jumeaux monozygotes atteignait environ 90 % ; et entre 10 et 20 % pour les jumeaux dizygotes (Bailey et al., 1995 ; Hallmayer et al., 2011). Le taux de concordance étant en théorie de 100 % pour les jumeaux monozygotes et de 50 % pour les jumeaux dizygotes, une forte contribution génétique est donc suggérée. De plus, le taux de discordance pourrait être la preuve que des facteurs environnementaux influenceraient aussi le développement de l'autisme.

De nombreuses études familiales, par la suite, ont pu appuyer l'existence de cette forte influence génétique. C'est le cas par exemple de l'étude menée par Ozonoff et al. qui a mis en évidence que le risque de développer l'autisme était augmenté de 20 à 50 fois pour un enfant qui a un frère ou une sœur autiste comparé à la population générale (Ozonoff et al., 2011). Une autre étude menée sur 5000 familles a également mis en évidence la contribution génétique en démontrant que le risque de récurrence des TSA chez les frères et sœurs d'un enfant atteint était deux fois plus important que chez les demi-frères et demi-sœurs (Constantino et al., 2013).

Plus récemment, des études de criblage et d'association, comprenant le séquençage d'exome du père, de la mère et de l'enfant atteint, a révélé que l'autisme est souvent due à l'apparition de CNV hérités ou *de novo* (non retrouvé chez les parents). Ils incluent des délétions ou des duplications de certaines régions de gènes. Les CNV *de novo* peuvent apparaître au cours du développement précoce du zygote ou dans les cellules germinales, particulièrement dans les gamètes de pères âgés (Kong et al., 2012 ; Neale et al., 2012). Dans le cas des CNV, l'hypothèse serait que l'autisme soit une résultante d'une diminution ou d'une augmentation d'expression d'un ou de plusieurs gènes sensible(s) au dosage qui résideraient dans la région touchée par la mutation CNV. Ces études ont permis de délimiter des régions chromosomiques de susceptibilité participant au développement des TSA. Les CNV peuvent concerner des zones aléatoires ou des zones bien définies dans certains locus. C'est le cas des duplications de la région 15q11-13, responsables de 2 % des cas de TSA ; et des délétions et duplications de la région 16p11, correspondant à environ 1 % des cas (Vorstman et al., 2006). De façon intéressante, la délétion de la région 16p11.2 est indépendamment associée à l'autisme et la macrocéphalie, alors que la duplication 16p11.2 est liée à la schizophrénie et la microcéphalie (Horev et al., 2011). De plus, les CNV dans la région 16p11.2 ont été impliqués dans le développement anatomique du cerveau, la déficience intellectuelle, les changements de comportement (hyperactivité, difficulté d'adaptation au changement), les problèmes de sommeil et les comportements restrictifs et

répétitifs. Les travaux de Vorstman et al. en 2006 ont ainsi récapitulé les régions chromosomiques impliquées dans les TSA et ont défini « les régions cytogénétiques d'intérêts » dans le génome humain (*Cytogenetic Regions Of Interest, CROIs*) pour faciliter la détection des gènes candidats. Ils confirment ainsi la présence de plusieurs régions à risque dans les TSA mais ont révélés aussi des nouveaux loci additionnels comme le 2q37, 5p15, 11q25, 16q22.3, 17p11.2, 18q21.1, 18q23, 22q11.2, 22q13.3 et Xp22.2–p22.3. Comme on peut le voir en Figure 2, les CROIs concernent tous les chromosomes.

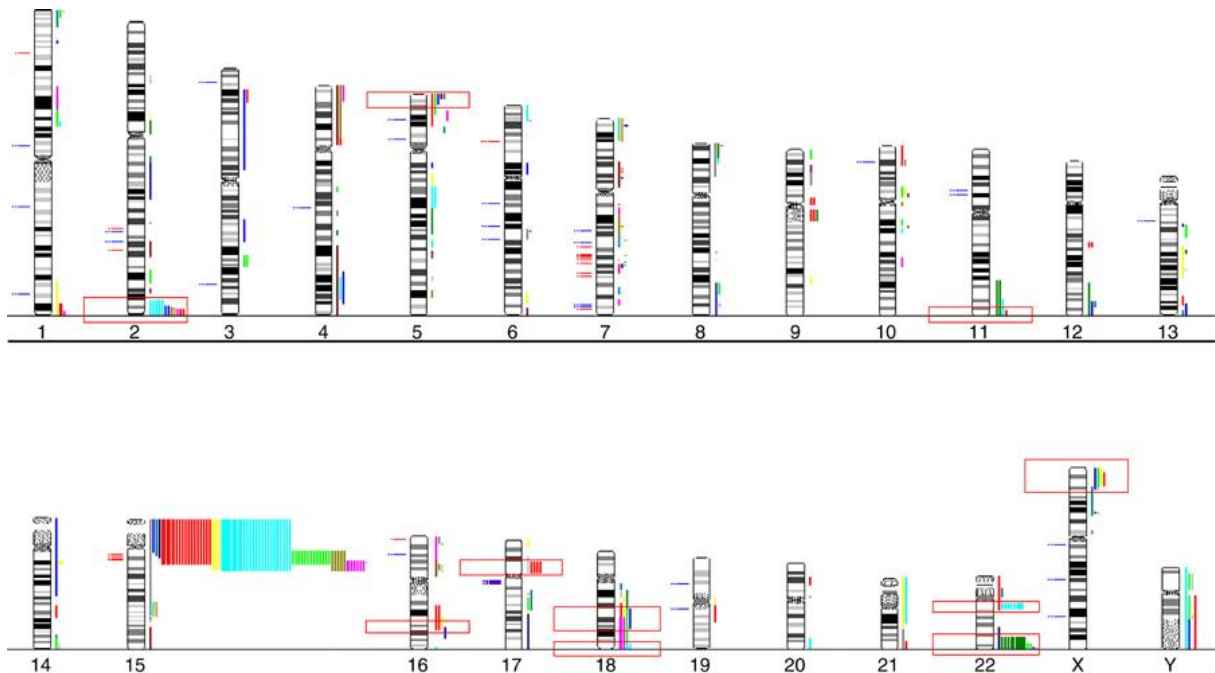


Figure 2 : Vue d'ensemble des régions cytogénétiques d'intérêts associées à l'autisme. Les résultats des études de liaisons et d'associations sont indiqués respectivement en bleu et en rouge sur le côté gauche de chaque chromosome. Sur le côté droit, les CROIs sont représentées par des barres colorées. Les loci entourés en rouge indiquent les nouvelles régions potentielles pour lesquelles plus de 4 reports de cas montrent un chevauchement au même locus. Issue de Vorstman et al., 2006.

Mis à part ces loci, les CNV peuvent concerner un seul gène spécifique. Ces CNV entraînent, dans ce cas, des désordres développementaux syndromiques très pénétrants et qui concernent environ 7 % des cas. Cela inclut le syndrome X fragile (*Fragile X syndrome, FXS*), la sclérose tubéreuse de Bourneville (*Tuberous sclerosis complex, TSC*), le syndrome d'Angelman, le Syndrome Timothy (*Timothy Syndrome, TS*), la neurofibromatose de type 1 (NF1), le syndrome de Rett (RTT) et le syndrome de Phelan-McDermid (*Phelan Mc-Dermid syndrome, PMS*) (Zoghbi and Bear, 2012). Chaque mutation est responsable en général de moins d'1 % des cas totaux (voir Tableau 2).

Cependant, malgré ces indications d'une forte implication génétique, on ne connaît la cause génétique que dans seulement 15 % des cas (Huguet et al., 2013). Ces causes génétiques sont d'ailleurs complexes : des centaines de gènes ont déjà été reliés à l'autisme et ce chiffre ne cesse d'augmenter (Betancur, 2011). Il est ainsi difficile de savoir si l'autisme est expliqué par des interactions multigéniques, ou par de rares mutations à impact majeur (State and Levitt, 2011).

Tableau 2 : Les différentes formes monogéniques d'autisme avec déficience intellectuelle. La prévalence des patients atteints de TSA (prévalence avec TSA) et la prévalence de chaque maladie dans les TSA (Prévalence dans les TSA) ont été reportées. Issu de Kelleher III and Bear, 2008.

Gène	Maladie	Prévalence avec TSA	Prévalence dans les TSA	Fonction du gène
<i>FMR1</i>	Syndrome X Fragile	15-30 %	2-5 %	Répresseur traductionnel
<i>TSC1/2</i>	Sclérose tubéreuse de Bourneville	25-60 %	1-4 %	Inhibiteur de mTOR
<i>PTEN</i>	Syndrome Cowden/Lhermitte-Duclos	Non déterminé	1 %	Inhibiteur de la voie PI3K/mTOR
<i>NF1</i>	Neurofibromatose de type 1	4 %	0-4 %	Ras GAP
<i>MECP2</i>	Syndrome de Rett	100 %	2 %	Répresseur transcriptionnel global
<i>UBE3A</i>	Syndrome d'Angelman	40 %	1 %	Ubiquitine ligase E3A
<i>CACNA1C</i>	Syndrome Timothy	60 %	<1 %	Canal calcique voltage dépendant de type-L (Ca _v 1.2)
<i>NLGN3/4</i>	TSA familial	Non déterminé	<1 %	Adhésion synaptique
<i>NRXN1</i>	TSA familial	Non déterminé	<1 %	Adhésion synaptique
<i>SHANK3</i>	TSA familial et Syndrome de Phelan McDermid	>50 %	>1 %	Protéine d'échafaudage synaptique

7. Le rôle de la synapse dans les TSA

Il est intéressant de noter que malgré cette forte hétérogénéité génétique et clinique, les gènes impliqués dans l'autisme font partis de réseaux fonctionnels communs. Ainsi, certaines voies biologiques communes ont émergées, donnant l'espoir de réduire l'apparente complexité des mécanismes à l'origine de l'autisme. O'Roak et al. ont démontré que 40 % des mutations *de novo* identifiées dans leur étude convergent vers le réseau d'interaction protéine/protéine beta-caténine/remodelage de la chromatine qui contrôle la différenciation neuronale et la formation synaptique (O'Roak et al., 2012). Iossifov et al. proposent quant à eux l'implication des gènes codant pour les protéines associées à la protéine FMRP du syndrome de X fragile, suggérant ainsi l'implication de la plasticité synaptique dans l'autisme (Iossifov et al., 2012). En accord avec les autres études, Neale et al. montrent également le rôle des gènes synaptiques dans l'autisme (Neale et al., 2012). Cependant d'autres études génétiques suggèrent l'implication de voies plus larges. C'est le cas de Pinto et al. qui ont démontré un enrichissement des gènes impliqués dans le

développement et la fonction des synapses, les gènes de la voie de signalisation Ras et en particulier les Rho GTPases impliquées dans la régulation des dendrites et la plasticité des épines dendritiques (Pinto et al., 2010). Glessner et al. décrivent quant à eux l'implication des réseaux d'adhésion cellulaire neuronale et des voies de dégradation liées à l'ubiquitine (Glessner et al., 2009). Levy et al. en 2011, avec une nouvelle méthode d'analyse de voies biologiques (*NETwork-Based Analysis of Genetic associations*, NETBAG) appliquée aux gènes touchés par des CNV rares *de novo*, ont également montré une convergence fonctionnelle, en particulier vers les voies impliquées dans la synaptogénèse, le guidage axonal et la motilité neuronale (Gilman et al., 2011 ; Levy et al., 2011). Sanders et al. suggèrent le rôle d'un déséquilibre de la balance Excitation/Inhibition (E/I) dans l'autisme par l'implication du gène *SCN2A* codant pour un canal à voltage dépendant au sodium (Sanders et al., 2012). De plus, l'implication de facteurs étiologiques dans la différenciation embryonnaire des neurones pyramidaux corticaux glutamatergiques a également été mis en évidence (Parikshak et al., 2013 ; Willsey et al., 2013).

Ces études indiquent donc vraisemblablement que l'autisme serait dû à différentes altérations dans la fonction synaptique et la plasticité, la connectivité ou le destin cellulaire. De manière globale, ces travaux soulignent le rôle central de la neurotransmission glutamatergique dans l'étiologie de l'autisme. Deux voies biologiques majeures semblent particulièrement importantes : la voie mTOR/PI3K d'une part, et le déséquilibre de la balance E/I dû à des mutations dans des gènes synaptiques d'autre part (Bourgeron, 2009).

a. Définition de la synapse excitatrice

La synapse excitatrice est un compartiment hautement spécialisé, au niveau neuronal, composé d'une région présynaptique et postsynaptique séparées d'une fente synaptique, pour laquelle les fonctions sont régulées spatialement et temporellement. Sa composition protéique et sa structure sont cruciales pour la fonction synaptique et l'habilité de l'organisme à répondre à son environnement. Par exemple, ses molécules d'adhésions cellulaires trans-synaptiques telles que les neurexines (NRXN) et les neuroligines (NLGN), modulent les étapes spécifiques de la formation, la spécialisation des compartiments pré et post synaptiques ainsi que la plasticité synaptique (processus de modification de la morphologie et/ou du nombre de synapses) induite en réponse à des stimuli sensoriels (Missler et al., 2012). Les postsynapses excitatrices sont formées essentiellement par une protusion membranaire à partir des dendrites appelée épine dendritique. Cette particularité est d'une grande importance car elle permet de constituer un micro-compartiment, relativement isolé de la dendrite, qui fonctionne comme une unité intégrative multifonctionnelle dynamique pouvant être régulé de manière fine morphologiquement (densité, volume, forme) et fonctionnellement (Newpher and Ehlers, 2009). La densité postsynaptique (*Postsynaptic Density*, PSD) est un élément de la synapse, se trouvant au centre de la tête de l'épine dendritique (Figure 3).

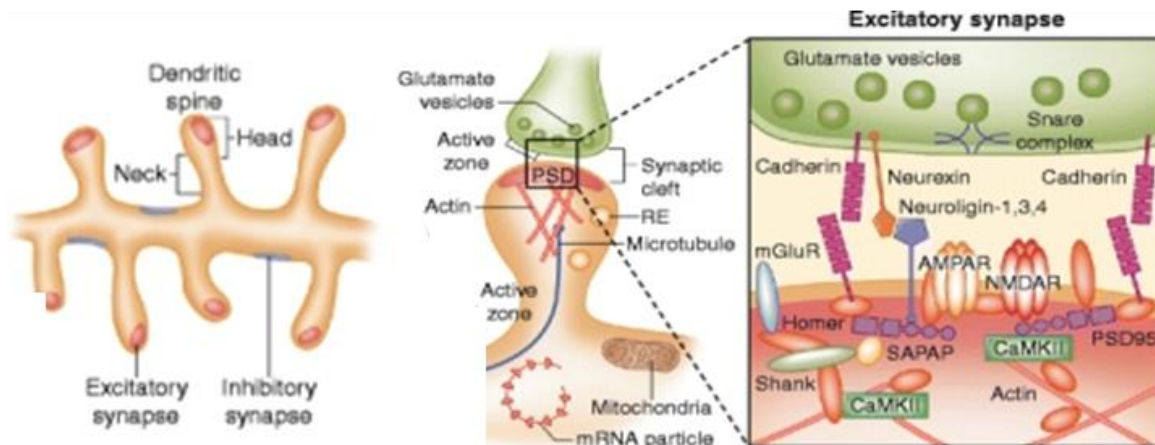


Figure 3 : Localisation et architecture moléculaire d'une synapse excitatrice et de sa PSD. Issue de van Spronsen and Hoogenraad, 2010.

Suite à une stimulation, l'influx nerveux est propagé le long d'un axone sous la forme de potentiels d'actions. Une fois arrivé au niveau de la terminaison synaptique, le potentiel d'action entraîne la dépolarisation de la membrane présynaptique. Ceci entraîne la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique et par conséquent la libération des neurotransmetteurs qu'elles contiennent au sein de la fente synaptique. Le glutamate est le plus commun neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des vertébrés (Crawford and Curtis, 1964). Après sa libération dans la fente synaptique, il peut se fixer sur deux catégories de récepteurs : les récepteurs ionotropiques, qui sont des récepteurs canaux tétramériques perméables aux cations ou les récepteurs métabotropiques qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G hétérotrimérique (Figure 4) (Simeone et al., 2004). L'activation de ces récepteurs mène à un flux de sodium et de calcium qui a pour effet la dépolarisation du neurone postsynaptique.

De façon générale, les récepteurs ionotropiques sont impliqués dans la transmission excitatrice rapide. Ils englobent les récepteurs à l'AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate), au NMDA et au Kainate. Les récepteurs à l'AMPA, localisés au niveau postsynaptique, sont responsables de la majorité de la transmission excitatrice rapide, et peuvent affecter la force de la réponse postsynaptique en étant dynamiquement insérés et enlevés de la membrane synaptique. Ces récepteurs, composés de différentes sous-unités, ont une composition variable qui impacte leur trafic et leur fonction (Greger and Esteban, 2007). Ils sont perméables essentiellement au sodium. Les récepteurs au Kainate, quant à eux, ont des rôles encore peu connus ; ils seraient impliqués dans la libération des neurotransmetteurs au niveau présynaptique et contribueraient aussi à la modulation des courants excitateurs au niveau postsynaptique (Lerma, 2003). Les récepteurs au NMDA sont également localisés au niveau présynaptique et postsynaptique. Ils sont composés de quatre sous-unités, constituées à partir de trois sous-types nommés NR1, NR2 et NR3. Les récepteurs au NMDA postsynaptiques sont impliqués dans la transmission synaptique excitatrice rapide avec les récepteurs à l'AMPA. De plus, par leur importante perméabilité au calcium, les récepteurs au NMDA jouent un rôle clé dans les phénomènes de plasticité synaptique et le développement neuronal.

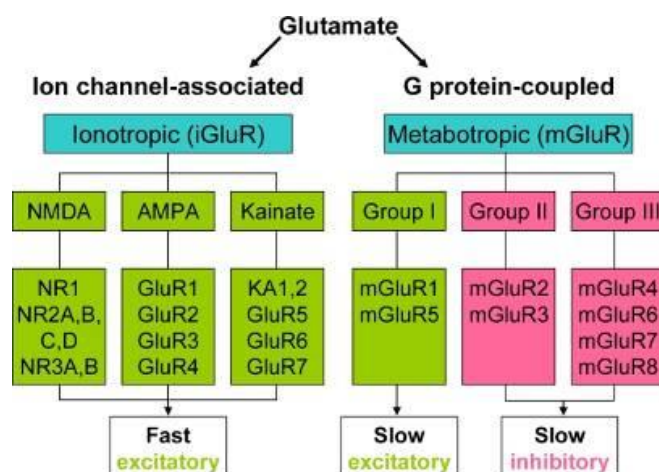


Figure 4 : Classification des différents récepteurs au glutamate. Issue de Blackshaw et al., 2011.

La plasticité synaptique à long terme est un mécanisme associé à un changement important et durable d'efficacité de la transmission synaptique excitatrice entre deux neurones. Dépendamment de la nature des stimuli, il y a deux formes de plasticité synaptique qui peuvent être induites au niveau des synapses : lorsque l'efficacité est augmentée, on parle de potentialisation à long terme (*Long-term potentiation*, LTP) alors que sa diminution est appelée dépression à long terme (*Long-term depression*, LTD) (Lüscher and Malenka, 2012). Ces phénomènes de plasticité synaptique font partie des principaux mécanismes moléculaires à la base de l'apprentissage et de la mémoire (Kandel, 2001). Durant les LTP, les épines dendritiques montrent une augmentation de leur densité, de leur taille (Toni et al., 1999) et du nombre de récepteurs postsynaptiques AMPA fonctionnels contenant les sous unités GluR1, résultant donc en une plus forte transmission synaptique (Nicoll and Malenka, 1999).

Il est important de noter qu'il existe d'autres types de LTP et de LTD qui sont indépendants des récepteurs au NMDA, comme ceux dépendants des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR). Les mGluR sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés à une protéine G intracellulaire hétérotrimérique et sont principalement impliqués dans la modulation lente de la transmission synaptique. La stimulation de ces récepteurs entraînera l'activation de leur protéine G associée, qui à leur tour activera des seconds messagers ou des canaux ioniques. Ils contiennent huit membres classés dans trois groupes (I, II et III) (Figure 4). Au niveau neuronal, les mGluR du groupe II et III sont principalement localisés en présynapse où ils jouent un rôle d'inhibiteur de libération de glutamate (Schoepp, 2001). Les mGluR du groupe I (mGluR1 et mGluR5), quant à eux, sont principalement localisés dans la postsynapse au niveau de la PSD où ils régulent l'excitabilité neuronale (Shigemoto et al., 1997).

b. La densité postsynaptique

La PSD est une structure spécialisée, dense en électrons, en dessous de la membrane postsynaptique des synapses excitatrices. Sa composition protéique, sa structure et son organisation est cruciale pour son bon fonctionnement et celui du neurone excitateur. Elle est composée de centaines de protéines comme des protéines structurales, des molécules d'adhésion

cellulaire, des molécules de signalisation, des protéines qui interagissent avec le cytosquelette d'actine (Adam and Matus, 1996), ainsi que des récepteurs répondant au glutamate (Ziff, 1997). Les protéines de signalisation incluent les kinases calcium/calmoduline-dépendante II (CamKII α et CamKII β) et la protéine d'échafaudage PSD-95, qui aide à organiser la synapse, connecter les récepteurs au glutamate avec les complexes cellulaires en aval et moduler la plasticité synaptique. D'autres protéines avec des fonctions d'échafaudage existent au sein de la PSD, incluant les GKAP (pour Guanylate Kinase-Associated Protein ou SAPAP), les protéines SHANK (ou ProSAPs) et les protéines HOMER qui favorisent la croissance des épines dendritiques, régulent l'activité synaptique et fixent les complexes de signalisation permettant de faire le lien entre la réponse synaptique et les stimuli sensoriels (Naisbitt et al., 1999; Sala et al., 2001). Le poids estimé des quatre protéines d'échafaudage PSD-95, GKAP, SHANK et HOMER serait de 27 % de la masse protéique totale dans la PSD (Sugiyama et al., 2005).

Ces protéines, interagissant les unes avec les autres, hiérarchisent l'ensemble et constituent une unité intégrative multifonctionnelle. En effet, bien que ces protéines soient différentes dans leur nature et leur fonction, leur association et leur régulation permettent un fonctionnement optimal des neurones au niveau de leur développement, de leur transmission et de leur plasticité synaptique. Ainsi, une mutation dans un gène qui code pour une de ces protéines entraînera un défaut d'interaction entre ses partenaires protéiques, une mauvaise localisation ou encore une dérégulation de celle-ci, qui engendrera une déstabilisation du complexe, pouvant être à l'origine de nombreuses pathologies neurologiques comme l'autisme, mais aussi la schizophrénie ou la démence. Les protéines d'échafaudage, comme SHANK3, qui permettent la hiérarchisation et la stabilisation de la PSD seront d'autant plus critiques pour un fonctionnement normal de la synapse.

c. Croissance synaptique/cellulaire anormale : mutations dans la voie mTOR/PI3K

L'hypothèse d'une croissance synaptique/cellulaire anormale pouvant augmenter le risque de développement de TSA, a été premièrement suggérée par l'observation récurrente de macrocéphalie dans 10 à 30 % des patients atteints d'autisme (Lainhart et al., 2006 ; Sacco et al., 2007). Cette hypertrophie du cerveau observée chez certains patients apparaît généralement pendant les quatre premières années et n'est typiquement pas présente à la naissance (Courchesne E et al., 2003 ; Dementieva et al., 2005). La macrocéphalie est observée dans certaines formes d'autisme non syndromiques et syndromiques (Williams et al., 2008) ; elle est notamment associée à la NF1, à la TSC, au FXS ou encore au syndrome Cowden/Lhermitte-Duclos. Par exemple pour NF1, entre 20 et 30 % des patients atteints ont une macrocéphalie associée (Clementi et al., 1999). La prévalence de macrocéphalie chez les adultes atteints du syndrome de Cowden est quant à elle de l'ordre de 80 % (Starink et al., 1986). Pour les enfants atteints du syndrome X fragile et d'autisme, une macrocéphalie relative est associée, avec une croissance accélérée de la circonférence crânienne jusqu'à 30 mois avec retour à des taux normaux autour de 60 mois (Chiu et al., 2007).

De plus, des études sur les souris montrent que la perte de Tsc1/Tsc2 pour la sclérose tubéreuse de Bourneville ou de la protéine PTEN (*Phosphatase and tensin homologue and chromosome TEN*)

pour le syndrome Cowden/Lhermitte-Duclos provoque une hypertrophie neuronale, associée à des défauts cognitifs et des déficits d'interaction sociale, qui peuvent être corrigés par la rapamycine, un inhibiteur spécifique du complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) (Kwon et al., 2006 ; Zhou et al., 2009). L'hypothèse étant que l'autisme serait dû à une taille et morphologie anormale des neurones (augmentation de la taille du soma et des épines dendritiques avec une diminution de leur densité pour des mutations sur TSC) par une hyperactivation de la voie PI3K/AKT et mTOR (Kwon et al., 2006 ; Tavazoie et al., 2005).

La voie mTOR reçoit des signaux des récepteurs NMDA, mGluR et du récepteur à activité tyrosine kinase RYK et est activée par la cascade de signalisation de kinase phosphoinositide-3 (PI3K). Le complexe mTORC1 active tout un mécanisme de traduction cap-dépendant, faisant intervenir les 4E-BPs (eIF4E-binding protein) et les eIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E) (Figure 5). Cette voie est très importante pour la synaptogénèse, la régulation des épines dendritiques ainsi que pour la plasticité synaptique à long terme, en jouant le rôle de régulateur central de la croissance cellulaire, de la prolifération, de la survie et de la traduction protéique (Hoeffler and Klann, 2010 ; Sawicka and Zukin, 2012).

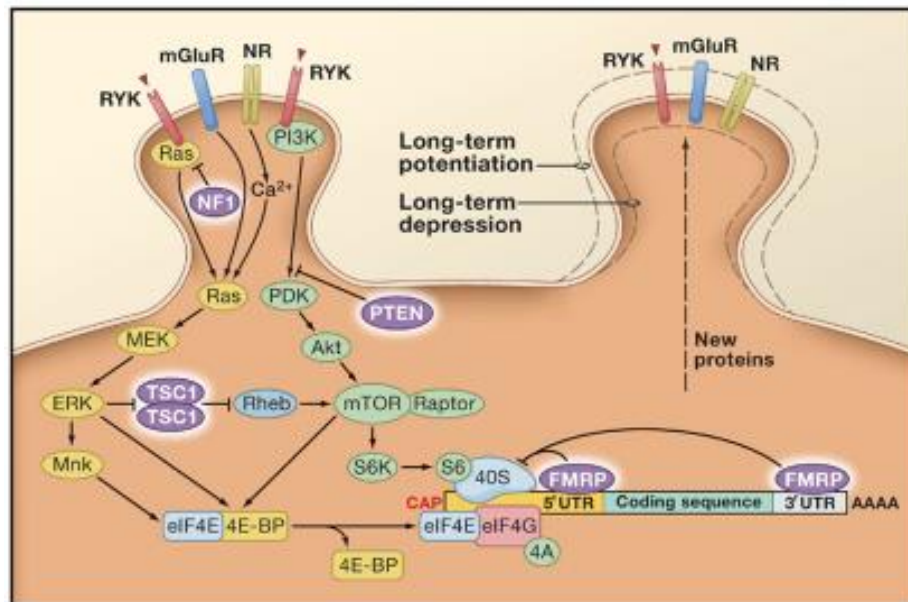


Figure 5 : Voie de signalisation neuronale de la régulation traductionnelle. Des mutations dans plusieurs gènes *TSC1/2*, *NF1* et *PTEN* ou sur *FRMI* sont responsables de désordres génétiques avec une haute prévalence d'autisme et des défauts cognitifs. Ces mutations causeraient une hyperactivation de la voie mTOR et un excès de traduction de protéines qui seraient un des mécanismes pathologiques menant aux TSA. Issue de Kelleher III and Bear, 2008.

L'hypothèse mécanistique serait que des mutations dans les gènes *TSC1/2*, *NF1*, *PTEN*, ou le gène *FMRI* provoquant la perte de la protéine FMRP, causeraient une hyperactivation de la voie mTORC1-eIF4E et mèneraient à des formes d'autisme syndromiques (Kelleher III and Bear, 2008). En effet, *TSC1/TSC2*, *NF1*, et *PTEN* sont des régulateurs négatifs du complexe mTORC1. Ainsi, des mutations dans ces gènes provoqueraient l'augmentation de l'activité de la voie mTOR en levant son inhibition (Figure 5). En effet, *NF1* code pour la neurofibromine, une protéine activatrice de GTPase, qui régule négativement la voie mTOR en ciblant RAS (Costa and Silva, 2003). La protéine *PTEN* codée par le gène du même nom est quant à elle une protéine

suppresseur de tumeur qui inhibe mTOR en ciblant PI3K (Sansal and Sellers, 2004). De plus, le lien entre FRM1 et mTOR a été observé dans un modèle de souris FXS dans lequel la voie mTOR est hyperactivée au niveau de l'hippocampe (Sharma et al., 2010) ; et confirmé chez l'homme, dans une étude portant sur des patients atteints de FXS et d'autisme pour lesquels la voie mTORC1-eIF4E était également hyperactivée dans leurs lymphocytes (Hoeffler et al., 2012).

Ainsi, l'augmentation de l'activité de la voie mTOR pourrait mener à une synthèse en excès de protéines à la synapse qui dérégulerait la prolifération et la survie cellulaire ainsi que la fonction synaptique (Kelleher III and Bear, 2008). De façon notable, d'autres études annexes ont appuyé le rôle de la voie mTOR dans l'autisme, en déterminant l'implication d'autres partenaires de la voie mTOR dans l'autisme. Ainsi, l'identification d'une mutation dans le promoteur du gène *EIF4E* chez des familles incluant plusieurs sujets atteints de TSA (Neves-Pereira et al., 2009) a permis de mettre en évidence que la dérégulation de la voie mTOR en aval peut être un mécanisme pour le développement de l'autisme. De plus, 4E-BP2 (ou Eif4ebp2), le répresseur d'EIF4E dans la cascade mTOR, est connu pour jouer un rôle important dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire (Banko et al., 2005). Gkogkas et al. ont reporté que la délétion du gène codant pour 4E-BP2 chez des souris mène à des comportements autistiques, incluant des défauts de communication et d'interaction sociale ainsi que des comportements répétitifs et stéréotypés. Ces souris présentent une augmentation de l'activité synaptique excitatrice, menant à un déséquilibre de la balance E/I, ainsi qu'une surexpression des protéines d'adhésion synaptiques NLGN. Des traitements par des inhibiteurs pharmacologiques d'EIF4E corrigent le déséquilibre E/I observé, diminuent le niveau de NLGN, ainsi que les problèmes sociaux chez les souris déficientes en 4E-BP2 (Gkogkas et al., 2013). De la même façon, une invalidation de NLGN1 par la technique d'ARN interférants (SiRNA) chez ces souris, permet également de corriger ces phénotypes. Cette étude a ainsi pu mettre en évidence le lien fort entre la dérégulation d'eIF4E, accompagnée de la surexpression de NLGN et du déséquilibre de la balance E/I, et le développement de l'autisme. Cette hypothèse que la dérégulation d'EIF4E est liée de façon causale aux TSA, est de plus supportée par un travail récent qui détermine que l'ARNm de CYFIP1 (Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1), un partenaire de EIF4E (Napoli et al., 2008), est réduit de façon significative chez des patients FXS par rapport à des individus contrôles (Nowicki et al., 2007).

d. La dysfonction synaptique et/ou le déséquilibre de la balance E/I

Le traitement des informations dans le cerveau nécessite un équilibre de fonctionnement de la transmission synaptique, et notamment un contrôle fin de la balance E/I, qui doit être maintenue constante. La transmission excitatrice est essentiellement permise par le glutamate, alors que la transmission inhibitrice par le GABA et la glycine. Cette balance E/I a été montrée pour réguler les périodes critiques du développement (Hensch, 2005). Un déséquilibre de celle-ci qui apparaîtrait tôt dans la vie postnatale de l'enfant pourrait donc avoir des effets néfastes sur de multiples domaines développementaux et pourrait induire des symptômes autistiques.

La possibilité que l'altération des fonctions synaptiques puisse mener au développement de TSA a été tout d'abord suggérée par l'observation que près d'1/3 des patients atteints d'autisme ont

également de l'épilepsie. L'épilepsie étant associée à une augmentation de la balance E/I, cela a conduit Rubenstein et Merzenich à faire l'hypothèse que certains cas d'autisme seraient dus à une augmentation de ce ratio qui altérerait la différenciation fonctionnelle des zones corticales et perturberait l'intégration des informations en termes de perception, mémoire, cognition et contrôle moteur (Rubenstein and Merzenich, 2003). Cette augmentation du ratio peut être due à un niveau d'excitation disproportionné par l'augmentation des courants glutamatergiques ou à l'inverse à une faible inhibition due à la réduction de la signalisation GABAergique. C'est le cas notamment pour le syndrome X-fragile. Depuis, plusieurs cas d'autisme ont été reliés, au contraire, à une diminution du rapport E/I, comme par exemple le syndrome de Rett. Ainsi, c'est le recoupement phénotypique entre l'autisme, le syndrome X fragile et le syndrome de Rett qui a fortement supporté cette hypothèse (Belmonte and Bourgeron, 2006 ; Zoghbi, 2003). De plus, l'observation que des enfants atteints de TSA montrent des élévations de l'activité neuronale à l'état de repos, supporte que le déséquilibre de la balance E/I est une caractéristique neurobiologique des TSA (Cornew et al., 2012).

Cette théorie a pu être confirmée par de nombreuses études portant sur des modèles animaux. Premièrement, une étude a montré que des modulations de la balance E/I, en utilisant des techniques optogénétiques, engendrent de façon directe des troubles de comportements sociaux de type autistiques chez la souris adulte (Yizhar et al., 2011), établissant le lien direct entre l'altération de la balance E/I et les TSA. De plus, plusieurs modèles d'autisme chez la souris montrent des déséquilibres de la balance E/I dues à une excitation glutamatergique ou une inhibition GABAergique altérée, menant à une augmentation (Bateup et al., 2011 ; Luikart et al., 2011) ou une diminution (Chao et al., 2010 ; Peça et al., 2011 ; Schmeisser et al., 2012 ; Won et al., 2012) du ratio E/I.

Enfin, des mutations dans des gènes impliqués dans l'expression de neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs ont été identifiées chez des individus atteints de TSA, comme par exemple, dans *SLC25A12* qui code pour un transporteur mitochondrial d'aspartate/glutamate (Ramos et al., 2004) ou encore dans des gènes codants pour certaines sous unités de récepteurs GABA (Collins et al., 2006), supportant l'hypothèse que l'autisme est lié à un défaut de transmission synaptique.

La balance E/I est largement contrôlée par l'expression de gènes importants pour la synapse (Levinson and El-Husseini, 2005). Ces gènes codent pour des protéines qui ont des rôles clés dans la régulation des réponses synaptiques et qui sont elles mêmes modulées par l'activité neuronale. Une mutation dans un de ces gènes peut donc résulter en un défaut dans la formation des synapses, ou dans ses propriétés physiologiques, pouvant directement impacter la balance E/I. L'hypothèse synaptique a ainsi été confirmée par l'identification de mutations responsables de formes d'autisme dans de multiples gènes synaptiques, incluant des gènes de l'adhésion cellulaire comme les membres des *NLGN* (Jamain et al., 2003 ; Laumonnier et al., 2004), des *NRXN* (Szatmari et al., 2007), et des composants de la PSD comme *PSD-95* ou la famille des *SHANK*. Ces mutations peuvent aussi bien augmenter ou réduire les courants excitateurs que les courants inhibiteurs. Les neurexines présynaptiques et les neuroligines postsynaptiques étant directement rattachées à la plateforme SHANK via des interactions protéiques, une voie synaptique NRXN-

NLGN-SHANK a été proposée comme pouvant être responsable du développement de nombreux cas d'autisme (Bourgeron, 2009).

Des mutations dans les gènes *NLGN* ont été retrouvées chez des patients atteints d'autisme et du syndrome Asperger (Jamain et al., 2003 ; Laumonnier et al., 2004), incluant des mutations dans *NLGN3* et *NLGN4*. La manipulation génétique des *NLGN* a montré le développement de phénotypes de type TSA avec une altération de la balance E/I dans des modèles de souris. Par exemple la *NLGN1* favorise la transmission synaptique excitatrice (Kwon et al., 2012) alors qu'une mutation du gène *NLGN3* augmente la transmission synaptique inhibitrice, sans modifier la transmission excitatrice (Tabuchi et al., 2007).

SHANK3 a été fortement relié à l'autisme, que ce soit par la découverte de nombreuses mutations chez les patients atteints de TSA ou l'étude de modèles animaux. A l'inverse des modèles déficients en *NLGN3*, les souris homozygotes pour *SHANK3* montrent une réduction de la fréquence et de l'amplitude de leurs courants excitateurs postsynaptiques (Peça et al., 2011). Une observation qui n'est pas étonnante du fait du rôle essentiel de SHANK3 dans la régulation de l'expression et de la signalisation des récepteurs au glutamate (voir partie III).

De plus, une étude préliminaire sur un modèle animal suggère un lien entre des variations du gène *DLG4* codant pour PSD-95 et les TSA (Feyder et al., 2010). En effet les souris *DLG4*^{-/-} montrent des symptômes complexes de types autistiques, comme des comportements répétitifs anormaux, des problèmes de communication, des problèmes de coordination motrice et une augmentation de l'anxiété. De plus, des altérations dans l'expression de PSD-95 ont été observées dans un modèle de souris du syndrome X fragile (Muddashetty et al., 2007). Prange et al. ont pu corrélérer la surexpression ou l'inactivation de PSD-95 avec respectivement une augmentation ou une diminution du ratio E/I (Prange et al., 2004). Il est à noter également que des polymorphismes dans le promoteur du gène *DLG4* ainsi qu'un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en 3'UTR ont été retrouvés chez des sujets schizophrènes, suggérant que PSD-95 est un facteur de risque pour le développement de cette maladie (Cheng et al., 2010). Enfin, des études *post mortem* ont révélé une altération de l'expression de PSD-95 dans différentes régions du cerveau de patients schizophrènes (Toro and Deakin, 2005).

Des délétions et mutations ponctuelles sur la *Neurexine 1 (NRXN1)*, qui se lie aux neuroligines, ont également été associées à l'autisme. En effet, deux variants structuraux faux sens potentiels ont été identifiés dans le gène *NRXN1β* chez 4 sujets atteints d'autisme. Ces variants, n'étant pas présents dans les 535 contrôles utilisés pour l'étude, contribueraient au développement des TSA (Feng et al., 2006). De même, à partir d'une cohorte de 116 patients atteints, cinq variants spécifiques structuraux (dont une mutation prédictive sur un site d'épissage) ont été identifiés dans le gène *NRXN1α* (Yan et al., 2008). Une délétion hétérozygote de 300 kb sur le gène *NRXN1*, non détectée chez les parents sains, a également été retrouvée chez deux sœurs atteintes (Szatmari et al., 2007). Trois sujets additionnels atteints de TSA avec des délétions sur *NRXN1* ont été par la suite rapportés, confirmant le rôle de la *NRXN1* dans l'autisme (Ching et al., 2010). De façon notable, des polymorphismes ont également été découverts sur *CNTNAP2* (Contactin-Associated Protein-like 2), un membre de la superfamille des neurexines, supportant, de manière indirecte, le lien existant entre les NRXN et les TSA (Arking et al., 2008).

L'autisme semble donc associé à différents types de déséquilibres du ratio E/I rendant complexe la compréhension de la pathologie et surtout la découverte et la prescription de médicaments aux différents groupes de patients. Il est clair que selon les mutations des patients, les problèmes moléculaires induits sur la transmission synaptique seront complètement différents et les besoins thérapeutiques devront être adaptés. Mais de façon évidente, ce réseau commun synaptique semble être majoritairement impliqué dans le développement des TSA et ouvre la voie sur la compréhension de cette pathologie complexe. La recherche de biomarqueurs spécifiques dans ce réseau pourrait rendre envisageable le traitement personnalisé de ces patients. L'étude de formes monogéniques d'autisme qui s'inscrivent dans ces réseaux communs semble être la clé pour une meilleure compréhension de cette pathologie et la recherche de thérapeutiques.

8. Modèles de souris pour les TSA

Les souris génétiquement modifiées sont des outils utiles pour rechercher la fonction d'un gène et mieux comprendre la physiopathologie de la maladie d'intérêt. Il existe des modèles animaux pour l'étude des formes monogéniques rares d'autisme, associées à une mutation donnée, qui récapitulent très bien la maladie. C'est le cas par exemple des souris pour les mutations *PTEN*, *TSC*, *FMRI*, *MECP2*, *SHANK*, *NLGN*, *NRXN*... En règle générale, la caractérisation de ces modèles permet de visualiser des défauts d'interaction sociale (interaction libre et en cage, avec des souris de même sexe ou de sexe opposé), de communication (vocalisations ultrasoniques) et des comportements répétitifs (excès de toilettage, sauts, enterrement de billes) qui a permis de confirmer l'implication de ces gènes dans l'autisme. Des modèles de souris comme *FRMI* ou *SHANK2* peuvent aussi présenter des comportements hyperactifs (symptômes également retrouvés chez de nombreux individus atteints de TSA). Au niveau cellulaire et moléculaire, ces modèles animaux ont permis d'identifier des défauts permettant de mieux comprendre les causes et conséquences de cette maladie. Selon les modèles on peut observer des diminutions ou des augmentations de la densité synaptique : une réduction des dendrites est observée dans les modèles de syndrome de Rett, de *SHANK3* et de la sclérose tubéreuse de Bourneville, alors que l'effet inverse est visualisé dans les modèles du syndrome X fragile. Concernant l'activité neuronale, les mêmes observations paradoxales ont été retrouvées : certains modèles d'autisme voient leurs courants excitateurs ou inhibiteurs augmenter ou diminuer.

Ainsi, des études sur ces modèles ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'autisme, et surtout répondre à la problématique de développer de nouveaux composés thérapeutiques (Bozdagi et al., 2013 ; Michalon et al., 2012). Des traitements chimiques ou la réintroduction du gène déficient ont permis de corriger les phénotypes autistiques chez ces souris (Delorme et al., 2013), suggérant que l'autisme est soignable au moins dans certains cas, et que les gènes responsables ne jouent pas un rôle central dans le développement du cerveau mais plutôt dans la maintenance des fonctions neurologiques une fois le développement terminé (Baudouin et al., 2012). Ces nouvelles molécules thérapeutiques ont fait l'objet de premiers essais cliniques, certains montrant des résultats encourageants et d'autres décevants.

9. Nouvelles stratégies pour les TSA

Pour résumer cette première partie, aucun traitement pour l'autisme n'existe encore, les médicaments prescrits ne limitant que les symptômes associés. Les TSA regroupent des patients avec une grande hétérogénéité clinique et étiologique rendant difficile la compréhension de la pathologie et freinant les avancées thérapeutiques. Face à cette hétérogénéité, l'idée que les causes de l'autisme puissent être différentes d'un individu à l'autre émerge. Le concept d'un traitement unique pour la totalité des patients semble donc de moins en moins pertinent. En revanche, des mécanismes communs pathologiques semblent exister et pourraient regrouper des sous types de patients autistes. C'est pourquoi le recoupement des recherches mécanistiques et thérapeutiques sur des formes rares d'autisme semble être une bonne approche. Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier les formes génétiques d'autisme impliquant SHANK3, car elles concernent un nombre de cas significatif d'autisme, et les phénotypes associés sont souvent sévères et très pénétrants. De plus, le rôle central de SHANK3 dans la synapse fait de lui une bonne cible pour étudier l'impact d'une dérégulation synaptique sur le ratio E/I et la recherche de composés pour le réseau commun synaptique NRXN-NLGN-ProSAP/SHANK probablement dérégulé dans l'autisme (Bourgeron, 2009). La stratégie menée sur des modèles de souris pour des formes monogéniques d'autisme a déjà fait ses preuves et a permis de découvrir de nouveaux médicaments plus personnalisés. Néanmoins, ils sont toujours en cours de développement, et un besoin urgent en nouveaux composés se fait toujours ressentir.

a. Limites des études sur l'autisme

De par l'existence de différences entre la souris et l'homme, que ce soit du point de vue fond génétique, complexité de régulation des gènes et protéines, développement neural ou encore composition du cerveau, le modèle animal apporte forcément un biais à la compréhension de la physiopathologie de l'autisme chez l'humain et la découverte de nouveaux médicaments. De plus, l'autisme est une pathologie très complexe, avec des comportements humains spécifiques, rendant la modélisation animale difficile. Enfin les modèles animaux ne sont pas compatibles avec le criblage pharmacologique, compliquant le processus de recherche de nouveaux composés thérapeutiques à large échelle.

Les avancées en neuro-imagerie et les études *post mortem* ont donnés des indications cruciales quant au phénotype du cerveau autiste. Néanmoins il est difficile dans ces cas là de faire la distinction entre les causes et les conséquences, et ces études n'offrent souvent qu'une idée vague de la pathologie. De plus, les observations ne peuvent être faites que tardivement (après le diagnostic ou après la mort du patient), alors que l'autisme est une pathologie neuro-développementale. Enfin, les cerveaux *post mortem* sont difficiles à obtenir, ralentissant les découvertes sur le sujet.

Le développement de nouveaux modèles humains d'autisme grâce à la technologie des cellules souches embryonnaires humaines (*Human embryonic stem cells*, hESC) ou des cellules souches induites à la pluripotence humaines (*Human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) pourrait être une alternative à ces limites. Elles offrent en effet l'opportunité de travailler sur un fond génétique humain. De plus, l'avantage de pluripotence de ces cellules nous permet de les différencier en neurones, le type cellulaire d'intérêt atteint dans la pathologie et donne la chance de récapituler

dans une « boîte de culture » le développement neuronal (stade durant lequel la maladie se déclare). Les hiPSC sont très prometteuses car elles offriraient la chance d'étudier des neurones avec la signature génétique de patients atteints d'autisme à partir d'une simple biopsie (de peau, sang ou cheveux) et de déterminer les événements anormaux développementaux causals de la pathologie. Ayant le tableau clinique des patients, le grand avantage des hiPSC est également de pouvoir relier les symptômes, aux caractéristiques génétiques et moléculaires découvertes *in vitro*. Ainsi, les hiPSC devraient permettre d'examiner comment et pourquoi les aberrations dans la structure et la composition du cerveau humain se développent initialement. La technologie des hiPSC étant encore relativement récente et peu maîtrisée, les études se réalisent préférentiellement sur hESC. Cette nouvelle technologie offre aussi la possibilité de cribler des molécules chimiques sur le type cellulaire d'intérêt pour la maladie, les neurones, ce qui n'était jusque-là pas encore possible. Après quelques notions sur le criblage et le déroulement de la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, je développerai le concept des cellules souches pluripotentes et leur nombreux avantages.

b. Criblage à haut débit pour la découverte de médicaments

Le criblage à haut débit (*High Throughput Screening*, HTS) est souvent la première étape critique dans la découverte d'un médicament (Figure 6). Cette technique a été permise grâce à la robotisation et la miniaturisation des tests *in vitro* sur des modèles cellulaires. Elle consiste à tester de manière automatisée un large nombre de composés chimiques divers pour identifier des hits candidats qui seraient efficaces sur un biomarqueur d'intérêt pharmacologique ou un phénotype donné. Initialement réservé à l'industrie pharmaceutique, le criblage HTS devient progressivement accessible aux laboratoires académiques, avec l'émergence de plateformes techniques (Figure 7), malgré son coût qui reste relativement conséquent (~1€ par molécule testée) (Malo et al., 2006).

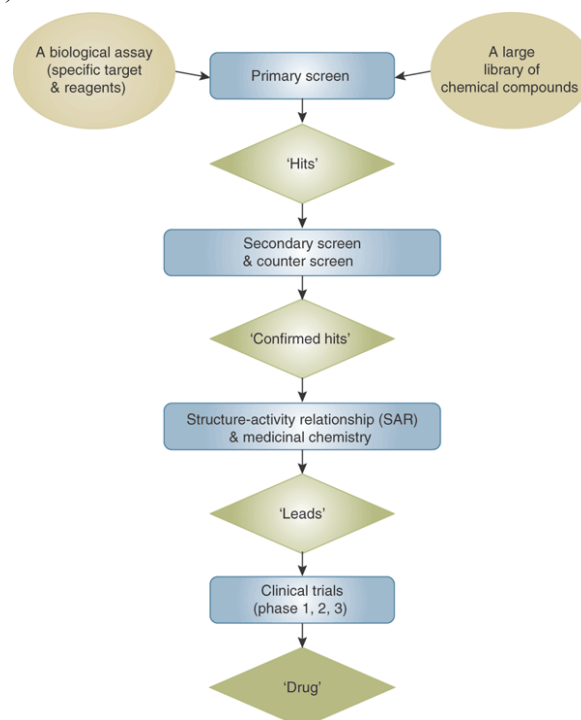


Figure 6 : Le processus du HTS pour la découverte d'un médicament. Issue de Malo et al., 2006.

La mise en œuvre d'une stratégie HTS repose sur deux critères principaux : le choix des composés chimiques à cribler et la mise en place d'un test biologique approprié. Une fois que celle-ci aura été optimisée, la première étape, appelée criblage primaire, pourra être réalisée.



Figure 7 : Aperçu d'une plateforme de criblage haut débit robotisée et d'une plaque 384 puits. Photos prise de la plateforme Biocell à I-STEM.

❖ Les composés chimiques à tester

Ces molécules sont généralement regroupées dans un ensemble appelé chimiothèque. Le criblage peut être basé sur l'utilisation de molécules chimiques néo-synthétisées et non optimisées pour la délivrance en clinique, dites composés leader ou « lead compounds » (criblage *de novo*) ou de composés possédant déjà une AMM pour une autre indication thérapeutique (criblage de repositionnement). Pour le criblage *de novo*, l'avantage majeur est de tester des composés de grande diversité moléculaire sans à priori, et d'accroître la probabilité d'identifier des molécules actives avec une structure nouvelle non prédite. Concernant le criblage de repositionnement, l'intérêt majeur est d'essayer de réduire la durée et les coûts de recherche et développement pour la commercialisation d'un médicament. En effet, ces molécules ont souvent déjà des profils pharmacocinétiques et toxicologiques connus puisqu'ils ont déjà fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ; et ont déjà été validées par des organismes de contrôle tels que la FDA ou l'agence européenne des médicaments (Ashburn and Thor, 2004). Ainsi, près de 5000 composés commerciaux sont disponibles. S'ajoute à ceux-là près de 3000 composés « en attente » jugés non commercialement attractifs ou pas assez efficaces en essai clinique de phase II ou III.

Pour le criblage effectué pendant ma thèse, nous avons choisi d'utiliser les deux stratégies en utilisant des molécules chimiques non délivrables mais dont le mécanisme d'action était déjà connu, ainsi que des molécules thérapeutiques déjà mises sur le marché. Cette double stratégie visait à découvrir, d'une part des nouvelles voies de régulation de notre gène d'intérêt (très utiles pour la recherche fondamentale), et d'autre part à apporter de nouvelles solutions thérapeutiques pour l'autisme de façon plus rapide et moins coûteuse.

❖ La mise en place d'un test biologique approprié

Ce test avec détection d'une cible correspond généralement à un gène, une protéine ou un phénotype lié à une maladie. Il est important de concevoir des tests qui permettent de mesurer l'effet des composés sur cette cible, de manière sensible, spécifique et reproductible mais aussi de façon simple, rentable et automatisée. Ainsi la culture cellulaire et les tests sont réalisés dans des

formats de plaques miniaturisés de 96, 384 ou 1536 puits. L'identification et la validation de contrôles positifs et négatifs est quant à elle très importante pour évaluer la variabilité des données (intra et inter-plaque). Ces deux contrôles sont d'autant plus importants qu'ils permettent de calculer le facteur Z' , pour valider le test en matière de fiabilité et de robustesse (Zhang et al., 1999).

Parmi les différentes technologies employées, on peut citer principalement des tests impliquant la fluorescence, la luminescence, la radiométrie ou l'absorbance. Récemment la technologie de RT-qPCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) a également pu être développée au HTS. C'est cette dernière technique qui a été choisie comme test de HTS primaire pour ma thèse. Cette méthode de criblage à haut débit utilisant la RT-qPCR a l'avantage de mesurer précisément et directement l'effet de composés sur les niveaux d'expression d'ARNm natifs d'un gène d'intérêt dans une population cellulaire. Elle est donc bien plus rapide à mettre en place et est biologiquement plus pertinente qu'une population cellulaire modifiée avec système de gènes rapporteurs (Bittker, 2012). Jusqu'à récemment, le prix et le débit limitait l'utilisation de la RT-qPCR comme méthode d'HTS primaire. Mais il existe désormais des kits avec des réactifs standards qui permettent la miniaturisation et l'exécution rapide de RT-qPCR d'une manière robuste et rentable (et donc de façon compatible au HTS) de cellules cultivées en plaque 96, 384 ou 1536 puits. Le choix du kit commercial dépend tout d'abord du type de cellules à analyser (adhérentes ou en suspension) et de la technique d'isolation de l'ARN et de rétrotranscription. La méthode la plus simple consiste à procéder directement à l'analyse RT-qPCR à partir du lysat cellulaire (one-step RT-qPCR) (Figure 8). Nous avons choisi dans ce travail de thèse le kit one-step RT-qPCR FastLane commercialisé par Qiagen, mais il en existe d'autres comme le Cells-to-Ct d'Applied Biosystems ou le RealTime ready cell lysis & transcriptor cDNA de Roche.

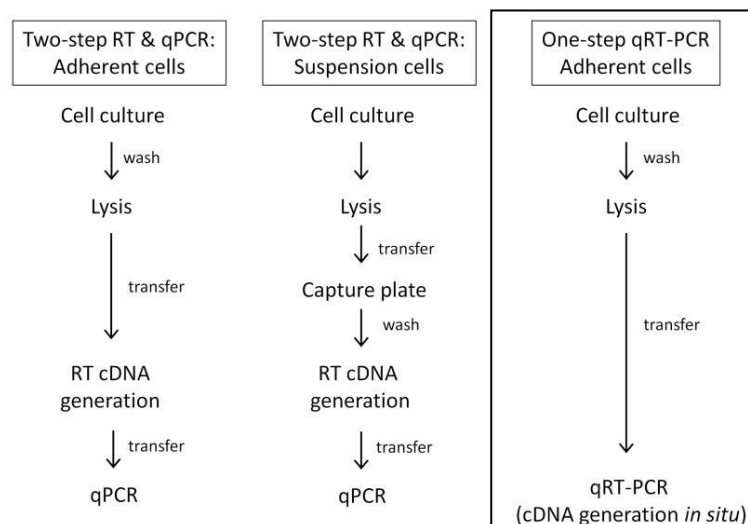


Figure 8 : Les différents protocoles de RT-qPCR pour le HTS selon le type cellulaire et la méthode de purification d'ARN et de rétrotranscription. La méthode encadrée a été choisie pour la thèse. Issue de Bittker, 2012.

Pour détecter les variations dues aux effets non spécifiques (toxicité, variations d'ensemencement, etc.), le niveau d'expression du gène d'intérêt doit être normalisé à un gène de contrôle, ou gène de ménage (Schmittgen and Livak, 2008). Idéalement, pour une normalisation robuste, le niveau

d'expression du gène de ménage doit être similaire à celui du gène cible. De plus, il est préférable de mesurer le gène de contrôle et le gène cible dans la même réaction en utilisant des sondes multiplexes composées de fluorophores différents, afin de réduire toute variabilité entre le contrôle et le gène cible qui serait due à une erreur de pipetage. En effet, deux méthodes existent pour la quantification du signal fluorescent qui est directement corrélée à la quantité du gène d'intérêt. Il peut être généré soit par un agent intercalant général (Sybr green), soit par une sonde fluorescente reliée à un quencher qui reconnaît une séquence spécifique d'ADN (Taqman) (Ginzinger, 2002). Pour le Sybr green, il est donc nécessaire de faire autant de réaction de qPCR qu'il y a de gènes à quantifier, puisque l'agent intercalant ne fait pas de distinction entre les produits PCR générés. Au contraire l'utilisation de sondes, avec différents fluorophores spécifiques de chaque gène, offre en plus d'une meilleure spécificité de signal, l'opportunité d'analyser plusieurs gènes simultanément dans une même réaction. Ainsi cette méthode multiplexe a l'avantage d'être plus facile, plus rapide d'exécution, et plus fiable en fournissant une meilleure normalisation avec le gène de contrôle.

Pour déterminer l'effet des composés, la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est généralement utilisée (Schmittgen and Livak, 2008). C'est à dire que le delta d'expression ($\Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de ménage}}$) pour chaque condition est rapporté à l'expression d'une condition contrôle (non traitée ou au DMSO) ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condition contrôle}} - \Delta Ct_{\text{condition}}$). Le ratio de l'expression du gène d'intérêt est ainsi calculé pour chaque condition par la formule suivante : $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Il s'agit ensuite d'établir un seuil arbitraire qui déterminera les composés à retenir pour des criblages secondaires. Les seuils des hits sont généralement définis en multipliant par 2 ou par 3 le nombre de déviations standards de la moyenne des données contrôles (Malo et al., 2006). Il est admis que la valeur du seuil des hits influe directement sur le taux de faux-positifs et le taux de faux négatifs : si la valeur est basse on limitera les faux négatifs mais on augmentera le nombre de faux positifs et inversement pour une valeur haute. Les faux positifs sont des composés qui ont été sélectionnés lors du criblage mais qui n'ont en fait pas d'effet sur la cible alors que les faux négatifs sont des composés actifs mais qui n'ont pas été détecté lors du criblage. Les composés sont habituellement testés à une concentration fixe en monoplicat. Du fait des incertitudes sur la concentration du composé, de la dispersion du signal du test biologique et des problèmes techniques divers (erreur de pipetage, d'ensemencement, etc.), les faux positifs et faux négatifs sont estimés à 5-15 % selon le test (Hüser et al., 2006). Pour pallier ce problème, les chimiothèques contiennent souvent de nombreux composés structurellement similaires ou appartenant à la même famille, permettant ainsi de diminuer le risque de rater une famille de candidat. Alors que l'augmentation du nombre de réplicats pourrait aider à diminuer la variabilité du test et le nombre de faux positifs et négatifs générés, elle augmente aussi de façon très conséquente le prix du criblage.

Les hits sortis du criblage primaire, qui ont une activité positive sur la cible, feront ensuite l'objet d'un criblage secondaire pour retester et confirmer leur activité selon le même test biologique. Cette étape a pour but de s'affranchir des faux positifs issus du criblage primaire. Des expériences de doses réponses sont réalisées pour déterminer la concentration optimale du composé.

Plusieurs contre-tests (ou tests secondaires) vont ensuite permettre de démontrer la spécificité des hits vis-à-vis de la cible par d'autres tests biologiques, plus forcément miniaturisés et automatisés, afin de déterminer le potentiel thérapeutique des composés découverts. Dans cette thèse j'ai utilisé le criblage à haut contenu (*High Content Screening*, HCS) pour réaliser les tests biologiques secondaires, avec des tests d'immuno-marquage et de flux calcique.

Le HCS a connu un essor rapide ces dernières années. Contrairement au HTS qui met en jeu la lecture d'un signal dit uniforme (une seule lecture très rapide par puits représentant une moyenne de la population cellulaire), le HCS implique l'acquisition et l'analyse de plusieurs images prises dans chaque puits. Cette technologie permet la mesure de plusieurs marquages fluorescents en parallèle et l'accumulation d'un grand nombre de caractéristiques propres à chacune des cellules. Comme le débit est néanmoins beaucoup moins élevé qu'en HTS, le HCS est plus souvent choisi comme test secondaire comme ce fut le cas dans ce travail.

Après les tests secondaires, d'autres études complémentaires permettront de déterminer les relations structures/activités de ces molécules, de déterminer leur mode d'action et d'analyser leurs propriétés médicinales (ADMET pour Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité). Finalement, ces molécules feront l'objet de tests *in vivo* dans des modèles animaux avant d'être testées chez l'Homme dans le cadre contrôlé d'essais cliniques (Phase I, II et III) et de recevoir l'AMM en cas de succès.

II. Les cellules souches pluripotentes

1. Définition

Les cellules souches pluripotentes ont deux caractéristiques principales qui font d'elles un type cellulaire très avantageux : l'autorenouvellement et la pluripotence. En effet, les cellules souches ont, en condition physiologique, la capacité de se diviser de manière illimitée, en conservant leurs caractéristiques génétiques et épigénétiques. Ce potentiel est donc très utile pour produire de grandes quantités de cellules, propriété indispensable pour faire du criblage thérapeutique par exemple. La seconde caractéristique des cellules souches est leur pluripotence, c'est-à-dire leur capacité à s'engager dans différentes voies de différenciation et par conséquent à former différentes cellules spécialisées. Elles offrent ainsi l'opportunité d'étudier les processus physiologiques ou pathologiques au cours du développement, en décodant les mécanismes moléculaires associés à la mise en place de la maladie.

Il existe différentes catégories de cellules souches (Figure 9), classées en fonction de leur capacité de différenciation :

- **Les cellules souches totipotentes**, qui possèdent la plus grande capacité de différenciation en étant capables de produire tous les lignages embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) ainsi que les lignages extra-embryonnaires (placenta et cordon ombilical)
- **Les cellules souches pluripotentes** (cellules filles des cellules souches totipotentes), qui sont capables de produire l'ensemble des lignages embryonnaires, y compris les lignées germinales, à l'exception des annexes extra-embryonnaires. Les cellules souches totipotentes et pluripotentes sont ainsi capables de générer l'ensemble des cellules d'un organisme, soit pour l'Homme plus de 200 types cellulaires différents
- **Les cellules souches multipotentes**, qui ont gardé leur capacité d'autorenouvellement, mais ont une aptitude de différenciation plus restreinte (au tissu d'origine), étant déjà engagées dans une voie de différenciation. Ces cellules dites multipotentes sont en général capables de produire au moins quatre progénies cellulaires distinctes. Les termes de cellules unipotentes, bipotentes ou tripotentes seront plutôt utilisés pour définir des cellules souches présentant des capacités de différenciation restreintes respectivement à une, deux, ou trois progénies cellulaires.

Chez l'adulte, la présence de cellules souches multipotentes a été montrée dans la plupart des tissus (moelle osseuse, peau, muscle, cerveau, intestin...) constituant un réservoir permettant de former/renouveler un tissu ou de le réparer après une lésion. On peut citer par exemple les cellules souches mésenchymateuses, les cellules souches hématopoïétiques (Adams and Scadden, 2006) ou encore les cellules souches neurales de la zone sous ventriculaire (ZSV). Ces dernières sont capables *in vitro* de former des neurones, des astrocytes ou des oligodendrocytes (Doetsch, 2003 ; Reynolds and Weiss, 1992). Il existe également des cellules souches à capacités de différenciation

plus restreintes, comme les cellules souches du bulbe folliculaire du cheveu (Blanpain and Fuchs, 2006), ou les cellules satellites du muscle squelettique (Dhawan and Rando, 2005).

Les cellules souches multipotentes neurales adultes ayant une capacité de différenciation limitée, et étant peu faciles d'accès (à l'exception des cellules souches olfactives (Féron et al., 2013)), les cellules souches pluripotentes humaines (*Human Pluripotent Stem Cells*, hPSC) sont préférentiellement utilisées en recherche. Deux sources seulement d'hPSC sont connues à ce jour : les cellules souches embryonnaires (*embryonic stem cells*, ESC) et les cellules souches induites à la pluripotence (*induced pluripotent stem cells*, iPSC).

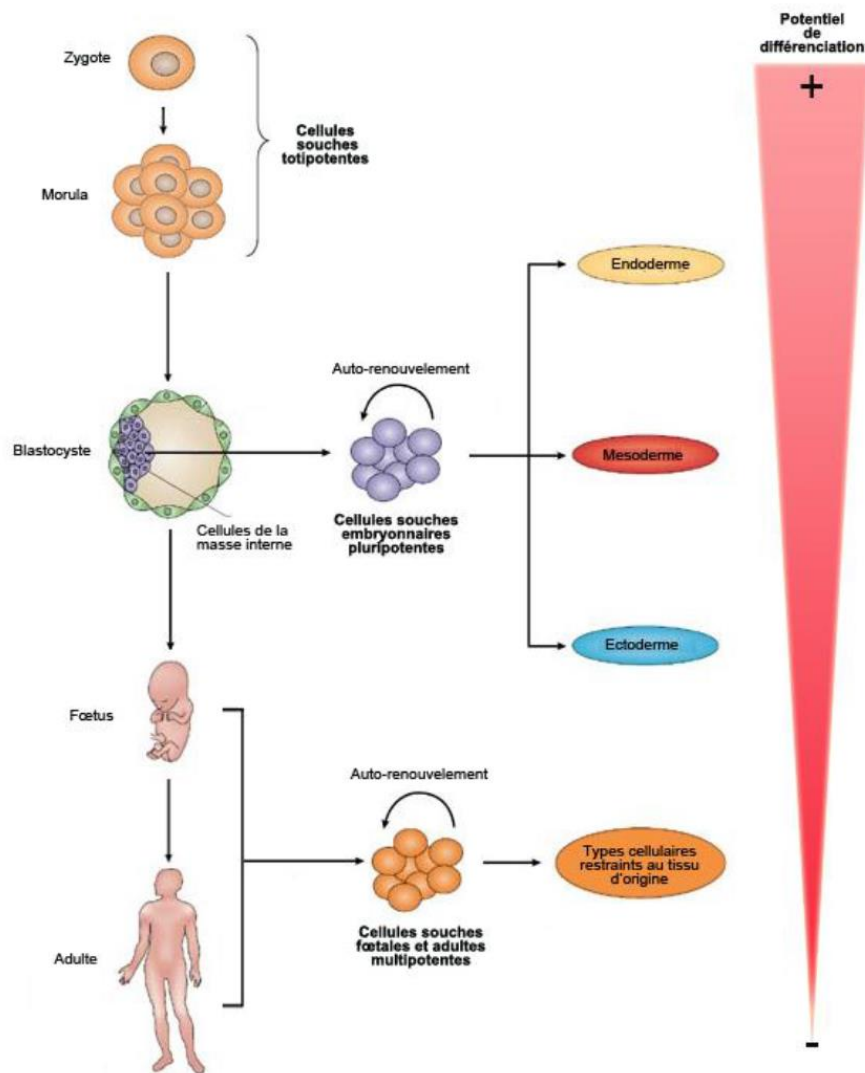


Figure 9 : Les différents types de cellules souches et leur capacité de différenciation. Adaptée de <http://svt.ac-dijon.fr>.

2. Les cellules souches embryonnaires

a. Historique et contexte

Les premières lignées de cellules souches embryonnaires ont été établies chez la souris en 1981, à partir des blastocystes de la masse cellulaire interne de l'embryon (Evans and Kaufman, 1981 ;

Martin, 1981) (Figure 9). Ces ESC murines ont la caractéristique d'être amplifiables sur un grand nombre de passages tout en conservant un caryotype normal et leur capacité de pluripotence. Cette stratégie a ensuite été appliquée à d'autres mammifères, et c'est en 1998 que la première lignée d'ESC humaine a été isolée (Thomson et al., 1998), suscitant de nombreux espoirs pour la recherche médicale. Ces cellules existent, de la même façon que chez la souris, de manière transitoire au cours du développement. Elles peuvent ainsi être isolées, entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour après fécondation, à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste, dans le cadre réglementé de programme de fécondation *in vitro* associé ou non à un diagnostic pré-implantatoire (DPI).

b. Limites des hESC

❖ Limitation du nombre d'hESC porteuses de mutation

Les hESC porteuses de mutation provenant d'un DPI peuvent représenter d'excellents modèles de maladies. Le DPI a été mis en place dans de nombreux pays, dont la France, dans le but d'identifier des embryons porteurs de mutations génétiques impliquées dans certaines maladies incurables. Ces embryons malades peuvent ainsi être écartés d'un projet de procréation parentale, et peuvent être donnés à la science et dérivés en hESC, sous l'accord des deux parents. Ainsi, les maladies génétiques pouvant être modélisées sont uniquement limitées aux maladies pour lesquelles un DPI est effectué. Cette approche limite fortement le nombre de maladies pouvant être étudié. Pour contrecarrer cette limite, des techniques permettant de modifier génétiquement les lignées hESC ont été développées, mais elles restent difficiles à mettre en œuvre et demeurent relativement peu efficaces.

❖ Les problèmes éthiques associés

Les problèmes éthiques soulevés par la destruction des embryons et l'utilisation expérimentale des hESC ont induit la mise en place de législations limitant voire interdisant l'exploitation en recherche de ces cellules dans de nombreux pays. En France, ce n'est qu'en 2004 que quelques équipes ont pu bénéficier de dérogations afin de pouvoir travailler avec des hESC. La recherche sur ces cellules était interdite, sauf dérogation sur une période de 5 ans et uniquement «lorsqu'elles étaient susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition que ces recherches ne puissent être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable» (Loi de bioéthique du 6 août 2004). Le cadre légal dans lequel s'inscrit cette loi nécessite une évaluation systématique des projets de recherche portant sur les hESC ou leurs dérivés cellulaires par l'Agence de la biomédecine. En 2011, un nouveau texte de loi est adopté, conservant l'interdiction sous dérogation mais désormais sans limite de temps. Depuis 2013, la recherche sur les cellules souches est désormais autorisée même si les contrôles restent stricts. Cette législation contraignante limite la possibilité d'utiliser ces cellules dans le cadre de projets de recherche et ralentit les avancées thérapeutiques. Toutefois, l'équipe du Dr Benchoua a pu obtenir une telle autorisation dans le but de réaliser des travaux de recherche visant à mieux comprendre et à traiter les TSA. Ceci m'a donc permis d'utiliser une lignée d'hESC saine pour réaliser la majeure partie de ce travail de thèse.

3. Les cellules souches induites à la pluripotence

a. Origine/Découverte

Initialement les cellules somatiques ont pu être reprogrammées en transférant leur noyau dans des oocytes non fécondés (Wilmut et al., 1997) ou en les fusionnant avec des ESC (Cowan et al., 2005 ; Tada et al., 2001), indiquant que les oocytes et les ESC contiennent des facteurs essentiels qui confèrent la pluripotence des cellules somatiques. Selon cette hypothèse, une étude menée en 2006 par le groupe du professeur Yamanaka, sur une sélection de 24 gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement des ESC, a permis de mettre en évidence que la surexpression d'un petit nombre de gènes seulement était suffisant pour induire la conversion de cellules somatiques de type fibroblaste murin en cellules pluripotentes comparables à des ESC (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les iPSC viennent d'être découvertes, ouvrant de grands espoirs autant dans le domaine de la recherche fondamentale que pour la recherche clinique. Les quatre gènes, identifiés comme suffisants pour induire le processus de reprogrammation, sont les gènes *Oct-4*, *SOX2*, *KLF4* et *C-Myc*, et ont pu être apportés dans les fibroblastes par des vecteurs rétroviraux. Les cellules obtenues par cette technique présentent les mêmes caractéristiques morphologiques, d'expression de marqueurs de surface et de facteurs de transcription que les cellules ESC et sont ainsi capables de s'auto-renouveler et de se différencier *in vitro* et *in vivo* vers les trois feuilletts embryonnaires. De plus, injectées dans la masse interne d'un blastocyste murin, ces cellules sont capables de participer au développement de souris chimériques et à la génération des cellules de la lignée germinale tout comme les ESC murines (Okita et al., 2007).

Les premières iPSC humaines ont été générées l'année suivante en 2007, par les équipes de Yamanaka et Thomson, en surexprimant un cocktail de quatre gènes dans des fibroblastes humains (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007). Leurs protocoles, d'efficacité comparable, diffèrent quant à la nature des gènes induits et à la méthode d'intégration utilisée. Le cocktail de Yamanaka, étant le même qu'en 2006, est composé d'*Oct-4*, *SOX2*, *KLF4* et de *c-Myc* apporté par des rétroviraux; alors que le cocktail de Thomson utilise les gènes communs *Oct-4*, *SOX2* en combinaison des gènes *LIN28* et *Nanog* avec une méthode lentivirale. Ces protocoles permettent la génération de colonies entre 2 et 4 semaines après infection, pouvant être isolées, amplifiées et différenciées, et présentant les mêmes caractéristiques que les cellules ESC humaines. Cette découverte a valu le prix Nobel aux docteurs Yamanaka et Gordon en 2012, et a rendu possible la génération à volonté de modèles de n'importe quelle pathologie humaine, en s'appuyant sur l'historique clinique d'un patient donné.

Depuis les études initiales avec les fibroblastes, d'autres types cellulaires ont été reprogrammés, comme les kératinocytes, les lymphocytes ou les hépatocytes. Si théoriquement toutes les cellules somatiques sont reprogrammables, des études ont montré que le type cellulaire influait sur l'efficacité de reprogrammation. Par exemple, la reprogrammation de kératinocytes humains avec les quatre vecteurs rétroviraux a une efficacité de l'ordre de 1 % contre 0,01 à 0,1 % pour les fibroblastes (Aasen et al., 2008). Les fibroblastes restent néanmoins le type cellulaire de choix pour les reprogrammations, de par leurs nombreux avantages (faciles à amplifier, à cultiver, et à modifier génétiquement) et leur facilité d'accès (par biopsies cutanées). Les kératinocytes sont

également souvent utilisés, pour leur efficacité de reprogrammation et leur moyen de prélèvement non invasif (simple prélèvement de cheveux). Leur mise en culture reste néanmoins plus compliquée que celle des fibroblastes car il est souvent difficile de s'affranchir de contaminants acquis lors du prélèvement.

b. Méthode de reprogrammation

Les techniques de reprogrammation ont beaucoup évoluées depuis les premières études réalisées en 2007, s'améliorant en matière d'efficacité et de sécurité. Dans les études originales, pour induire le processus de reprogrammation, les fibroblastes étaient transduits par méthode intégrative, à l'aide de vecteurs rétroviraux dérivés du virus de la leucémie murine de Moloney ou de vecteurs lentiviraux (Blelloch et al., 2007 ; González et al., 2011 ; Yu et al., 2007). Ces vecteurs sont intéressants car ils permettent un transfert de gènes efficace (de l'ordre de 0,1 %). En revanche, la méthode présente des points négatifs, avec un risque de mutagenèse insertionnelle (c'est à dire l'insertion de gènes dans un site d'ADN critique) et un risque de réactivation ultérieure de l'expression des facteurs de reprogrammation, qui pourrait potentiellement affecter la prolifération/différenciation des cellules. Un exemple connu est la réactivation de *c-Myc* dans des souris chimériques qui serait responsable de la formation de tumeurs (Okita et al., 2007).

Par la suite, des méthodes non intégratives ont donc été développées, présentant l'avantage de ne pas s'intégrer au génome des cellules transduites. C'est le cas du vecteur dérivé du virus de Sendai (Fusaki et al., 2009), qui s'est révélé aussi efficace que les vecteurs intégratifs sur cellules murines et humaines. On peut citer également la technologie utilisant les épisomes non intégratifs dérivés du virus d'Epstein-Barr (Yu et al., 2009), dont l'efficacité de reprogrammation était faible jusqu'à récemment mais qui a pu être améliorée avec l'ajout de petites molécules (Yu et al., 2011). Des méthodes n'utilisant pas d'ADN ont également été mises au point, comme la technique, relativement efficace, basée sur la transfection répétitive d'ARNm synthétiques codant pour les quatre facteurs de reprogrammation (Warren et al., 2010) ou encore la technique, de plus faible efficacité, utilisant des protéines recombinantes (Kim et al., 2009a).

Ainsi, les techniques les plus utilisées désormais sont de façon évidente les méthodes non intégratives, utilisant les vecteurs dérivés du virus de Sendai ou les épisomes. La technique reposant sur les épisomes a l'avantage d'être relativement facile à mettre en place, puisqu'elle repose sur une méthode d'électroporation, mais nécessite encore quelques améliorations en matière d'efficacité de reprogrammation. C'est pourquoi le virus de Sendai a été utilisé pour ce travail de thèse.

c. Limites des iPSC

❖ Profil épigénétique

La principale différence entre les ESC et les iPSC provient du fait que les ESC sont à leur état naturel alors que les iPSC ont besoin d'une phase d'adaptation de leur génome et de leur épigénome pour répondre à leur nouvelle identité. Ainsi des différences épigénétiques entre ces deux types de cellules souches ont été découvertes. En effet, des analyses de l'état de méthylation des histones et de l'ADN, à différents stades de la reprogrammation (fibroblastes, cellules « pré-

iPSC » et iPSC), ont montré d'importants changements épigénétiques (déméthylation) qui apparaissent au cours de la reprogrammation. Les iPSC ont ainsi tendance à avoir un profil hypométhylé similaire aux ESC, mais des différences épigénétiques subsistent. Une des premières études de Yamanaka en 2007, avait déjà rapporté cette différence. En effet, l'hypométhylation des promoteurs d'OCT4 et de Nanog avait été retrouvée moins intense dans les iPSC que dans les ESC (Takahashi et al., 2007).

La déméthylation de l'ADN et la modification des histones semblent être des processus importants dans la reprogrammation, puisque la déplétion de protéines impliquées dans le maintien de la méthylation (par exemple Dnmt1, Mikkelsen et al., 2008) ou encore l'utilisation d'inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) ou d'inhibiteurs de méthyltransférases (Huangfu et al., 2008a, 2008b ; Shi et al., 2008) augmente l'efficacité de la reprogrammation.

En 2009, des études transcriptomiques sur des ESC et iPSC ont montré un profil d'expression assez semblable mais avec tout de même des différences d'expression de gènes, d'autant plus marquées que les iPSC étaient à bas passage (Chin et al., 2009). Ainsi, les clones d'iPSC présentent des marques de mémoire épigénétique des cellules somatiques desquelles elles proviennent, notamment une signature de méthylation caractéristique (Kim et al., 2010b) et un état de chromatine ressemblant aux cellules de départ (Polo et al., 2010). Cette mémoire épigénétique peut affecter le potentiel de différenciation des iPSC, en induisant des défauts de différenciation vers certains types cellulaires mais aussi en favorisant d'autres. Ainsi, il a été démontré que les iPSC se différenciaient de façon plus efficace dans leur lignage d'origine que dans les autres (Kim et al., 2010 ; Polo et al., 2010). Par exemple, des iPSC issues de sang de cordon se différencient plus facilement en cellules hématopoïétiques que des iPSC dérivées de kératinocytes (Kim et al., 2011a).

Cette différence épigénétique peut aussi représenter une limite quant à l'utilisation des iPSC pour des travaux de modélisation pathologique et de criblage. En effet, Urbach et al. démontrent dans son étude de 2010, comment les différences épigénétiques des iPSC peuvent impacter la recherche sur le syndrome X fragile (Urbach et al., 2010). Les ESC FXS (issus d'un DPI) expriment le gène FMR1, qui subit ensuite un silence transcriptionnel après différenciation de celles-ci. Au contraire des ESC, les iPSC issus de fibroblastes d'individus atteints du FXS montrent une expression inactive du gène FMR1 associée à des profils de gènes hautement méthylés (niveaux comparables aux fibroblastes d'origine). Ces données mettent en évidence des différences essentielles entre les ESC et iPSC d'un point de vue épigénétique et régulation de gènes et soulève la question de savoir si les iPSC seront un jour en mesure de remplacer les ESC dans la recherche fondamentale. Pour le moment encore, les ESC doivent donc être considérées comme « gold standard », en attendant de maîtriser les problèmes liés aux iPSC. Cette différence épigénétique semble néanmoins disparaître au fur et à mesure des passages des cellules (Chin et al., 2009 ; Polo et al., 2010). L'origine de cette disparition de mémoire épigénétique n'a pas encore été élucidée, mais pourrait correspondre à une évolution de l'ensemble des cellules ou plutôt à la sélection d'un pool de cellules correctement reprogrammées. En tout cas, l'utilisation de régulateurs épigénétiques comme la trichostatine A ou la 5-Aza-2'-déoxycytidine (5-AdC) a été jugée efficace pour

favoriser l'effacement de la mémoire épigénétique dans des fibroblastes murins (Kim et al., 2010b).

Pour ces raisons, dans ce travail de thèse, l'étude de la régulation de la transcription du gène *SHANK3* par criblage moléculaire a été préférentiellement menée sur des neurones différenciés à partir d'ESC.

❖ **Instabilité génomique**

Des études ont montré qu'à haut passage, les lignées d'hESC ou d'iPSC pouvaient acquérir diverses anomalies cytogénétiques, telles que la trisomie 12 (l'anomalie la plus fréquemment observée, environ 50 %), la trisomie 8, la trisomie 17, la trisomie X ou la perte de chromosome X, ou encore la trisomie 20 (Baker et al., 2007 ; Lefort et al., 2008 ; Taapken et al., 2011).

En plus de ces anomalies fréquemment observées, plusieurs études ont montré que le processus de reprogrammation est associé à un fort taux de mutations rendant les iPSC plus vulnérables à l'instabilité génomique. En effet, des anomalies, de type mutations ponctuelles ou augmentation anormale de CNV *de novo* ont été retrouvées dans les iPSC (Gore et al., 2011 ; Hussein et al., 2011). Cependant pour le cas des CNV par exemple, ces défauts de reprogrammation confèreraient plutôt un désavantage (de croissance ou de survie) pour les iPSC et entraîneraient leur élimination au cours des passages (Hussein et al., 2011). Malgré l'instabilité génomique observée, elle ne représente pas un frein à l'utilisation des iPSC pour les programmes de modélisations pathologiques ou de recherche clinique. Un contrôle qualité renforcé pour la vérification du caryotype, à la création de nouvelles lignées ainsi qu'au cours de leur culture, est cependant nécessaire.

d. Intérêts en recherche des cellules souches pluripotentes humaines

L'un des intérêts des cellules souches pluripotentes humaines est, comme déjà dit précédemment, leur capacité à se différencier *in vitro* dans un type cellulaire terminal bien précis. Il est ainsi possible d'obtenir *in vitro* des cellules humaines à différents stades de différenciation allant jusqu'à des cellules spécialisées comme des neurones. Il existe aujourd'hui de nombreux protocoles permettant la différenciation contrôlée de ces cellules, à l'aide de petites molécules et de cytokines, dans des conditions de culture bien déterminées. Ils permettent d'obtenir de grandes quantités de populations cellulaires enrichies en cellules d'intérêt ainsi que de disposer de cellules inaccessibles autrement chez l'homme, comme par exemple les neurones.

De plus, le développement de la technologie des iPSC a ouvert des perspectives illimitées quant à la modélisation pathologique. En effet, contrairement aux cellules souches embryonnaires pour lesquelles la mutation était forcément connue et diagnostiquée lors du DPI, la technologie iPSC offre la chance d'étudier n'importe quelle maladie, qu'elle soit d'origine génétique connue ou inconnue, puisqu'il suffit aujourd'hui d'avoir un simple prélèvement de cellules d'un patient pour en étudier sa pathologie. Ainsi, cette nouvelle technique offre l'opportunité de coupler des informations cliniques cruciales du patient avec des phénotypes moléculaires. Enfin, les iPSC ne soulèvent aucun problème éthique important, contrairement au ESC, puisqu'elles proviennent d'une technique n'utilisant ni embryon, ni ovule (et n'impliquent donc pas la destruction de ceux-ci), ni l'utilisation de techniques se rapprochant du clonage. Les problèmes éthiques liés à ces

L'induction neurale peut être réalisée par trois méthodes différentes possibles (Figure 11) :

- La co-culture d'hPSC avec des cellules stromales permet l'obtention d'un grand nombre des cellules neuroépithéliales (NEP) organisées en rosettes neurales (Lee et al., 2007 ; Perrier et al., 2004). Cette méthode montre l'importance du contact des hPSC avec une matrice spécifique pour leur spécification neurale. Ce contact peut aussi s'effectuer *via* des matrices constituées de protéines de la matrice extracellulaire, comme la laminine (Ma et al., 2008).
- Le passage des hPSC en un stade de corps embryoïdes (*Embryoid Bodies*, EB), obtenu lorsque les cellules sont placées en suspension à forte densité et en absence de cellules nourricières (Carpenter et al., 2001 ; Eiraku et al., 2008 ; Zhang et al., 2001)
- L'induction spontanée des hPSC en conditions adhérentes (Reubinoff et al., 2000).

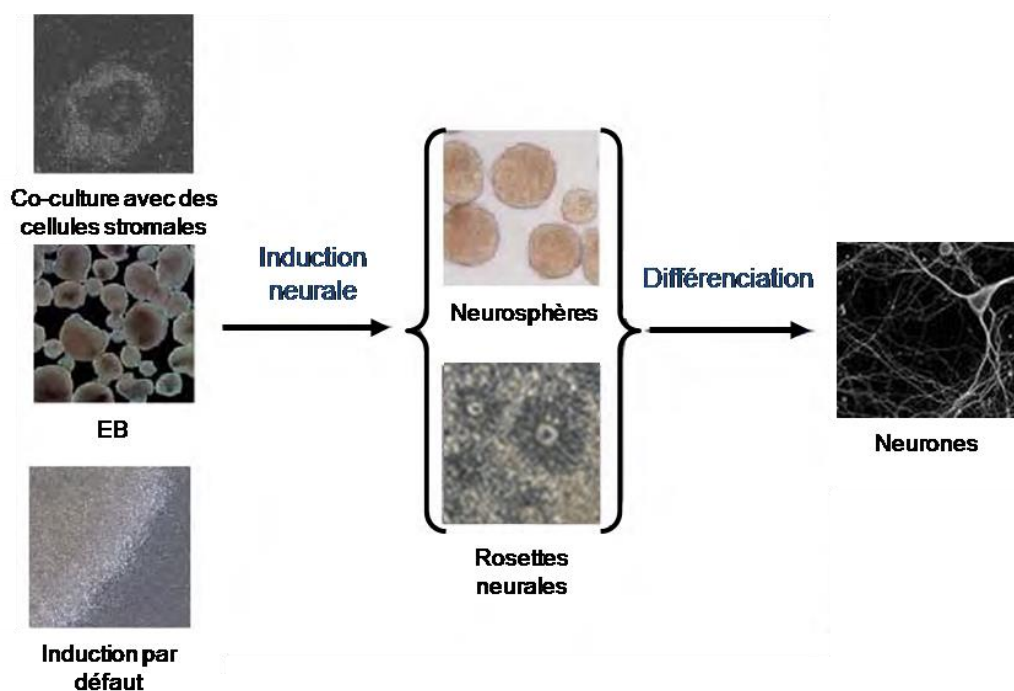


Figure 11 : Les principales méthodes d'induction neurale à partir d'hPSC.

Un grand nombre de protocoles existe. On peut citer par exemple, le protocole de Chambers et al. qui propose de cultiver les cellules hPSC, en condition de culture adhérente, sans sérum, et de les traiter avec le SB431542 (Activin/Nodal inhibitor) et la protéine Noggin (bone morphogenetic protein (BMP) inhibitor). Noggin et la petite molécule SB431542 avaient indépendamment montré des propriétés d'induction neurale robustes (Patani et al., 2009 ; Pera et al., 2004). La combinaison du Noggin et du SB431542, appelée dual SMAD inhibition, favorise ainsi une induction neurale rapide et uniforme des hPSC dans des conditions de cultures adhérentes et permet l'obtention de NEP beaucoup plus homogènes (80 % contre 30 % obtenues avec les protocoles de co-culture avec des cellules stromales). De plus, ces NEP ont le potentiel de se différencier en neurones dans un temps beaucoup plus court (~19 jours) (Chambers et al., 2009). D'autres études ont rapporté des efficacités similaires d'induction neurale pour les ESC et les iPSC. Un protocole a notamment décrit l'utilisation combinée de la dorsomorphine, un inhibiteur

de la voie BMP, avec le SB431542 (Kim et al., 2010a). Malgré ces nettes améliorations, ces protocoles donnent lieu à une population encore très hétérogène de sous types neuronaux (télencéphaliques et diencéphaliques). De récentes modifications, comme l'ajout d'acide rétinoïque en complément de la dual SMAD inhibition, ont permis la dérivation de précurseurs neuronaux plus spécialisés et de population de neurones corticaux matures (Shi et al., 2012).

Récemment, Knoblich et ses collègues ont pu développer une méthode de différenciation avancée *in vitro* en culture tridimensionnelle qui cultive les EB dans un réacteur rotatif en présence de matrigel (Lancaster et al., 2013). Cette nouvelle technologie a permis d'établir des cultures d'organoïdes cérébraux qui atteignent leur taille maximale (environ 4 mm) au bout de 2 mois, et qui reproduisent beaucoup de caractéristiques du développement cortical humain. Lancaster et al. en tirent d'ailleurs avantage pour modéliser la microcéphalie. Cette méthode très prometteuse a même pu encore être optimisée par l'équipe de Sasai en cultivant les EB dans un milieu enrichi en oxygène (40 %). Ce nouveau protocole a permis de générer une masse neuronale en 3 dimensions (3D) encore plus différenciée, avec des caractéristiques ressemblant à un cortex fœtal humain du 2ème trimestre du développement (à partir de la 11^{ème} semaine) (Kadoshima et al., 2013). Ainsi, ces approches de différenciation en 3D de neurones corticaux représentent un outil puissant pour l'étude du développement du cerveau humain et des troubles neuro-développementaux, comme l'autisme. La caractérisation de leurs propriétés électrophysiologiques et de leurs connectivités ainsi que l'organisation des différentes couches corticales devrait être d'une grande utilité pour une meilleure compréhension de l'autisme.

Même si le système de différenciation en 3D est le modèle le plus pertinent physiologiquement, le système de différenciation en mono couches adhérentes a également ses qualités. En effet, il peut fournir un outil suffisant, et un peu plus simple que les cultures en 3D, pour examiner la morphologie et la connectivité synaptique, qui sont les principaux phénotypes cellulaires des neurones de patients autistes. Il a également l'avantage de pouvoir être développé à grande échelle, caractéristique essentielle pour son utilisation dans le cadre de criblage de composés chimiques. Ainsi, grâce à la technologie des hPSC, il est désormais possible d'accéder à une source de neurones humains que l'on peut analyser à tous les niveaux, de l'expression des gènes aux mesures morphologiques. Le plus grand pouvoir de cette technologie réside probablement dans la possibilité de générer des neurones vivants, avec des synapses actives, dont la fonctionnalité électrophysiologique peut être analysée et testée pharmacologiquement.

❖ **Mesure de l'activité des neurones corticaux dérivés d'iPSC**

Ces systèmes *in vitro* ne sont pas encore assez optimisés pour pouvoir mesurer les oscillations complexes du cerveau. En revanche des mesures de fonctionnalité des neurones peuvent tout à fait être envisagées. La formation de connexions synaptiques est d'une importance capitale pour la qualité fonctionnelle *in vitro* des neurones différenciés. De plus, de nombreuses études ont démontré le rôle fondamental des cellules gliales dans la formation synaptique, la maturation et la plasticité (Eroglu and Barres, 2010). La présence d'astrocytes dans la culture est donc essentielle

pour une bonne maturation du réseau neuritique et la mesure de la neurotransmission synaptique (Johnson et al., 2007 ; Tang et al., 2013).

La neurotransmission spontanée fournit une information au sujet de la fonctionnalité du réseau *in vitro*. Pour les neurones dérivés d'iPSC, des courants spontanés apparaissent généralement entre 3 et 6 semaines après la différenciation selon le protocole (Prè et al., 2014 ; Song et al., 2013). La synchronisation du réseau apparaît quant à elle plus tardivement et est une mesure sensible de la maturité et de la connectivité de celui-ci. La synchronisation de l'activité neuronale peut être mesurée par culture des neurones sur MEA (*Micro Electrode Arrays*) ou par mesure des flux calciques intracellulaires en utilisant des sondes sensibles au calcium appliquées aux cultures neuronales. Les MEA sont capables de réaliser des mesures électrophysiologiques fines et répétées des cultures différenciées au fil du temps, permettant de déterminer des cinétiques de maturation. Au contraire de ces approches électrophysiologiques, l'imagerie calcique est moins précise mais a l'avantage d'être transposable au HTS. Cette technique peut être tout à fait utilisée pour le criblage de médicaments à partir de modèles neuronaux d'autisme dérivés d'hPSC.

L'imagerie calcique repose sur l'utilisation de sondes calciques permettant de mesurer dynamiquement la concentration en calcium libre. Le calcium est un messager intracellulaire essentiel dans les neurones de mammifères. Au repos, la plupart des neurones ont une concentration intracellulaire calcique autour de 50-100 nM qui peut atteindre des niveaux 10 à 100 fois supérieurs de façon transitoire durant une activité électrique (Berridge et al., 2000). Il y a deux principales classes d'indicateurs calciques : les indicateurs chimiques et les indicateurs protéiques. C'est la classe des indicateurs chimiques qui est la plus couramment utilisée, de par leur facilité d'utilisation, puisqu'elle ne nécessite pas de préalablement transfecter les cellules contrairement à la 2ème classe. Il existe un grand nombre d'indicateurs chimiques, comme Oregon Green BAPTA, Fura-2, Fluo-3 ou Fluo-4 (Paredes et al., 2008). La technique d'imagerie calcique avec sondes chimiques repose sur deux étapes principales : le chargement des cellules avec la sonde calcique (celle-ci contient des fluorophores qui changent leurs propriétés fluorescentes lorsqu'elles se lient au calcium libre), et la détection des courants calciques en utilisant un microscope à fluorescence. Les images sont ensuite analysées en mesurant les changements d'intensité de fluorescence. Il est possible, par exemple, de mesurer les oscillations calciques synchronisées spontanées (SCO) qui ont un rôle physiologique important dans le système nerveux central, en régulant la plasticité neuronale (Dravid and Murray, 2004).

4. Les cellules souches pluripotentes pour l'autisme

a. Modélisation pathologique de l'autisme

Jusqu'à maintenant, un très grand nombre de maladies diverses et variées ont pu être modélisées grâce à la technologie des hPSC, spécialement les pathologies neurologiques. Les maladies monogéniques ont été les premières pour lesquelles des phénotypes ont été décrits. Ces pathologies sont en règle générale plus aisées à étudier et à modéliser, car elles sont plus simples (un seul gène muté), sévères (phénotypes exacerbés, et très souvent déjà connus) et se déclenchent tôt dans la vie du patient. Dans le cas des maladies multifactorielles « plus complexes » comme l'autisme ou la schizophrénie, la modélisation est plus délicate, mais il a été possible très

récemment de déterminer certains phénotypes à partir de la technologie iPSC (Brennand et al., 2011, Tableau 3). Des études à partir d'ESC et d'iPSC, portant sur la compréhension et l'identification de phénotypes autistiques, ont déjà été accomplies pour quatre formes syndromiques d'autisme, dont le PMS, mais aussi le RTT, le TS et le FXS.

La compréhension du syndrome X fragile a pu être améliorée par des études portant sur des hESC FXS (issues d'un DPI) ainsi que sur des iPSC dérivées de patients atteints de ce syndrome. Plusieurs études, portant sur des lignées d'hESC FXS ont permis de montrer que le gène *FMR1* était progressivement inactivé, par des mécanismes épigénétiques, lors du processus de différenciation neuronale (Avitzour et al., 2014 ; Eiges et al., 2007 ; Teliás et al., 2013). Colak et ses collègues ont, quant à eux, employé deux lignées d'hESC FXS pour découvrir le mécanisme sous jacent qui entraîne cette inactivation épigénétique de *FMR1* durant la différenciation neuronale (Colak 2014). Grâce aux hESC FXS, Teliás et al. ont aussi pu mettre en évidence des défauts *in vitro* de différenciation et de maturation neuronale, menant à la formation de neurones ayant une plus faible activité synaptique spontanée et un manque de réactivité au glutamate (Teliás et al., 2013). Des études portant sur des neurones dérivés d'iPSC de patients FXS ont également permis de révéler des défauts morphologiques et de transmission synaptique, comme une réduction de la longueur des neurites, une diminution du nombre de protéines synaptiques et une augmentation des transits calciques (Doers et al., 2014 ; Liu et al., 2012).

Typiquement le RTT est également un bon exemple de modélisation réussie à partir d'ESC ou d'iPSC, puisqu'elle a permis de produire différents sous types de cellules neuronales qui récapitulent des phénotypes connus, d'en découvrir de nouveaux, ainsi que de tester des médicaments afin de développer de nouvelles approches pharmaceutiques. Plusieurs modèles d'iPSC pour le syndrome de Rett ont déjà été reportés. La première étude, basée sur des neurones dérivés à partir de 4 patientes portant différentes mutations sur le gène *MECP2*, a permis de confirmer et de découvrir plusieurs phénotypes. En effet, les neurones RTT ont montré des défauts morphologiques, comme une réduction de la taille de leur soma, une réduction de la densité des épines dendritiques et du nombre de synapses, accompagnés d'un défaut de transmission synaptique excitatrice. De plus, un traitement à l'IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor-1) a été capable de restaurer les défauts synaptiques. Il en est de même avec un traitement à la gentamycine qui, en induisant une augmentation des niveaux d'expression de *MECP2*, rétablit la transmission synaptique glutamatergique (Marchetto et al., 2010). D'autres études ont permis de confirmer les phénotypes morphologiques observés, comme la réduction de la taille du soma dans les neurones RTT (Cheung et al., 2011) ou les défauts de maturation neuronale (Djuric et al., 2015 ; Kim et al., 2011b). Dans une étude récente, Williams et al. ont pris le parti de générer des astrocytes à partir d'iPSC RTT et démontrent l'influence négative des astrocytes sur les défauts neuronaux morphologiques associés à la maladie (réduction de la taille du soma et de la longueur totale neuritique) et les altérations fonctionnelles (Williams et al., 2014). Cette étude a également prouvé l'effet bénéfique de l'IGF-1 ou d'un peptide similaire appelé GPE sur la correction des défauts morphologiques.

Une étude en 2013, portant sur la comparaison d'une lignée hESC déficiente en MECP2 (grâce à la technologie TALEN) et de son contrôle isogénique, a aussi permis de mettre en évidence de multiples défauts morphologiques, moléculaires et fonctionnels. En effet, les neurones inhibiteurs, issus d'ESC mutées, montrent une réduction de la taille de leur soma ainsi qu'une arborisation dendritique moins complexe couplée à un défaut de l'activité neuronale. L'analyse transcriptomique de ces cellules a également mis en évidence une diminution générale de la transcription des gènes ainsi que de la synthèse des protéines, avec une altération particulière de l'activité de la voie AKT / mTOR (Li et al., 2013). Cette étude a pu également mettre en avant l'effet de l'IGF-1 sur la correction des défauts des neurones MECP2 mutants.

Au sujet des autres formes syndromiques d'autisme, quelques modèles sur iPSC ont pu apporter des informations phénotypiques intéressantes. Un modèle d'iPSC pour le TS a permis d'identifier plusieurs anomalies, comme des défauts de signalisation du calcium, des défauts de différenciation et une augmentation de production de dopamine et de norépinephrine. De plus, le modèle a permis de déterminer qu'un traitement à la roscovitine était capable de corriger le phénotype observé pour les neurones catécholaminergiques, mettant en lumière le potentiel des iPSC pour le criblage (Paşca et al., 2011). Concernant le syndrome de Phelan McDermid, une équipe américaine a mis au point en 2013 un modèle neuronal humain à l'aide de la technologie iPSC, à partir de fibroblastes de deux patients atteints du PMS. Les neurones de patients ont montré des défauts dans la transmission synaptique excitatrice (diminution des courants AMPA et NMDA) ainsi qu'une réduction du nombre de synapses excitatrices et de récepteurs au glutamate, qui ont pu être corrigés par une restauration de l'expression du gène *SHANK3* ou un traitement à l'IGF-1 (Shcheglovitov et al., 2013). Dans cette étude, ils expliquent d'ailleurs que l'effet de l'IGF-1 ne passe pas par *SHANK3* (tendance même à diminuer son niveau d'expression) mais par la stimulation de PSD-95 qui est alors capable de créer de nouvelles synapses fonctionnelles sans nécessairement interagir avec son partenaire *SHANK3*. En plus, de confirmer des phénotypes moléculaires observés chez la souris, ce travail a permis de mettre en évidence la réversibilité du PMS par correction du dosage de *SHANK3*, mais aussi par une voie alternative avec l'IGF-1. L'effet potentiel de ce nouveau médicament pourrait être étendu au traitement d'autres formes d'autisme (Shcheglovitov et al., 2013).

Concernant les formes non syndromiques, qui regroupent la majorité des cas d'autisme, elles représentent clairement un challenge pour la modélisation, de par le manque de symptômes et phénotypes cellulaires clairs et définis. Pourtant, une première étude a vu le jour en 2014 ouvrant de nouvelles perspectives dans ce domaine. Des iPSC ont été générées à partir d'un individu autiste portant une translocation *de novo* balancée menant à la disparition de *TRPC6*, qui code pour une protéine canal cationique calcique non associée à l'autisme. Les neurones dérivés d'iPSC ont révélé des défauts neuronaux morphologiques (réduction de la longueur totale et de la complexité de l'arborisation dendritique) et des défauts fonctionnels (altération de l'influx calcique). Le phénotype a pu être corrigé avec un traitement à l'hyperforine ou l'IGF-1 (Griesi-Oliveira et al., 2014).

Tableau 3 : Les modèles neuronaux humains de TSA créés à partir d'ESC et d'iPSC. Sont indiqués les types cellulaires différenciés ainsi que les phénotypes observés et les molécules chimiques étant capable de les corriger. Adapté de Acab and Muotri, 2015 et Grskovic et al., 2011.

Maladie	Défaut moléculaire	Types cellulaires différenciés	Phénotypes observés	Médicaments
Le syndrome de X Fragile (Doers et al., 2014 ; Liu et al., 2012 ; Telias et al., 2013)	Expansion de CGG causant l'extinction de l'expression de <i>FMRI</i>	Neurones	Défaut dans la croissance neuritique, Réduction d'expression de protéines synaptiques Altération des transits calciques et de la réponse au glutamate	Aucun
Le Syndrome de Rett (Cheung et al., 2011 ; Djuric et al., 2015 ; Kim et al., 2011b ; Li et al., 2013 ; Marchetto et al., 2010 ; Williams et al., 2014)	Mutation hétérozygote dans <i>MECP2</i>	Précurseurs neuronaux Neurones glutamatergiques et GABAergiques Astrocytes	Diminution du nombre de synapses et de la densité des épines dendritiques Altération de l'activité neuronale Diminution de la complexité de l'arborisation neuritique Diminution globale de la transcription et de la synthèse protéique	IGF-1 Gentamicine
Le syndrome Phelan McDermid (Shcheglovitov et al., 2013)	Délétion 22q13.3	Neurones	Défaut de la transmission synaptique excitatrice Réduction des récepteurs au glutamate et du nombre de synapses	IGF-1
Syndrôme Timothy (Paşca et al., 2011)	Mutations dans <i>CACNA1C</i>	Neurones corticaux Neurones catécholaminergiques	Défauts électrophysiologiques et de signalisation du calcium Diminution de l'expression SATB2 Augmentation de l'expression de la catécholamine	Roscovitine
Syndrôme Angelman (Chamberlain et al., 2010)	Mutation dans <i>UBE3A</i>	Neurones	Aucun	Aucun
Forme non syndromique d'autisme (Griesi-Oliveira et al., 2014)	Translocation <i>de novo</i> balancée menant à la disparition du gène <i>TRPC6</i>	Neurones	Réduction de la longueur totale et de la complexité de l'arborisation dendritique Diminution de la densité des épines dendritiques Altération de l'influx calcique	Hyperforine IGF-1

Pour résumer, toutes ces formes syndromiques et non syndromiques étudiées ont montré des anomalies neuronales, comme une morphologie altérée et des déficits synaptiques. Une autre caractéristique commune, partagée par les modèles RTT, PMS et de la forme non syndromique, est l'habilité de l'IGF-1 à corriger les phénotypes détectés dans ces modèles neuronaux dérivés d'hPSC. Ainsi, la présence commune de ces phénotypes, et leur correction *via* un même traitement thérapeutique, définit un mécanisme commun responsable de la pathologie pour ces différentes formes d'autisme. De par la diversité du paysage génétique et clinique de l'autisme, bien plus de modèles devront être générés, pour pouvoir espérer caractériser les phénotypes cellulaires et les mécanismes moléculaires véritables menant à l'autisme. Ainsi dans ce contexte, le programme "Tooth-Fairy" a vu le jour. Il est basé sur la reprogrammation d'iPSC à partir de pulpe dentaire comme source de cellules somatiques d'enfants autistes extraite de leur dent de lait. Le projet Tooth-Fairy a permis de recueillir la pulpe dentaire de patients atteints de TSA au Brésil et aux États-Unis, représentant une partie de l'hétérogénéité de la population atteinte. Actuellement, plus de 3 500 familles ont été répertoriées et environ 300 échantillons ont déjà été collectés. Cette banque a l'avantage de permettre un recoupement des données génétiques et

phénotypiques cellulaires avec l'information clinique détaillée des patients. La banque sera ainsi utile pour modéliser les différences entre les personnes autistes ayant des phénotypes cliniques distincts. Les résultats sur les iPSC en combinaison avec les analyses génomiques, tels que le séquençage du génome entier, aidera à catégoriser les TSA, clarifier certaines voies moléculaires conduisant au comportement autistique, et identifier de nouveaux composés thérapeutiques plus personnalisés.

b. Criblage moléculaire thérapeutique

Un autre grand intérêt des hPSC est la possibilité de les utiliser pour mettre en place des plateformes de criblage moléculaire thérapeutique pour la découverte de nouveaux médicaments. Ce type de procédé est déjà réalisé sur des cellules primaires ou immortalisées. Néanmoins, la mise en place de systèmes de criblage à partir d'hPSC semble encore plus intéressante au vu des nombreux avantages que possèdent ces cellules :

- Leur pouvoir de division illimité permet d'accéder à une quantité importante de cellules hPSC et de leur dérivé, qui est crucial pour le déroulement de campagnes de criblage
- La différenciation en n'importe quel type cellulaire permet de faire des criblages sur des types cellulaires plus pertinents pour la maladie étudiée, et ouvre la voie de criblage sur des types cellulaires neuronaux qui étaient jusque là impossibles
- L'utilisation de ces cellules permet de tester les composés chimiques sur un fond génétique humain dès les premières étapes du développement d'un médicament (Figure 12). Cela permet ainsi d'écarter des molécules qui seraient uniquement actives dans les modèles animaux et qui, comme c'est parfois le cas, échouent dans les essais cliniques.

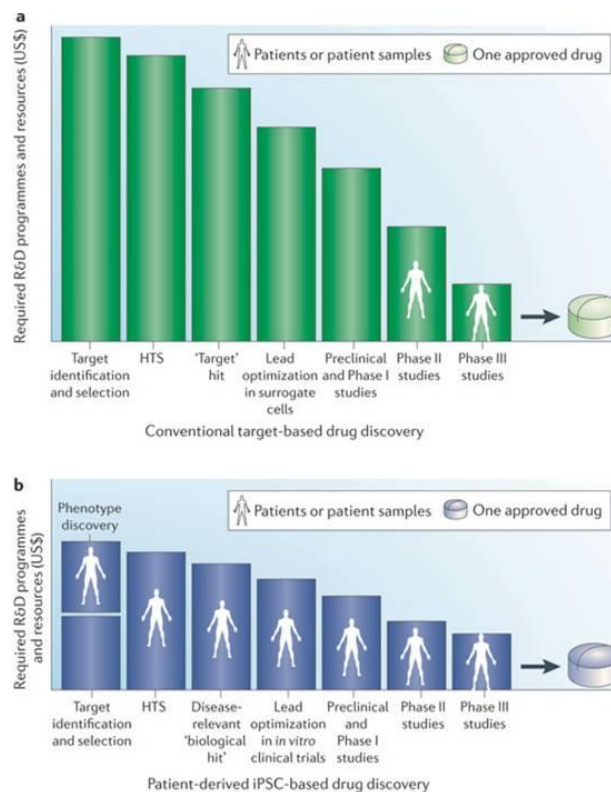


Figure 12 : Comparaison du processus de découverte d'un médicament entre la méthode conventionnelle ciblée-centrée et celle à partir d'iPSC de patients. Issue de Grskovic et al., 2011.

Avec les iPSC, il est donc désormais possible de réaliser le criblage moléculaire thérapeutique directement sur les cellules d'intérêt dérivées de patients (Figure 13). Le fond génétique pathologique est pris en compte, et il est ainsi possible d'évaluer moléculairement les bénéfices d'un traitement sur le phénotype moléculaire et cellulaire du patient. Cela permet également d'écarter les molécules chimiques qui n'auraient éventuellement qu'un effet thérapeutique en condition physiologique normale. Différentes études menées sur des cellules différenciées à partir d'iPSC ont déjà montré qu'il est possible d'utiliser ces cellules pour tester des composés moléculaires (Brennand et al., 2011 ; Shcheglovitov et al., 2013).

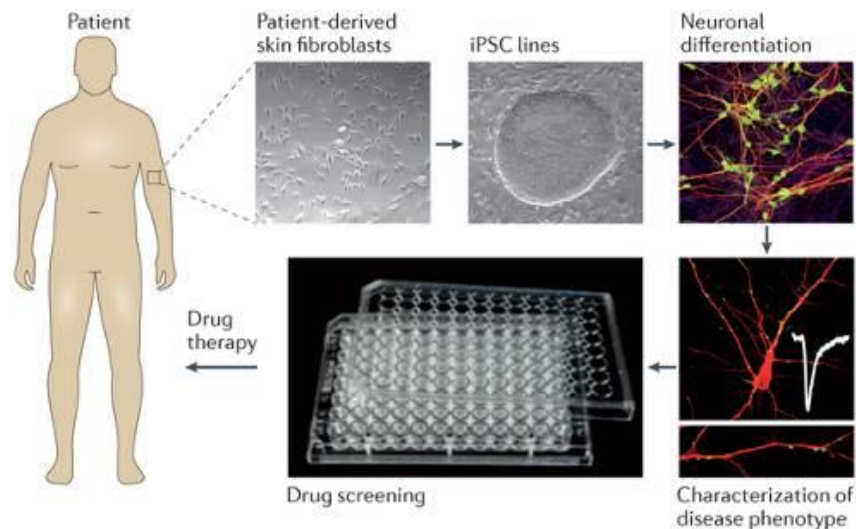


Figure 13 : Utilisation des iPSC pour la découverte de médicaments personnalisés. Issue de Ghosh et al., 2013.

Un premier criblage sur neurones à partir d'iPSC murines a été réalisé en 2010, fournissant la preuve que l'utilisation des iPSC pour du criblage à haut débit était réalisable. Celui-ci a permis le criblage de plus de 2 millions de composés et visait à déterminer les agents pharmacologiques agissant sur l'activité neuronale (McNeish et al., 2010). Depuis, d'autres criblages ont porté sur les iPSC humaines, dans des contextes pathologiques. C'est le cas, par exemple, d'un criblage de 2 000 composés effectué dans le cadre de la maladie de Parkinson qui visait à trouver des activateurs de la transcription de MEF2 (Ryan et al., 2013).

Dans ce travail, nous avons voulu faire la preuve de principe qu'un criblage sur neurones à partir d'hpSC pouvait être utile dans le cadre de l'autisme. Les formes génétiques d'autisme impliquant *SHANK* ont été préférentiellement choisies comme modèle d'étude pathologique car elles concernent de nombreux cas d'autisme, et les phénotypes associés sont sévères et pénétrants. De plus, de nombreuses études sur l'animal ont permis de déterminer les phénotypes moléculaires et cellulaires associés, rendant plus facile l'étude de cette pathologie. Une seule étude à partir d'iPSC a été réalisée jusqu'à présent, confirmant les phénotypes associés à la maladie et menant à la découverte d'un médicament potentiel l'IGF-1 mais qui n'est pas spécifique de *SHANK3* (Shcheglovitov et al., 2013). Ces observations ont ainsi permis de confirmer que les hpSC pouvaient être un bon modèle pour le test de composés et la modélisation des formes rares d'autisme impliquant *SHANK3*. Mais elles mettent aussi en avant le besoin de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques spécifiques pour le traitement de la maladie.

III. Les protéines SHANK

1. Implications de SHANK dans les maladies neurologiques

Les protéines SHANK sont impliquées dans de nombreuses maladies neuropsychiatriques. La première connexion a été établie en 2001 quand l'haploinsuffisance de *SHANK3* a été reliée au syndrome de Phelan-McDermid. Depuis lors, de nombreuses mutations dans *SHANK* ont été retrouvées chez des individus atteints de divers troubles neuropsychiatriques, avec chevauchement partiel, incluant autisme, déficience intellectuelle, SCZ, troubles bipolaires (TBP) et ADHD (Guilmatre et al., 2014) (Figure 14).

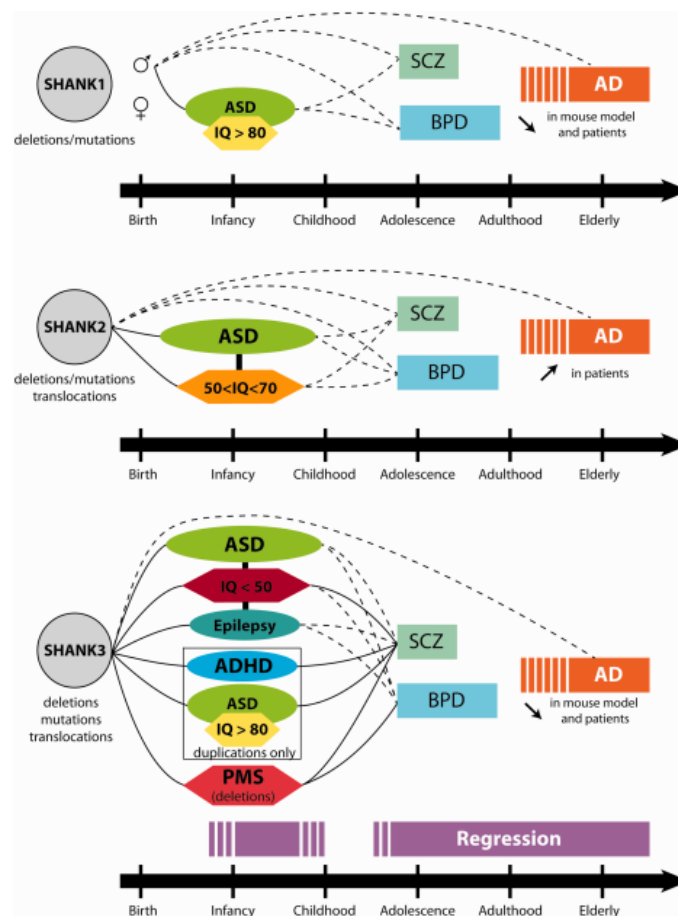


Figure 14 : Lien entre les gènes *SHANK* et les maladies neurologiques. Sont représentées les caractéristiques cliniques des patients porteurs de mutations délétères hétérozygotes ou de CNV dans les différents gènes *SHANK*. Les lignes continues indiquent les résultats phénotypiques déjà associés aux mutations des gènes *SHANK*. Les lignes pointillées montrent les pathologies candidates pour lesquelles *SHANK* devrait être examinées. Issue de Guilmatre et al., 2014.

a. *SHANK3* et le syndrome de Phelan McDermid

❖ Historique

Le premier cas de patient atteint du PMS, aussi connu sous le nom de syndrome de délétion 22q13.3, a été reporté en 1985 avec l'étude d'un enfant avec une sévère déficience intellectuelle,

couplée à une absence de parole et un dysmorphisme facial. La monosomie partielle de son chromosome 22 avait été transmise par la mère saine qui portait une trisomie 22 mosaïque partielle due à une inversion péricentrique du chromosome 22 (Watt et al., 1985). D'autres équipes ont décrit par la suite d'autres cas isolés ayant une délétion partielle du chromosome 22 (Herman et al., 1988 ; Kirshenbaum et al., 1988 ; Narahara et al., 1992 ; Phelan et al., 1992 ; Romain et al., 1990). En 1994, Nesslinger et al. reportent 7 cas additionnels, ayant tous une délétion 22q13 *de novo*, et partageant un même phénotype pathologique incluant un retard développemental généralisé, une croissance normale ou accélérée, une hypotonie, un sévère retard du langage et un dysmorphisme facial (Nesslinger et al., 1994). Ils proposent d'ailleurs, dans cette étude, une région minimale critique, correspondant à la zone de chevauchement des délétions (dans laquelle les gènes impliqués seraient localisés), s'étendant du locus D22S94 à la région distale d'ARSA, soit sur 25,5 cM. Yong et al. reportent pour la première fois en 1997, un cas de mosaïcisme pour la délétion 22q13.2 chez une fille de 5 ans avec retard global du développement, épilepsie, traits dysmorphiques et pigmentation anormale de la peau (Yong et al., 1997). Wong et al. en 1997, grâce à leur étude, permettent de réduire la région minimale critique à 70 kb. En 2001, Phelan et al. reportent une description de 37 nouveaux cas, ajoutés à 24 autres cas précédemment décrits dans la littérature, qui leur permettent de poser la définition du PMS (Phelan et al., 2001). Les symptômes les plus souvent retrouvés sont un retard global du développement (100 %), une absence ou un retard d'expression du langage (100 %), une hypotonie généralisée (97 %) et une croissance normale ou avancée (95 %). De façon intéressante, le diagnostic d'autisme a été posé pour 17 des 18 individus évalués (12 ayant un phénotype autistique de modéré à sévère et 5 n'ayant qu'un autisme léger). L'association du PMS avec l'autisme a ainsi commencée à émerger. Celle-ci a été fortement supportée par la publication d'un *case report* sur une jeune fille de 14 ans ayant une délétion 22q13.3 cryptique *de novo* et montrant des symptômes autistiques accompagnés d'un retard global du développement, d'une déficience intellectuelle, de traits dysmorphiques et d'une malformation rénale (Goizet et al., 2000).

En 2001, Bonaglia et al. proposent pour la première fois l'implication spécifique du gène *SHANK3* dans le PMS (localisé dans la région critique déterminée précédemment), avec l'étude d'un patient de 4 ans ayant un phénotype typique des patients atteints du PMS avec une légère déficience intellectuelle, un sévère retard de la parole, une légère hypotonie et un dysmorphisme facial mineur. Celui-ci porte une translocation balancée réciproque *de novo* entre les chromosomes 12 et 22, sans perte de matériel génétique apparent. Le point de cassure est en revanche situé sur le chromosome 22 au niveau du gène *SHANK3*, l'interrompant au niveau de son exon 21, et suggérant ainsi que l'haploinsuffisance de ce gène serait responsable des caractéristiques phénotypiques du syndrome (Bonaglia et al., 2001). L'implication de *SHANK3*, du moins dans les défauts neurologiques (retard de la parole et déficience intellectuelle), a ensuite été fortement supportée par le travail en 2003 de deux équipes. Dans une étude portant sur 33 individus, Luciani et al. ont déterminé que tous leurs patients montraient une délétion de *SHANK3* et ont pu encore réduire la région critique, qui n'inclue désormais plus que les gènes *SHANK3*, *ACR* et *RABL2* (le gène *ARSA* étant éliminé) (Luciani et al., 2003). Wilson et al. ont également mis en évidence l'haploinsuffisance de *SHANK3* chez 45 patients et incriminent la même région minimale critique (Wilson et al., 2003). Ces deux études ont permis d'énoncer également que de

manière générale la délétion est fortement héritée du père (environ 70 % des cas). De plus l'identification, chez plusieurs patients, de petites délétions de 140 kb avec un breakpoint récurrent commun dans le gène *SHANK3*, entre les exons 7 et 8, a permis de renforcer l'implication de ce gène (Bonaglia et al., 2006). Une étude concernant un patient atteint du PMS avec une translocation (22:X) associant la délétion des deux derniers exons de *SHANK3* et une partie de *ACR* supporte également le rôle de *SHANK3* dans le syndrome (Misco et al., 2011). Jusqu'à maintenant plus de 600 cas ont été reporté menant à une description clinique détaillée. La variabilité génétique des patients est accompagnée de phénotypes multiples. Ce syndrome récent est encore sous-diagnostiqué et son incidence réelle reste inconnue.

❖ Caractéristiques cliniques

Le syndrome est caractérisé dans plus de 75 % des cas par des déficits neurologiques qui incluent un retard global du développement, un déficit intellectuel modéré à sévère avec absence ou retard d'expression du langage, d'une hypotonie néo-natale et d'un dysmorphisme facial léger (Phelan and McDermid, 2012). Les caractéristiques physiques communes incluent une dolichocéphalie (crane allongé et étroit), un front large, un nez bulbeux, des yeux enfoncés, des joues pleines, des paupières gonflées, des longs cils, de grandes oreilles ou de formes habituelles, des mains larges, des ongles de pieds dysplasiques, des sourcils épais et un menton pointu. Le syndrome est classé comme une forme syndromique d'autisme car plus de 50 % des patients développent un comportement autistique. De l'épilepsie a également été décrit dans plus de 25 % des cas (comme le grand mal, l'épilepsie d'absence ou l'épilepsie focale). D'autres symptômes peuvent exister de façon plus rare, comme des anomalies cardiaques ou des problèmes rénaux. Un récapitulatif des symptômes est donné en Tableau 4.

Tableau 4 : Récapitulatif des symptômes associés au PMS. Issu de Phelan and McDermid, 2012.

> 75 % des cas	> 50 % des cas	> 25 % des cas	< 25 % des cas
Retard global du développement	Ongles de pieds larges dysplasiques	Strabisme	Grincement de dents
Retard ou absence du langage	Cils longs	Ptosis	Kyste arachnoïdien
Croissance normale ou accélérée	Dolicocéphalie	Anomalies rénales	Clinodactylie du 5ème doigt
Hypotonie	Grandes oreilles ou de formes inhabituelles	Pli épicanthique	Déficiência visuelle corticale
	Front large	Palais étroit et profond	Hypothyroïdisme
	Paupières gonflées	Dents espacés	
	Joues pleines	Syndactylie des orteils	
	Yeux enfoncés	Epilepsie	
	Nez bulbeux	Défauts cardiaques	
	Menton pointu	Lymphoedème	
	Diminution de la transpiration	Reflux gastro-oesophagien	
	Comportements autistiques	Vomissements cycliques	
	Diminution de la perception de douleur	Puberté précoce ou retardée	
	Mouvement de mastication ou de mordillement		

❖ Génétique

La maladie affecte aussi bien les garçons que les filles. Des formes mosaïques et non-mosaïques de la délétion ont été rapportées, aussi bien que des formes héritées et *de novo*. Ce syndrome résulte typiquement d'une perte de la partie distale du bras long du chromosome 22. Dans la majorité des cas (80-85 % des individus) celle-ci est due à l'apparition de délétions *de novo*, dont 70 % ont une origine paternelle. Pour d'autres individus, la perte de cette partie de chromosome résulte d'un réarrangement déséquilibré du chromosome 22 (15-20 % des cas) dont 50 % sont hérités de la mère ou du père (Luciani et al., 2003 ; Wilson et al., 2003) ; ou encore de la formation d'un chromosome en anneau ou d'anomalies structurelles (Dhar et al., 2010 ; Luciani et al., 2003 ; Wilson et al., 2003). Les tailles des délétions sont très variables et s'étendent de moins de 100 kb à plus de 9 Mb (Wilson et al., 2003). Aucune étude n'a trouvé de corrélation entre la taille de la délétion et la sévérité des symptômes, mis à part Wilson et al. en 2003 pour quelques mesures d'évaluation développementale. La détermination de la région critique minimale a permis d'identifier trois gènes : *ACR*, *RABL2B* et *SHANK3* (Bonaglia et al., 2001 ; Phelan and McDermid, 2012 ; Wilson et al., 2003). L'implication particulière du gène *SHANK3* a été démontrée pour être la cause des symptômes neurologiques et comportementaux dans ce syndrome. De plus, sa localisation et son rôle clé dans les neurones, ainsi que son implication dans environ 1 % des cas autistiques (voir partie ci dessous) certifie son rôle dans le développement des symptômes neurologiques.

L'haploinsuffisance de *SHANK3* a été observée dans tous les cas de patients atteints du PMS, mis à part chez deux patients, mettant en évidence l'effet possible d'autres gènes dans la maladie (Wilson et al., 2008). Les plus petites délétions responsables du PMS incluent aussi les gènes *ACR* et *RABL2B*. *ACR* code pour l'acrosine, une protéase présente dans l'acrosome du spermatozoïde, qui permet sa pénétration dans l'ovocyte pendant la fécondation (Klemm et al., 1991). Au vu de son rôle, une implication du gène *ACR* est peu plausible. Concernant *RABL2B* (RAS oncogene family-like 2B), il appartient à la super famille des RAS GTPase (Wong et al., 1999) et est particulièrement exprimé dans le cerveau et le placenta (Kramer et al., 2010). L'implication de ce gène dans les phénotypes du syndrome pourrait être envisageable. En revanche, un rôle majeur est peu probable car deux patients atteints du PMS ont été rapportés avec le gène *RABL2B* intact (Delahaye et al., 2009). Un autre gène mis en cause dans beaucoup de cas de PMS, et pouvant avoir un rôle dans la pathologie, est *IB2* (Islet Brain 2) aussi connu sous le nom de *MAPK8IP2* (Mitogen-Activated Protein Kinase 8-Interacting Protein 2). Il est localisé à 70 kb du gène *SHANK3*. Chez les souris, ce gène est exprimé dans le cerveau et la protéine est enrichie dans les PSD. De plus, une invalidation de ce gène chez les souris engendre des défauts comportementaux de type déficits moteurs et une diminution de l'interaction sociale (symptômes rappelant l'autisme). La localisation de la protéine et surtout les conséquences d'une diminution de celle-ci chez les souris laissent donc à penser que le gène *IB2* participerait dans certains cas au développement des symptômes du PMS (Giza et al., 2010).

❖ Traitements thérapeutiques

En 2009, Schmidt et al. ont conduit un essai clinique sur six enfants atteints du PMS avec de l'insuline intranasale. Cinq enfants ont vu leurs symptômes cognitifs et moteurs s'améliorer avec

un traitement à court terme (6 semaines) et quatre enfants ont vu l'effet perdurer sur le long terme (12 mois) (Schmidt et al., 2009). Le mécanisme par lequel passerait l'insuline n'est pas clair mais une hypothèse est formulée : après activation du récepteur à l'insuline, son substrat IRSp53 (partenaire de SHANK3) agirait sur la réorganisation morphologique des épines et des synapses en augmentant l'expression locale de PSD-95 et contrebalancerait ainsi la déficience de SHANK3.

Pasini et al. en 2010 montrent un effet positif du rispéridone à faible dose sur l'humeur et le comportement d'une patiente (Pasini et al., 2010). Mais des études plus larges sont nécessaires avant de recommander ces types de traitement.

Enfin, des études précliniques sur un modèle de souris ainsi que sur un modèle neuronal humain déficients en SHANK3 ont permis de mettre en évidence le bénéfice potentiel d'un traitement à l'IGF-1 pour le PMS. En effet, l'IGF-1 est capable de corriger les défauts de plasticité synaptique et les légers déficits moteurs observés chez les souris *SHANK3*^{+/-} par rapport à des souris contrôles (Bozdagi et al., 2013). De plus, dans un modèle neuronal humain dérivés d'iPSC, l'IGF-1 corrige les défauts de composition synaptique et de transmission excitatrice observés dans les neurones PMS par rapport aux neurones contrôles (Shcheglovitov et al., 2013). A suivi en 2014, la première étude clinique contrôlée en double aveugle évaluant l'effet de l'IGF-1 sur neuf enfants atteints du PMS, âgés de 5 à 15 ans. L'étude a été réalisée sur une période de traitement de 3 mois avec l'IGF-1 en injection sous cutanée, ou avec un placebo, séparée d'une phase sans traitement de 4 semaines. Comparé à la phase placebo, la phase de traitement avec l'IGF-1 a été associée à une amélioration significative des défauts sociaux et des comportements restrictifs. De plus, l'IGF-1 a été bien toléré sans effet secondaire sérieux, malgré des problèmes de sommeil, une hypoglycémie ou de l'irritabilité (Kolevzon et al., 2014). A noter également, que l'IGF-1 est aussi efficace pour corriger les défauts phénotypiques dans des modèles de souris et dans des modèles neuronaux issus d'iPSC pour le syndrome de Rett (Marchetto et al., 2010), fournissant la preuve qu'un médicament peut agir pour différentes formes d'autisme.

b. SHANK et les formes monogéniques d'autisme

Comme énoncé précédemment, l'haploinsuffisance du gène *SHANK3* est la cause sous-jacente du PMS. Le lien entre SHANK3 et ce syndrome fournit la preuve la plus évidente entre la perte d'une protéine d'échafaudage postsynaptique et un désordre incluant symptômes neuropsychiatriques, comme retard global du développement, retard de parole et comportements autistiques. Ainsi, le gène *SHANK3* a été par la suite très étudié chez les sujets atteints d'autisme, et des mutations hétérozygotes *de novo* dans ce gène ont été retrouvées chez certains de ces patients. Ces cas d'autisme associés à des mutations sur *SHANK3* englobent des formes légères de type syndrome Asperger ainsi que des formes sévères.

En 2007, Durand et al. ont décrit trois patients atteints de TSA, avec une déficience intellectuelle sévère à modérée et retard ou absence de parole, portant une délétion *de novo* ou une mutation *frame shift* sur *SHANK3*. Le breakpoint de la délétion du premier patient se situe entre l'exon 7 et 8 de *SHANK3*, dans une région courte génomique, hautement riche en guanine et avec une haute probabilité d'être dans une conformation G-quartet. La conformation G-quartet semble être une structure plus à sujet aux réarrangements génomiques que les structures classiques d'ADN à

double hélice (Durand et al., 2007). De façon intéressante, Durand et al. ont découvert une famille atypique comprenant une fille avec une délétion 22q terminale atteinte d'autisme, avec sévère retard de la parole, et son frère ayant une trisomie partielle de la région 22q terminale et le syndrome Asperger, avec développement précoce du langage. Ces anomalies cytogéniques proviennent d'une translocation paternelle t(14;22)(p11.2;q13.33). Ainsi, la présence d'une copie additionnelle de *SHANK3* n'agit pas sur les capacités du langage mais semble mener à un défaut sévère dans la communication sociale, suggérant l'importance d'un dosage fin pour le gène *SHANK3*.

Moessner et al., grâce à une étude portant sur 400 patients atteints de TSA, ont aussi rapporté plusieurs mutations sur le gène *SHANK3*. Les patients en question présentaient des déficiences intellectuelles sévères à modérées, et une faible voire une absence d'utilisation de la parole. Une famille particulière, issue également d'une translocation paternelle t(14 ;22) a été décrite. Composée d'une fille portant une délétion *de novo* sur le gène *SHANK3*, et de sa sœur ayant une duplication réciproque associée à des troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (Moessner et al., 2007), cette famille suggère là encore l'importance d'un dosage fin de *SHANK3*. Gauthier et al. ont reporté une délétion *de novo* sur un site d'épissage intronique chez un patient avec autisme et une mutation faux sens délétère fonctionnelle L68P chez un patient TED-NOS, héritée de son père qui souffrait d'épilepsie (Gauthier et al., 2009). En 2013, Boccuto et al. supportent également l'implication de *SHANK3* dans les TSA en fournissant la description de cinq patients atteints d'autisme, du syndrome Asperger ou de TED-NOS, portant des mutations délétères sur ce gène, de type délétion, mutation sur un site d'épissage, mutation faux sens ou *frame shift*, menant à une protéine tronquée (Boccuto et al., 2013). La même délétion délétère avait déjà été reportée chez un patient japonais atteint de TSA avec sévère retard de la parole (Waga et al., 2011).

Pour résumer, des mutations ponctuelles ont été retrouvées un peu partout dans le gène *SHANK3* (Figure 15) chez de nombreux patients atteints de TSA avec des phénotypes cliniques relativement hétérogènes. Cependant, il semble que la localisation de la mutation pourrait être corrélée à la sévérité des symptômes. Ainsi, par exemple des mutations dans le domaine ankyrine sont associées à des formes moins sévères de TSA que les mutations touchant la perte du domaine HOMER (Durand et al., 2007). De plus, le dosage de l'expression du gène semble aussi être lié à la sévérité du phénotype, puisqu'une étude a montré que la perte du domaine HOMER peut produire un effet de gain de fonction, aggravant les symptômes, en diminuant l'expression de la copie du gène *SHANK3* sauvage avec jusqu'à 90 % de perte de la protéine *SHANK3* au niveau des synapses (Bangash et al., 2011). L'importance du dosage de l'expression du gène *SHANK3* dans l'autisme a aussi été supportée par le fait que 7 des 28 micro-ARN (miR-15a, miR-484, miR-7, miR-128, miR-15b, miR-328 et miR-27a) dérégulés dans le cortex cérébelleux de patients atteints d'autisme, ont pour cible prédictible le gène *SHANK3* (Abu-Elneel et al., 2008). Enfin, une étude portant sur l'analyse épigénétique de 54 cerveaux *post mortem* de patients autistes a montré une augmentation anormale de la méthylation du gène *SHANK3*, couplée à une diminution de son expression, pour 15 % des cas d'autisme étudiés (Zhu et al., 2014), montrant que *SHANK3* est un gène de susceptibilité très important dans l'autisme.

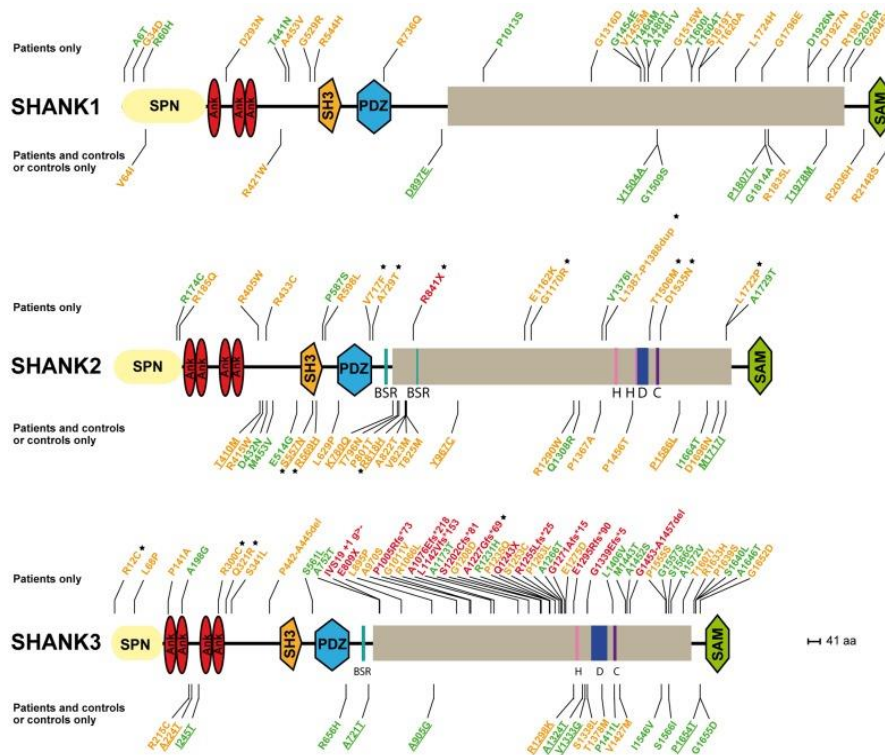


Figure 15 : Les différents variants sur les gènes *SHANK* retrouvés chez les patients atteints d'autisme. Les variants bénins, ceux prédits pour être délétères et ceux qui mènent à une protéine tronquée sont indiqués respectivement en vert, orange et rouge. Les variants dont l'impact fonctionnel a été vérifié *in vitro* sont désignés par une étoile. Issue de Leblond et al., 2014.

En plus, de la récurrente implication de SHANK3 dans l'autisme, plusieurs études ont identifié des mutations délétères *de novo* dans le gène *SHANK1* et *SHANK2* chez des patients autistes (Figure 15). Le rôle de SHANK1 dans les TSA a été décrit pour la première fois en 2012, par la description d'une famille de six individus portant une délétion de 63,8 kb, comprenant les gènes *SHANK1* et *CLEC11A*, dont seuls les hommes de la famille étaient atteints d'autisme. Dans cette même étude, une délétion de 63,4 kb comprenant le gène *synaptotagmin-3* et les trois derniers exons de *SHANK1* a également été identifiée chez un patient atteint d'autisme de haut niveau (Sato et al., 2012).

Concernant SHANK2, Berkel et al. en 2010 ont décrit pour la première fois des patients atteints d'autisme à phénotype clinique variable, avec une déficience intellectuelle plus ou moins sévère, ayant des délétions ou mutations non sens hétérozygotes *de novo* sur ce gène (Berkel et al., 2010). Parmi ces cas, on peut noter un patient atteint d'autisme avec une déficience intellectuelle modérée portant une délétion de 421,2 kb couvrant 12 exons (E5-E16) du gène *SHANK2* et qui altère toutes ses isoformes. Par la suite, quatre études indépendantes ont également reporté des délétions hétérozygotes *de novo* sur le gène *SHANK2* chez des patients atteints de TSA, avec retard du développement et de la parole, accompagné d'une déficience intellectuelle modérée (Chilian et al., 2013 ; Leblond et al., 2012 ; Pinto et al., 2010 ; Schluth-Bolard et al., 2013). Les effets délétères de mutations sur *SHANK2*, dont deux héritées et une *de novo* (R462X), identifiées chez des patients atteints d'autisme, ont été étudiés *in vitro* par Berkel et al. en 2012. Ces

mutations ont montré une réduction du volume dendritique et de la taille des clusters SHANK2 lorsqu'elles étaient introduites dans des neurones hippocampaux primaires (Berkel et al., 2012). En 2012 et 2013, deux études différentes ont reporté des cas similaires intéressants. En effet, deux patients avec des délétions sur *SHANK2* (Leblond et al., 2012) et un patient avec une translocation menant à la perte du gène *SHANK2* (Chilian et al., 2013) portaient également une duplication sur la région 15q11-q13 au niveau du récepteur nicotinique *CHRNA7*. La faible probabilité d'une telle coïncidence suggère qu'une épistasie génétique pourrait exister entre le gène *SHANK2* et les gènes du chromosome 15q11-q13. De plus, l'étude de 2012 a reporté un troisième patient avec une délétion sur *SHANK2* portant aussi une délétion sur la région 15q11-q13, avec perte du gène *CYFIP1* qui code pour un partenaire de la protéine X fragile FMRP (Leblond et al., 2012). Ainsi, la co-occurrence des mutations dans ces gènes pourrait avoir un effet synergique dans l'augmentation du risque d'un dysfonctionnement synaptique et dans le développement de l'autisme. A l'inverse, Leblond et al. ont également identifié des variants qui pourraient exercer des effets protecteurs. C'est le cas, par exemple, d'un individu contrôle portant une mutation sur un site d'épissage de *SHANK2*, mais qui ne révèle aucun désordre majeur. Une duplication partielle sur *SNTG2* et *MYTIL* a été retrouvée chez cet individu, et pourrait contrecarrer l'effet délétère de la mutation *SHANK2* en modulant la physiologie de la synapse (Leblond et al., 2012). Il est à noter, qu'en plus de mutations *de novo*, Leblond et al. ont aussi observé un enrichissement de mutations affectant les acides aminés conservés du gène *SHANK2* chez les patients autistes par rapport aux individus contrôles, qui altèrent les densités synaptiques *in vitro* dans des neurones hippocampaux primaires (Leblond et al., 2012). A l'inverse de *SHANK3*, aucune duplication n'a été retrouvée sur *SHANK1* ou *SHANK2* pour participer à l'autisme.

En 2014, une étude portant sur plus de 5 000 patients, a permis d'estimer la prévalence de ces cas d'autisme liés aux mutations hétérozygotes sur les gènes *SHANK*. Ainsi, des CNV et des mutations qui mènent à des protéines tronquées dans les gènes *SHANK* ont été détectés chez environ 1 % des patients atteints d'autisme (Leblond et al., 2014) :

- les mutations dans *SHANK1* sont rares (0,04 %) et présentes uniquement chez des hommes atteints d'autisme avec un quotient intellectuel normal
- les mutations dans *SHANK2* sont présentes chez 0,17 % des patients atteints de TSA accompagnés de déficiences intellectuelles légères
- les mutations dans *SHANK3* sont présentes dans 0,69 % des patients atteints de TSA et dans plus de 2,12 % des cas d'autisme avec déficience intellectuelle sévère à modérée.

L'invalidation des gènes *SHANK1*, *SHANK2* et *SHANK3* chez les souris ont permis de confirmer leur implication dans l'autisme. En effet, les modèles de souris générés présentent de nombreux points communs avec les patients atteints d'autisme. Les souris invalidées pour le gène *SHANK3* développent des comportements répétitifs et compulsifs et des déficits d'interaction sociale et de communication. La souris déficiente en *SHANK1* montre une augmentation de l'anxiété et des déficits de communication, de mémoire et de locomotion alors que la souris déficiente en *SHANK2*, en plus de l'augmentation de l'anxiété et des déficits de communication, développe aussi de l'hyperactivité, des comportements répétitifs et des déficits du comportement social. Les

différents modèles de souris existants pour *SHANK3* seront décrits un peu plus en détail par la suite.

c. SHANK et les désordres bipolaires

C'est en 1996 que Sovner et al. reportent le premier patient atteint de TBP ayant le chromosome 22 en anneau (Sovner et al., 1996). Ont suivi quatre études indépendantes qui ont permis de confirmer le lien entre *SHANK3* et le développement de TBP. Ces études ont reporté un TBP atypique accompagné d'une perte de compétences chez des adultes atteints du PMS. La première étude portait sur une famille constituée de deux frères atteints du PMS, portant une même délétion de 2,15 Mb sur le 22qter (22q13.32q13.33), et qui avaient également développé des troubles bipolaires atypiques (Verhoeven et al., 2012). Un *case report* additionnel a décrit quatre patients avec PMS et troubles bipolaires (Denayer et al., 2012). Le diagnostic du TBP était basé sur la présence d'au moins un épisode maniaque avec irritabilité, agitation et diminution du besoin de sommeil. Vucurovic et al. ont reporté quant à eux un patient de 18 ans, portant des délétions multiples de *novovo* sur *SHANK3*, qui affichait des caractéristiques de trouble bipolaire associées à de la démence (Vucurovic et al., 2012). Un an plus tard, Verhoeven et al. complètent ces observations en décrivant une autre patiente atteinte du PMS, qui avait également développé des troubles bipolaires affectifs atypiques à l'âge adulte (Verhoeven et al., 2013).

d. SHANK et la schizophrénie

La schizophrénie est un désordre neuropsychiatrique chronique qui affecte environ 1 % de la population générale. Elle est caractérisée principalement par des symptômes positifs chroniques (hallucinations, délires et troubles de la pensée) ainsi que des symptômes négatifs (retrait social, apathie, émoussement affectif) et des déficits cognitifs qui apparaissent à l'adolescence ou au début de la vie adulte. La plupart des patients sont traités avec des antipsychotiques anti-dopaminergiques, car l'hypothèse classique énoncée de la cause des symptômes positifs de cette maladie est une hyperactivité de la transmission dopaminergique. Cependant, de par leur effet spécifique, les antipsychotiques n'ont que peu d'effets sur la dysfonction cognitive et les symptômes négatifs associés à la schizophrénie.

Cette maladie est due à une forte composante génétique et environnementale. Elle est très complexe de par les multiples gènes de susceptibilité mis en jeu, qui ont chacun un faible effet, mais qui agissent en conjugaison avec des processus épigénétiques et des facteurs environnementaux très peu connus. Malgré qu'il soit clair qu'un fort impact génétique existe, la base génétique est encore vague, mais les gènes de susceptibilité semblent converger vers un rôle commun dans la plasticité synaptique et le développement et la stabilisation du microcircuit cortical. L'hypothèse d'une dysfonction synaptique est d'ailleurs confortée par l'observation, chez certains patients schizophrènes, d'anomalies de structures des épines dendritiques dans l'hippocampe et le néocortex (Harrison and Weinberger, 2004). On peut citer comme gènes de susceptibilité : la *neuréguline-1 (NRG1)*, la *catéchol-O-méthyltransférase (COMT)*, la *proline déshydrogénase (PRODH)*, la *dysbindine (DTNBP1)*, le *récepteur métabotropique au glutamate de type 3 (GRM3)* ou encore la *calcineurine (CN)* (Harrison and Weinberger, 2004) (Figure 16).

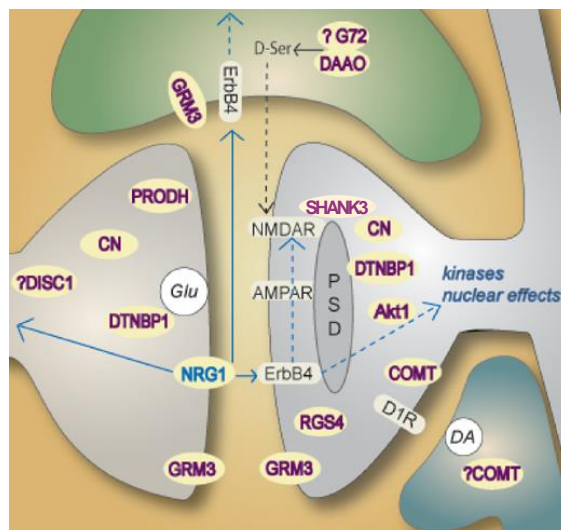


Figure 16 : Localisation des protéines codées par les gènes de susceptibilité de la SCZ. Les protéines de susceptibilité, localisées dans les circuits neuronaux corticaux, sont entourées en jaune. A gauche, un terminal synaptique excitateur en contact avec une épine dendritique d'un neurone pyramidal (à droite). Apposés à la synapse, sont visualisés également un afférent dopaminergique (en bleu-vert) et une cellule gliale (vert). Issue de Harrison and Weinberger, 2004.

Des mutations dans *SHANK3* ont été plus récemment associées à ce trouble (Gauthier et al., 2010). Dans une étude criblant un groupe de patients schizophrènes de 185 personnes, deux familles non apparentées ont été identifiées pour avoir des mutations hétérozygotes *de novo* sur le gène *SHANK3* (R1117X et R536W). La mutation non sens R1117X résulte en une protéine SHANK3 tronquée, sans la partie C terminale, et a été retrouvée chez trois frères atteints de schizophrénie avec différents degrés de déficience intellectuelle. La partie manquante de la protéine étant nécessaire pour la localisation synaptique (Boeckers et al., 2005), une étude a montré que la mutation engendrerait une accumulation de la protéine SHANK3 dans le noyau, qui pourrait être un processus pathologique responsable de la schizophrénie (Grabrucker et al., 2014). La mutation faux sens R536W a quant à elle été retrouvée chez une patiente schizophrène avec des déficits du langage. La limite de cette étude réside dans le fait que les patients identifiés exhibent des perturbations dans leurs capacités intellectuelles, comme c'est souvent le cas chez les individus atteints d'autisme, avant même le diagnostic de schizophrénie.

Des études récentes reportent des CNV *de novo* sur le gène *SHANK3* qui pourraient être un facteur de risque pour le déclenchement de la schizophrénie (Stefansson et al., 2008 ; Xu et al., 2008). Enfin de nombreuses études ont relié le locus 22q13, qui inclue *SHANK3*, à des familles atteintes de schizophrénie (Condra et al., 2007 ; Jorgensen et al., 2002 ; Verma et al., 2005).

A l'inverse, en 2007, Failla et al. ont reporté la description d'une patiente, avec une duplication de 5,4 Mb en 22q13.3-qter comprenant le gène *SHANK3*, qui a également développé une schizophrénie avec de nombreux autres symptômes associés (Failla et al., 2007). Cela suggère donc encore qu'un dosage fin de SHANK3 est nécessaire ; et qu'une quelconque perturbation de son expression, que ce soit une diminution ou une augmentation, peut induire des désordres synaptiques couplés à des troubles psychiatriques, tels que la schizophrénie.

L'importance du dosage de SHANK3 a aussi été supportée par la découverte que certains micro-ARN ciblant SHANK3 étaient dérégulés chez des patients atteints de schizophrénie. Ainsi, miR-7,

également dérégulé chez des patients atteints d'autisme et ayant comme cible SHANK3, a également été relié à la schizophrénie. En effet, une augmentation importante de l'expression de ce miR a été observée chez 50 patients schizophrènes par rapport aux contrôles. *In vitro*, cette étude a pu valider que la surexpression de miR-7 diminuait l'expression de l'ARNm de SHANK3 et de sa protéine (Zhang et al., 2015). De la même façon, l'étude *post mortem* de 21 patients atteints de schizophrénie, a permis d'observer l'expression anormale de miR-15, qui a également pour cible prédictible SHANK3 (Beveridge et al., 2010).

De façon intéressante, en prenant en considération que des mutations sur *SHANK3* ont également été reportées dans des cas d'autisme, l'identification de mutations sur *SHANK3* chez des patients schizophrènes suggère qu'un mécanisme moléculaire génétique similaire gouvernerait ces deux maladies neuro-développementales.

Jusqu'à maintenant aucune mutation sur *SHANK1* n'a été reportée chez des patients SCZ. Cependant Lennertz et al. (2012) ont analysés cinq SNP sur *SHANK1* chez 199 patients atteints de schizophrénie et 206 contrôles, et ont trouvé une association significative entre l'allèle T du SNP rs3810280 localisé dans le promoteur de *SHANK1* et la réduction de la mémoire de travail auditive chez les patients SCZ (Lennertz et al., 2012). Cette étude suggère ainsi le rôle de SHANK1 dans le développement des déficits de la mémoire de travail dans la schizophrénie. Une étude très récente, portant sur le séquençage de *SHANK2* chez 481 patients et 659 individus contrôles, a permis d'identifier une augmentation significative du nombre de variants faux sens sur *SHANK2* chez les individus SCZ comparé aux contrôles (6,9 % contre 3,9 %). Pour connaître l'impact de ces mutations, quatre variants identifiés chez les patients SCZ (S610Y, R958S, P1119T and A1731S) ont été étudiés *in vitro* dans des cultures de neurones primaires, et ont révélé des déficits fonctionnels de différents degrés, suggérant le rôle causatif de variants rares de *SHANK2* dans la schizophrénie (Peykov et al., 2015).

Pour conclure des variants sur les gènes de la famille *SHANK* sembleraient perturber leurs fonctions et causer de multiples maladies (par exemple, déficience intellectuelle, TSA et SCZ). Le mécanisme moléculaire exact n'est pas encore connu, et les réseaux affectés par les mutations sur *SHANK2* sont encore flous dans la SCZ même si des hypothèses convergent vers l'implication de l'altération de la fonction des récepteurs au NMDA.

e. SHANK et la maladie d'Alzheimer

Alors qu'aucune mutation sur les gènes *SHANK* n'a encore été reportée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (*Alzheimer's Disease*, AD), des études neurobiologiques mettent en avant un lien possible entre SHANK et l'AD. En effet des études ont lié le désassemblage de la plateforme SHANK avec la neurodégénérescence liée à l'AD. Tout d'abord, l'accumulation d'oligomères solubles β -Amyloïdes ($A\beta$) dans des cultures de neurones corticaux de rat a pour conséquence une réduction synaptique des niveaux d'HOMER1b et de SHANK1 (Roselli et al., 2009). Une diminution similaire de SHANK1 et de SHANK3 a été observé dans le cortex de modèles de souris transgéniques pour la maladie et de patients atteints d'AD (Pham et al., 2010). De plus, une étude centrée sur l'utilisation de tissus de cerveaux humains a montré que les

protéines SHANK sont dramatiquement altérées chez les individus malades. Le niveau de SHANK2 dans les synaptosomes fronto-corticaux des patients est augmenté alors que le niveau de SHANK3 est diminué (SHANK1 reste stable). La diminution de SHANK3 a été reliée à une augmentation de son ubiquitinylation, indiquant une activité anormale du système ubiquitine-protéasome. Ces changements pathologiques mènent à une désorganisation des récepteurs glutamate au niveau de la plateforme postsynaptique contribuant à la dysfonction des récepteurs au NMDA et à l'AMPA au niveau de la densité postsynaptique chez les patients AD (Gong et al., 2009). Dans ce contexte, il est important de mentionner que les plateformes SHANK sont organisées et stabilisées par le zinc au niveau de leur domaine SAM (Baron et al., 2006 ; Grabrucker et al., 2011a ; Gundelfinger et al., 2006). Or l'homéostasie du zinc est fortement dérégulée dans l'AD (Prakash et al., 2015), le zinc étant notamment séquestré par l'accumulation d'oligomères A β , ce qui semblerait être une cause possible de l'induction du désassemblage de la plateforme SHANK dans la pathologie.

En conclusion, la dérégulation de SHANK semble faire partie du phénotype moléculaire de l'AD. De futures investigations du gène *SHANK* chez des patients atteints d'AD pourra nous dire si effectivement des mutations dans le gène *SHANK3* peuvent être un facteur de risque pour l'AD.

f. Les cas de duplication de SHANK

Quelques duplications 22q13, couvrant le gène *SHANK3*, ont été reportées chez des patients atteints du syndrome Asperger, de trouble de déficit de l'attention avec hyperactivité ou de schizophrénie (Durand et al., 2007 ; Failla et al., 2007 ; Moessner et al., 2007) indiquant que, de même qu'une haploinsuffisance du gène, une augmentation de l'expression de *SHANK3* peut être tout aussi délétère. Cependant comme les cas de duplications concernent de larges régions génomiques (plus de 0,8 Mb), impliquant plus de 20 gènes, l'implication d'une surexpression de *SHANK3* dans les désordres neurologiques n'a pas encore été bien établie.

La génération d'une souris transgénique surexprimant SHANK3 (+ 50 % environ) a permis d'avoir une preuve supplémentaire de l'implication de la surexpression de SHANK3 dans des désordres neurologiques (Han et al., 2013). En effet, celle-ci montre un comportement hyperkinésique avec une augmentation de son activité locomotrice et de sa vitesse ainsi qu'une hyperactivité. Un comportement similaire à celui observé chez l'Homme durant des épisodes maniaques a également été reporté (rythmes circadiens anormaux et comportements hyperphagiques). Les souris transgéniques montrent également une diminution des interactions sociales, qui est également été observée chez les patients ayant ces larges duplications 22q13 (Durand et al., 2007 ; Failla et al., 2007).

De façon intéressante, en normalisant les niveaux de SHANK3 par croisement de ces souris avec des souris SHANK3B \pm (Peça et al., 2011) le phénotype d'hyperactivité et les comportements maniaques sont corrigés, faisant penser que la surexpression de SHANK3 causée par la duplication 22q13 participe à l'hyperkinésie chez l'Homme et que ces symptômes sont réversibles. Deux patients ont également été reportés dans ce même article pour avoir les plus petites duplications 22q13 connues à ce jour, comprenant le gène *SHANK3* (Han et al., 2013). Ces patients ont développé des troubles ADHD et des troubles bipolaires. La similarité des phénotypes neurocomportementaux entre le modèle de souris et les patients avec une duplication de *SHANK3*

supporte une fois de plus la notion que la surexpression de SHANK3 résulterait en des désordres hyperkinétiques de type maniaque chez l'Homme. Ainsi, que l'expression de SHANK3 soit diminuée ou augmentée, cela semble résulter chez l'homme en un phénotype neuropsychiatrique marqué et une prédisposition à l'épilepsie qui met en avant l'importance d'un dosage fin de SHANK3.

Pour conclure de nombreuses mutations dans *SHANK* ont été retrouvées chez des individus avec divers troubles neuropsychiatriques, incluant TSA, SCZ et TBP. Ces observations prises ensembles montrent non seulement que la perturbation de SHANK est liée à de nombreuses neuropathologies, mais supportent aussi de façon plus large l'hypothèse du rôle crucial de la synapse dans les maladies neuropsychiatriques (synaptopathies).

Les différents types de mutations (par exemple, mutations ponctuelles versus de larges délétions) et domaines touchés dans la protéine, peuvent être une possible explication de la variabilité phénotypique observée pour les mutations de *SHANK3*. Une autre possibilité est la différence de fond génétique des patients qui peut contribuer à la variabilité phénotypique des mutations. Quoiqu'il en soit, des études supplémentaires devront être menées pour déterminer quels facteurs génétiques et/ou environnementaux peuvent avoir une incidence sur l'expressivité des mutations de *SHANK3*. Autrement dit, il sera important de déterminer pourquoi une mutation sur *SHANK3* a pour conséquence chez un patient donné le développement d'une maladie neurologique plutôt qu'une autre, avec un phénotype plus ou moins sévère.

2. La famille SHANK

Il y a trois gènes SHANK (nom provenant de ses domaines SH3 et ankyrine), aussi connus sous le nom de ProSAP, SSTRIP, cortBP, Synamon et Spank, dans le génome humain. Chacun se situe sur un chromosome différent, le gène *SHANK1* (55,1 kb) étant localisé sur le chromosome 19q13.33, *SHANK2* (621,8 kb) sur le chromosome 11q13.3 et *SHANK3* (55,1 kb) sur le chromosome 22q13.3. Ils codent pour trois protéines très homologues les unes des autres de par leur structure : SHANK1, ProSAP1/SHANK2 et ProSAP2/SHANK3 (Boeckers et al., 1999a ; Naisbitt et al., 1999 ; Tu et al., 1999). La famille SHANK comprend de nombreux domaines : un domaine formé de répétitions d'ankyrine (ANK) au niveau N-terminal, suivi d'un domaine Src homology 3 (SH3), d'un domaine PSD-95/discs large/zone occludens-1 (PDZ), d'une longue séquence riche en proline (Pro) contenant un site de liaison avec les protéines HOMER (Hbs) et cortactine (ppl), et d'un motif alpha stérile (SAM) à l'extrémité C-terminale (Figure 17).

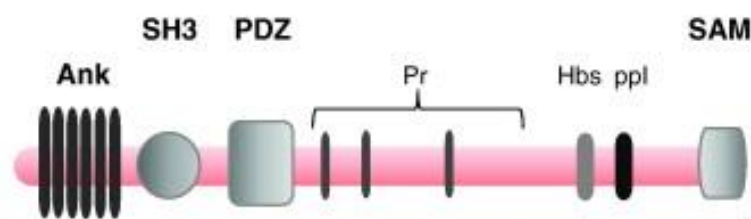


Figure 17 : Vue d'ensemble de la structure des protéines SHANK et de ses différents domaines. Issue de Grabrucker et al., 2011b.

a. Profil d'expression

Le profil d'expression des différents membres de la famille SHANK est distinct malgré un certain recouvrement. Toutes les protéines SHANK peuvent être retrouvées dans le cerveau, mais seul SHANK1 semble être spécifique de celui-ci (Lim et al., 1999). Les trois membres sont présents dans le cortex et l'hippocampe (Böckers et al., 2004 ; Lim et al., 1999) mais montrent une différence d'expression dans le cervelet. Les transcrits de SHANK3 ont pu être identifiés dans tous les tissus, à des taux d'expression variables (Lim et al., 1999), SHANK3 étant abondamment exprimé dans le cœur et modérément dans le cerveau et la rate (Lim et al., 1999). Au niveau du cerveau, que ce soit chez l'Homme ou le rat, SHANK3 est exprimé préférentiellement dans le cortex cérébral et dans le cervelet au niveau des cellules granulaires (Böckers et al., 2004 ; Bonaglia et al., 2001). L'expression de SHANK3 peut être différente d'une région du cerveau à l'autre, du moins chez la souris. Par exemple, les quantités de protéines SHANK3 sont plus importantes dans les couches corticales 2-4 par rapport aux couches 5-6 et dans la région CA1 de l'hippocampe par rapport à la région CA3 (Lee et al., 2015). Il existe également des différences d'expression des isoformes de SHANK en fonction des tissus. De façon intéressante, l'exon 18 de SHANK3 est uniquement exprimé dans le cerveau (Durand et al., 2007). Cette épissage spécifique au niveau du cerveau a également été observé pour SHANK2 et ses exons 19, 20 et 23 (les exons 19 et 20 de SHANK2 étant similaires à l'exon 18 de SHANK3) (Leblond et al., 2012).

Les trois gènes se distinguent également de par leur expression dans le temps. En effet, les ARNm de SHANK1 et SHANK2 s'expriment de façon précoce dans le développement post-natal du cerveau, pendant les étapes initiales de synaptogénèse, alors que le pic d'expression de l'ARNm de SHANK3 se produit plus tardivement lors des étapes cruciales du développement de la plasticité synaptique et de la maturation du circuit neuronal (Böckers et al., 2004 ; Maunakea et al., 2010).

b. Diversité moléculaire

Les gènes *SHANK* montrent une régulation transcriptionnelle complexe avec de multiples promoteurs intragéniques et des épissages alternatifs chez l'Homme et la souris menant à de nombreuses isoformes. En effet, le gène *SHANK3* contient 24 exons, 6 promoteurs et un codon stop alternatif situé dans l'exon 21b menant à un grand nombre d'isoformes encore indéterminé. Les exons concernés par l'épissage alternatif sont les exons codant pour les domaines SH3, Pro et SAM. Des expériences d'analyses *in silico* ont prédit 7 isoformes différentes avec une combinaison de domaines protéiques distincte (SHANK3a-f) illustrés en Figure 18 (Wang et al., 2011) alors qu'une étude récente chez la souris en a identifié 10 (Wang et al., 2014). Les isoformes se distinguent les unes des autres par une composition unique de domaines protéiques. Par exemple, les ARNm de SHANK3e et SHANK3f ne possèdent pas le domaine PDZ, alors que SHANK3b n'a pas le domaine SAM.

Pour conclure, les gènes SHANK, subissent une régulation transcriptionnelle complexe. Par la combinaison de leurs différents promoteurs et sites d'épissage, ils produisent de nombreuses isoformes contenant des domaines variables. Comme chaque domaine est lié à des interactions protéiques spécifiques (voir partie ci-après), il est très probable que chaque isoforme possède des

fonctions distinctes menant à une diversité protéique et fonctionnelle. Cela expliquerait la notion d'isoformes « tissu spécifique » pour SHANK2 et SHANK3 énoncée précédemment. Enfin en contexte pathologique, des mutations présentes sur ces gènes, selon leur localisation ou leur nature, ne toucheront pas les mêmes isoformes et auront des conséquences phénotypiques différentes. Par exemple, des mutations sur le gène *SHANK3* touchant le domaine ANK ne concerneront que les deux formes longues SHANK3a et SHANK3b alors que des mutations dans le domaine Pro auront des conséquences plus larges sur les différentes isoformes de SHANK. Au contraire, les larges délétions concernant tout le gène *SHANK3* auront comme conséquence la disparition de toutes ses isoformes. Cette hypothèse pourrait offrir une explication de l'hétérogénéité clinique observée pour les cas d'autisme causés par des mutations sur les gènes *SHANK* ; ce principe pouvant être d'ailleurs appliqué à d'autres cas d'autisme causés par des mutations sur d'autres gènes dont la régulation transcriptionnelle est complexe. Un domaine important de recherche pour le futur sera donc de déterminer la fonction précise de chaque isoforme *in vivo*, leur régulation individuelle au cours du développement et leur impact sur la synapse et sur les phénotypes comportementaux.

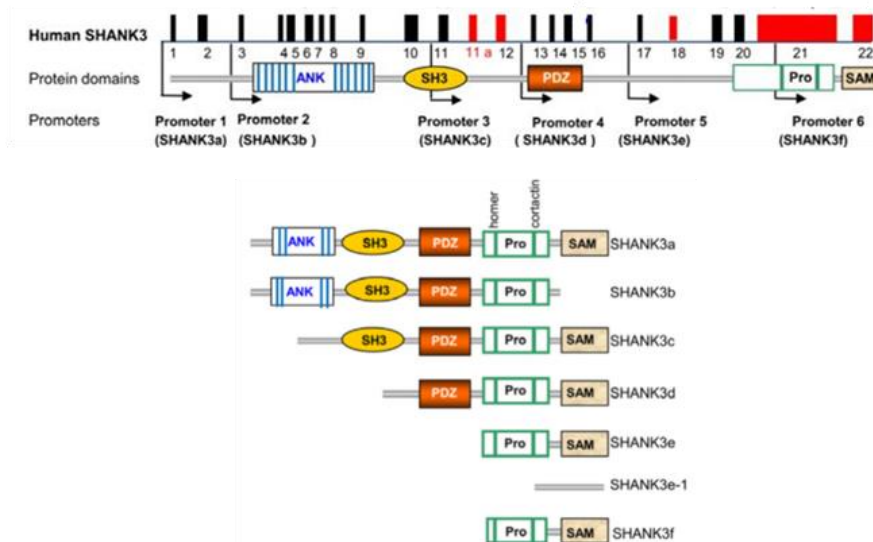


Figure 18 : Diversité moléculaire de SHANK3. L'existence de nombreux promoteurs indiqués par des flèches noires et d'exons alternatifs en rouge permet la production de nombreuses isoformes. Issue de Jiang and Ehlers, 2013.

c. Localisation subcellulaire des protéines SHANK3

Les gènes SHANK codent pour de relativement grosses protéines, SHANK3 possédant par exemple 1 731 acides aminés (Bonaglia et al., 2001). Dans le cerveau, les protéines SHANK sont des protéines d'échafaudage principalement exprimées dans les neurones, et plus particulièrement dans les densités postsynaptiques des synapses excitatrices (Figure 19) où elles se trouvent dans une région plus « basse » que PSD-95 (Naisbitt et al., 1999). C'est le domaine SAM de SHANK3 qui est responsable de sa localisation synaptique (Boeckers et al., 2005). De par leurs nombreux domaines, elles peuvent se lier à de multiples partenaires protéiques et créer un grand complexe protéique au sein de la PSD.

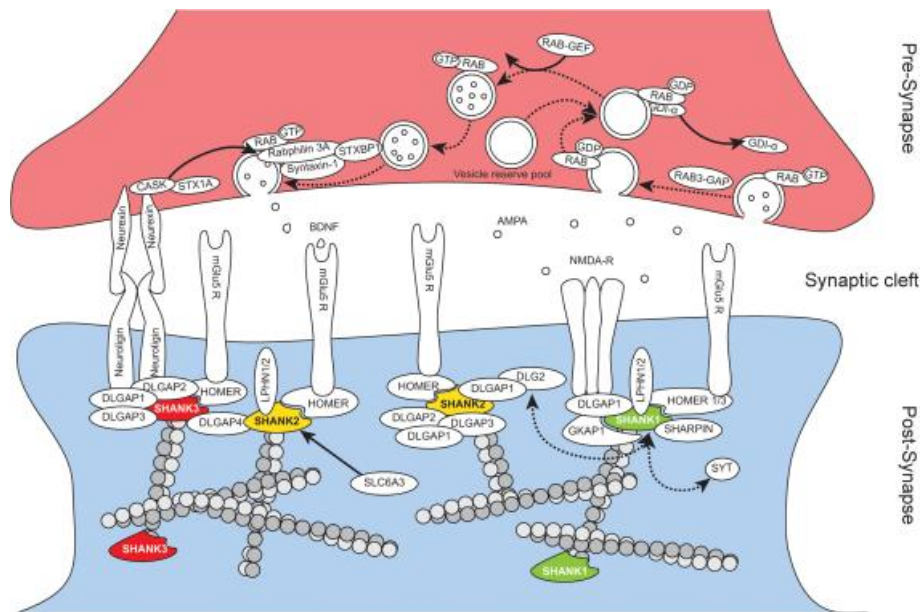


Figure 19 : Localisation des protéines SHANK dans les synapses. Issue de Guilmatre et al., 2014.

3. Partenaires et rôles des protéines SHANK

Les protéines SHANK, en construisant de larges complexes protéiques homo ou hétéromériques au niveau des synapses excitatrices, organisent la machinerie protéique de la PSD. Elles jouent ainsi un rôle central au niveau de la synaptogénèse dans la formation de la plateforme postsynaptique (PSP) ; au niveau de la maturation et de la plasticité synaptique, dans l'intégration du réseau protéique des récepteurs au glutamate ; et dans le maintien des structures synaptiques à la PSD (Baron et al., 2006 ; Grabrucker et al., 2011a ; Naisbitt et al., 1999). Ces protéines sont d'autant plus importantes qu'il n'y a pas moins de 300 molécules SHANK par site postsynaptique, représentant environ 5 % des protéines synaptiques totales (Sugiyama et al., 2005). Il n'est donc pas surprenant qu'une altération du dosage de SHANK puisse profondément affecter la morphologie et la fonction synaptique.

a. Rôle de plateforme

SHANK compte de nombreux partenaires protéiques qui leur confèrent un rôle maître dans l'architecture de la PSD (Figure 20, Tableau 5). Ces trois protéines SHANK, pourtant de structure similaire, ont des divergences dans leurs fonctions, leurs propriétés et leurs interactions. Tout d'abord, SHANK est considérée comme une « plateforme » grâce à sa capacité d'auto-association et d'oligomérisation, qui lui permet l'assemblage de larges feuilles SHANK et de former ainsi une PSP (Baron et al., 2006 ; Grabrucker et al., 2011a ; Gundelfinger et al., 2006). Cette auto-association s'effectue principalement *via* son domaine SAM (Naisbitt et al., 1999), mais semble également être possible *via* son domaines PDZ (Im et al., 2003) ou encore par une interaction entre ses domaines SH3 et ANK (Romorini et al., 2004). Il a été montré que l'assemblage de la PSP créée par l'association des domaines SAM de SHANK3 peut être régulée par les ions zinc (Zn^{2+}) (Baron et al., 2006 ; Grabrucker et al., 2011a ; Gundelfinger et al., 2006) avec l'hypothèse que des ions Zn^{2+} , localisés dans les vésicules présynaptiques des terminaux glutamatergiques,

peuvent être libérés en même temps que le glutamate et être délivrés dans le compartiment postsynaptique. Ils affecteraient ainsi la concentration synaptique de SHANK2 et SHANK3 (mais pas de SHANK1) et constitueraient un mécanisme de régulation de formation de nouvelles synapses ainsi que de stabilisation, maturation et plasticité des synapses matures (Gundelfinger et al., 2006).

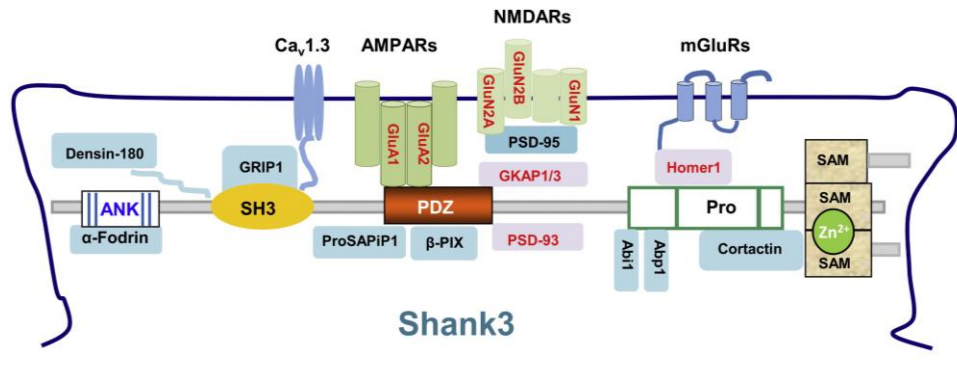


Figure 20 : Représentation schématique des domaines de SHANK3 et de leurs principales interactions protéiques à la PSD. Issue de Jiang and Ehlers, 2013.

b. Formation/maturation et maintien des synapses

Le rôle des protéines SHANK dans la formation et le maintien des synapses a été démontré à de multiples reprises. Par exemple, une étude a mis en évidence qu'une perte ou gain des protéines SHANK influençait directement le nombre de synapses dans des neurones hippocampaux de 9 jours *in vitro*. En effet, la perte des protéines SHANK, rendue possible par ShRNA (*small hairpin RNA*), provoque une réduction significative de la densité des synapses (Grabrucker et al., 2011a). Une invalidation de *SHANK3* dans des neurones hippocampaux murins mène, de la même façon, à des épines moins nombreuses, plus petites et immatures, accompagnées d'une augmentation de leur longueur (Verpelli et al., 2011). Roussignol et al. ont également observé une réduction du nombre des épines dendritiques, *in vitro* dans des neurones hippocampaux, lorsque l'expression de SHANK3 est diminuée, permettant de mettre en évidence le rôle de celui-ci dans le maintien des synapses (Roussignol et al., 2005). De plus, deux études d'invalidation de *SHANK1* ou *SHANK3* chez la souris ont confirmé que la diminution de ces protéines entraînait une diminution de la taille des épines dendritiques (Hung et al., 2008 ; Peça et al., 2011).

A l'inverse, une surexpression de SHANK2 ou SHANK3 cause une augmentation significative du nombre de synapses, alors que SHANK1 ne produit pas d'effet (Grabrucker et al., 2011a). De plus, SHANK3 est suffisant pour induire la formation de nouvelles épines dendritiques, avec des synapses matures et fonctionnelles, dans des neurones du cortex cérébelleux qui en sont dépourvus *via* le recrutement des récepteurs au NMDA et à l'AMPA (Roussignol et al., 2005). Dans cette étude, le domaine C-terminal (incluant les domaines HOMER, Cortactine et SAM) semble être important pour l'induction de ces nouvelles épines. Des expériences *in vitro* de surexpression de SHANK1 dans des neurones hippocampaux de rats ont permis de déterminer l'implication des protéines SHANK dans la maturation et la croissance des synapses, puisque SHANK, *via* le recrutement d'HOMER, est capable d'augmenter la taille des épines dendritiques (Sala et al., 2001).

c. Lien avec le cytosquelette d'actine

La fonction spécifique des protéines SHANK dans les épines dendritiques est probablement liée au fait qu'elles interagissent avec de nombreuses protéines partenaires du cytosquelette d'actine, les ABP (actin-binding protein). Il s'agit par exemple de l' α -fodrine (Böckers et al., 2001), de la cortactine (cortical-actin-binding protein) (Naisbitt et al., 1999), d'Abp1 (Actin binding protein 1) (Qualmann et al., 2004) ou de SPIN90 (Kim et al., 2009b). Le rôle de la cortactine et d'Abp1 a d'ailleurs déjà été démontré dans la régulation de la morphologie des épines dendritiques en contrôlant la polymérisation de l'actine (Haeckel et al., 2008 ; Hering and Sheng, 2003). Sachant que la cortactine favorise aussi la croissance neuritique et que la déplétion d'Abp1 résulte en une augmentation de la longueur de l'axone dans les étapes précoces du développement (Pinyol et al., 2007), cela suggèrerait que SHANK3, en plus d'être important pour la formation des dendrites, serait aussi nécessaire pour la croissance et les connectivités à longues distances. Une étude montre d'ailleurs que SHANK3 participe à la motilité des cônes de croissance et donc à l'extension neuritique (Durand et al., 2012). SHANK interagit aussi avec un facteur d'échange des GTPases de la famille rho, β -PIX (PAX interacting exchange factor), qui régule l'assemblage et l'organisation des filaments d'actine en contrôlant l'activité de protéines qui interagissent directement avec l'actine (Ridley, 2006). Les protéines SHANK peuvent se lier aussi de manière indirecte *via* la protéine HOMER, avec d'autres protéines responsables du remodelage de l'actine comme l'oligophérine (Govek et al., 2004) ou CdC42 (Cell division control protein 42 homolog) (Shiraishi-Yamaguchi et al., 2009). Oligophérine 1 a été notamment considérée importante pour la morphogénèse des épines dendritiques (Govek et al., 2004 ; Khelifaoui et al., 2007). CdC42 permet quant à elle de faire le lien entre SHANK et IRSp53, un substrat d'un récepteur kinase à l'insuline, mettant en évidence que le remodelage de l'actine *via* SHANK pouvait être dépendant de l'insuline (Bockmann et al., 2002 ; Soltau et al., 2002). Une autre étude a identifié Abi-1 (Abelson tyrosine kinase interacting protein 1) comme étant un partenaire de SHANK3, impliqué dans le contrôle de l'assemblage de l'actine lors du développement des épines (Proepper et al., 2007). Enfin, les protéines de la famille SPAR (Spine-associated RapGAP) qui régulent de façon cruciale le cytosquelette d'actine peuvent être aussi liées à SHANK3 *via* ProSAPiP1 (ProSAP-interacting protein 1) (Wendholt et al., 2006).

Le cytosquelette des épines dendritiques étant principalement constitué d'actine, l'interaction de SHANK avec les ABP, et son rôle de protéine d'échafaudage, lui permet de lier ses partenaires protéiques à ce cytosquelette (Ehlers, 1999). Ainsi, avec le recoupement de toutes ces données, cela suggère que SHANK a un rôle important d'interface dans la liaison fonctionnelle des protéines membranaires postsynaptiques, telles que les récepteurs au glutamate, avec le cytosquelette d'actine. SHANK régule ainsi la taille et la morphologie des synapses excitatrices et des épines dendritiques en créant une connexion fonctionnelle entre les stimulations synaptiques et les réarrangements du cytosquelette (Boeckers et al., 2002).

d. Lien avec la transcription et la traduction

SHANK3 interagit avec Abi-1 (Proepper et al., 2007) et LAPSER 1 (Schmeisser et al., 2009), deux protéines qui se déplacent de la PSD vers le noyau, de manière activité dépendante, et qui induisent la transcription et la traduction de gènes. SHANK3 amène Abi-1 à la synapse où elle

joue elle aussi un rôle dans la formation et la maturation des synapses. Une fois que la PSD est bien établie, la stimulation des récepteurs au NMDA va entraîner la relocalisation de Abi-1 vers le noyau où elle devient impliquée dans la régulation de la transcription (Proepper et al., 2007). De la même façon, une étude a montré que SHANK3 était aussi capable de se déplacer de la synapse au noyau, de manière activité dépendante, et d'influencer le niveau de transcription de plusieurs gènes cibles (Grabrucker et al., 2014). Ainsi, SHANK, *via* Abi-1 ou LAPSER, participe probablement aux phénomènes de plasticité à long terme, qui implique une transcription génique. Dans ce contexte, il n'est pas surprenant que SHANK3 forme un second complexe protéique, distinct du complexe PSD, au niveau du noyau. Des résultats ont ainsi montré de nouveaux partenaires de SHANK comme des médiateurs de l'ARN polymérase II (MED14, MED23) et des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes hnRNP (RALY, ROA3, ROA2, ROA0) (Grabrucker et al., 2014) qui sont impliqués dans la transcription, la traduction et le turnover des ARNm (Krecic and Swanson, 1999). De par ces interactions, la protéine SHANK3 nucléaire influencerait donc la transcription des gènes *via* l'assemblage ou la modification du complexe hnRNP.

e. Lien avec les récepteurs glutamatergiques et l'activité neuronale

Les protéines SHANK sont impliquées dans le recrutement, le regroupement, et le couplage fonctionnel des récepteurs glutamatergiques AMPA, NMDA et mGluR, pouvant ainsi moduler l'activité glutamatergique et la plasticité synaptique. Une multitude d'interaction protéine-protéine existe entre les protéines SHANK et ces différents types de récepteurs. Ces interactions peuvent se produire de manière directe et indirecte *via* des protéines adaptatrices. Parmi celles-ci il y a les GKAPs, des molécules qui peuvent se lier au domaine PDZ de SHANK *via* leur partie C-terminale, mais aussi les MAGUKs (membrane-associated guanylate kinase) tels que PSD-93 et PSD-95 qui s'associent *via* leur N terminal (Boeckers et al., 1999; Naisbitt et al., 1999).

Des études ont permis de montrer que SHANK1 et SHANK3 pouvaient se lier de façon directe et indirecte *via* HOMER aux récepteurs mGluR1 et mGluR5 (Sala et al., 2001, 2005 ; Tu et al., 1999). Cette interaction permet entre autre le recrutement du canal à calcium IP₃R (intracellular calcium channel inositol trisphosphate receptor) dans les épines dendritiques, jouant sur l'homéostasie locale du calcium et la signalisation neuronale globale. De plus, une expérience d'inactivation de SHANK3 dans des neurones hippocampaux murins a montré que la perte de la protéine était associée à une diminution de l'expression synaptique de mGluR5 (mais pas de son ARNm), et à des défauts de transmission synaptique glutamatergique de type LTD (Verpelli et al., 2011).

Une autre étude *in vitro* a permis de montrer que l'expression de SHANK3 dans des neurones permettait le recrutement de nouvelles protéines NMDA fonctionnelles, *via* le domaine PDZ, ainsi que des récepteurs mGluR1, *via* les domaines SH3 et Hbs, accompagné d'une augmentation des courants excitateurs (Roussignol et al., 2005). A noter que SHANK et les récepteurs NMDA semblent se réguler mutuellement puisqu'une étude a mis en évidence le recrutement et l'accumulation des protéines SHANK au niveau de la PSD lorsque que des neurones hippocampaux de rats sont activés avec du NMDA (Tao-Cheng et al., 2014).

Concernant le lien entre AMPA et SHANK, la formation du complexe SHANK-HOMER a été impliquée dans le recrutement des récepteurs à l'AMPA ainsi que dans la maturation des synapses

et l'augmentation de la force synaptique (Sala et al., 2001). A l'inverse la délétion du gène *SHANK3*, dans des modèles de souris, induit des altérations de LTP, associées à une diminution de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA (Bozdagi et al., 2010 ; Peça et al., 2011 ; Wang et al., 2011). De plus, une étude a montré que les membres de la famille SHANK peuvent se lier de manière directe, *via* leur domaine PDZ, à la sous-unité GluR1 des récepteurs à l'AMPA (Uchino et al., 2006). Les protéines SHANK1 et SHANK2 peuvent s'associer également, par une courte séquence riche en sérine, à la dynamine-2 (Okamoto et al., 2001) une protéine GTPase à la PSD qui est essentielle au bon fonctionnement de la machinerie d'endocytose des récepteurs à l'AMPA. Ce processus permet de jouer un rôle important dans la plasticité synaptique, en régulant la disponibilité des récepteurs glutamatergiques (Man et al., 2000). Une autre étude a montré que SHANK, en combinaison avec la protéine adaptatrice HOMER, pouvait se lier également à la dynamine 3, participant à la bonne localisation de la zone d'endocytose. En effet, la perturbation du complexe dynamine 3-HOMER-SHANK détache la PSD de la zone d'endocytose et conduit à une perte des récepteurs fonctionnels synaptiques à l'AMPA (Lu et al., 2007). De plus, SHANK3 serait également capable de moduler l'exocytose de la sous unité GluR1 d'une manière indirecte en interagissant avec Rich2 (Rho-GAP interacting CIP4 homolog 2) (Raynaud et al., 2013) ou encore GRIP (Glutamate receptor-interacting protein 1) (Sheng and Kim, 2011).

Toutes ces observations et interactions définissent un rôle crucial des protéines SHANK sur les différents sous types de récepteurs au glutamate, leur liaison entre eux, leur recrutement et leur maintien. De plus, elles régulent l'homéostasie du calcium intracellulaire et moduleraient ainsi la maturation et la plasticité synaptique. Leur rôle va encore plus loin dans l'activité et le bon fonctionnement synaptique car les protéines SHANK ne régulent pas seulement les récepteurs au glutamate mais aussi les récepteurs couplés aux protéines G et des canaux ioniques protéiques voltage-dépendants. Parmi les récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur SSTR2 (somatostatin receptor 2) a été identifié comme étant maintenu à la PSD par son interaction avec SHANK *via* son domaine PDZ (Zitzer et al., 1999).

f. Autres partenaires

SHANK interagit avec d'autres protéines d'échafaudage, comme la densine-180. La densine-180 en interagissant avec la CamKII et/ou la δ -caténine est capable de moduler la formation de neurites et de nouvelles ramifications. Ainsi, une étude a montré que la liaison de SHANK avec la densine 180 permettait sa bonne localisation à la PSD et régulait négativement la formation de nouvelles neurites en bloquant son lien avec la δ -caténine (Quitsch et al., 2005).

Les protéines SHANK1 et SHANK3 se lient également aux protéines d'adhésion synaptiques neuroligines *via* leur PDZ (Meyer et al., 2004) suggérant aussi un rôle des protéines SHANK dans le contact adhésif de la synapse et la synaptogénèse.

Enfin SHANK interagit avec la Sharpine (SHANK-associated RH domain interacting protein in postsynaptic density) (Lim et al., 2001), une protéine récemment impliquée dans l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B impliqué entre autres dans la survie cellulaire (Tokunaga et al., 2011).

En résumé, SHANK est une protéine essentielle de la PSD dont elle organise l'architecture et régule l'activité, notamment en reliant les protéines d'échafaudage avec les protéines de signalisation, les récepteurs glutamatergiques et le cytosquelette d'actine. En retour, son association avec les autres protéines et l'activité neuronale permettent sa stabilité et sa régulation.

Tableau 5 : Les partenaires de SHANK. Issu de Jiang and Ehlers, 2013.

Domaine	Partenaires	Fonction associée
ANK	α -fodrine, sharpine	Remodelage du cytosquelette d'actine Développement de l'épine dendritique
SH3	GRIP1, Ca _v 1.3, Densine-180	Trafic des récepteurs AMPA Remodelage de l'épine dendritique Transmission synaptique et plasticité Interaction avec CaMKII
PDZ	GKAP1(SAPAP1), GKAP3(SAPAP3), PSD-93, mGluR1/5, récepteurs AMPA, β -PIX, ProSAPiP1, LASPER1, ProSAPiP2, neuroligines, SSTR2	Formation et remodelage de l'épine dendritique Transmission synaptique et plasticité Auto-association
Pro/Hbs/pp1	HOMER1, Dynamine-2, Abp1, Abi1, Cortactine, IRSp53	Régulation du cytosquelette d'actine Remodelage et formation de l'épine dendritique Transmission synaptique et plasticité Endocytose des récepteurs AMPA
SAM	SHANK3	Localisation synaptique Auto-association Site de fixation au Zn ²⁺

4. Régulation de SHANK

On a vu précédemment que le gène SHANK était soumis à une régulation transcriptionnelle complexe mettant en jeu de multiples promoteurs intragéniques et épissages alternatifs. Celle-ci mène à la production de différentes isoformes avec des rôles précis, régie indépendamment de façon spatiale et temporelle.

Chez l'Homme, sept îlots CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) ont été identifiés sur *SHANK1* et *SHANK2* et cinq sur *SHANK3*. En revanche, seul le gène *SHANK3* subit des méthylations sur la plupart de ses îlots CpG qui sont spécifiques d'un tissu donné (Beri et al., 2007 ; Ching et al., 2005). Le profil de méthylation du gène est même différent pour un type cellulaire donné selon les régions du cerveau où il se trouve. Ainsi, la séquence du gène *SHANK3* est hautement méthylée dans les tissus où son expression est faible ou absente et à l'inverse non méthylée dans les tissus où son expression est élevée (cœur, cerveau) (Figure 21). Cette régulation épigénétique a été démontrée *in vitro*. En effet, l'expression de la protéine SHANK3 a été significativement réduite dans des neurones hippocampaux traités avec un agent méthylant, la méthionine. A l'inverse, un traitement de cellules HeLa avec l'agent déméthylant 5-AdC augmente l'expression de la protéine SHANK3 (Beri et al., 2007). Concernant SHANK1 et SHANK2, le rôle de leurs îlots CpG dans la régulation transcriptionnelle n'a pas encore été déterminé.

Il est à noter que tous les îlots dans *SHANK3* sont associés à un ou des exons codants pour des domaines fonctionnels distincts. Ainsi, une étude a montré, de manière *in vivo* et *in vitro*, que la méthylation « tissu-spécifique » concernait des régions intragéniques hautement conservées, et qu'elle régulaient l'activité des promoteurs intragéniques. Ces méthylations moduleraient ainsi l'expression des transcrits alternatifs de manière spécifique selon les tissus, le type cellulaire ou les différentes régions du cerveau (Maunakea et al., 2010). Dans cette étude, contrairement à la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones semble être le mécanisme le plus pertinent pour la régulation des promoteurs intragéniques. En effet, une étude *in vitro* a montré qu'un traitement à la trichostatine A augmentait les transcrits de *SHANK3*, à l'inverse d'un traitement à la 5-AdC qui n'a pas d'effet.

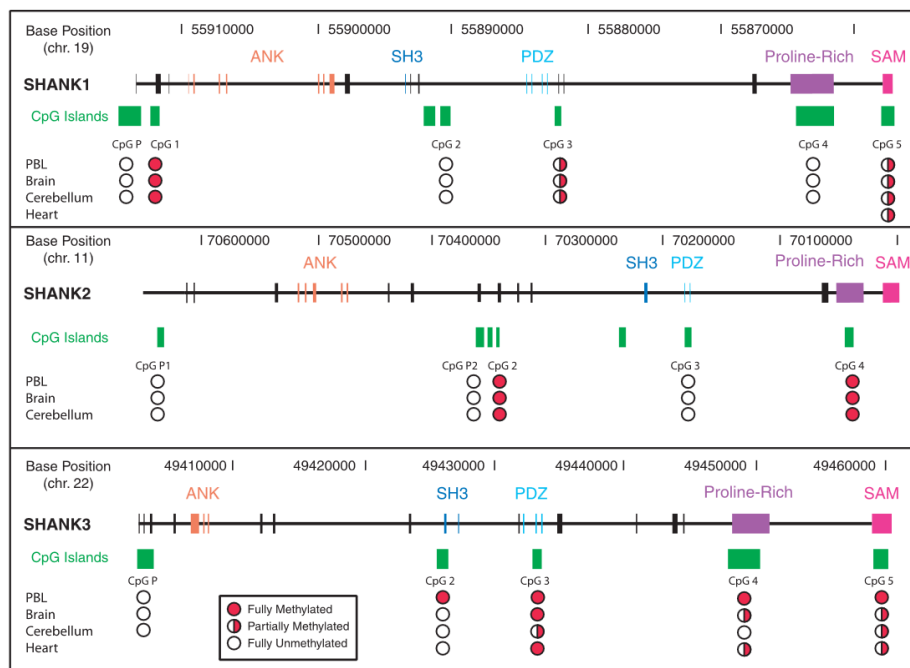


Figure 21 : Position des îlots CpG sur les gènes *SHANK*. Le statut de méthylation des îlots CpG selon les tissus a été spécifié. PBL pour peripheral blood lymphocyte. Issue de Beri et al., 2007.

Comme dit précédemment, les gènes *SHANK* sont régulés temporellement : les transcrits de *SHANK3* sont fortement exprimés pendant le développement du cerveau, puis diminuent dans le cerveau adulte. Il a été suggéré que cette régulation temporelle fine pouvait aussi être contrôlée par le mécanisme épigénétique de méthylation. En effet, Uchino et al. ont montré, dans le néocortex de la souris, que le taux méthylation de l'îlot CpG-2 était temporellement régulé de la même façon, augmentant les premières semaines après la naissance et diminuant ensuite progressivement (Uchino and Waga, 2013).

A l'instar d'autres protéines synaptiques, comme les GKAP, la stabilité et la demi-vie de la protéine *SHANK* est régulée par l'activité neuronale, couplée à des voies incluant multimérisation et ubiquitinylation (Ehlers, 2003 ; Hayashi et al., 2009). En effet, une forte activité neuronale entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome dans les

synapses en conditions normales (Ehlers, 2003). Le réarrangement dynamique de la PSD induit par ce système semble être la base structurale de la régulation des synapses et de leur plasticité. En condition pathologique, dans l'AD, une altération de la régulation de SHANK3 par le système ubiquitine-protéasome a été mise en évidence, menant à une diminution anormale de SHANK3 chez les patients (Gong et al., 2009). Ceci a été corroboré par une étude qui montre une diminution des protéines SHANK au niveau de l'épine dendritique après une activité neuronale potentialisée (Kuriu et al., 2006). Une étude chez la souris a d'ailleurs montré que l'activité neuronale régulait de façon spécifique l'expression des isoformes de SHANK3, indépendamment, de manière temporelle et spatiale (Wang et al., 2014). De plus, son état de dimérisation semble impacter sa régulation : lorsque SHANK est exprimée seule, elle est rapidement dégradée, alors que sa co-expression avec PSD-95 et GKAP la rend plus stable (Romorini et al., 2004). Une étude a démontré également que sa stabilité dépendait particulièrement de ses partenaires du cytosquelette d'actine (Kuriu et al., 2006). Il a été montré enfin que des ARNm de SHANK sont présents au niveau des dendrites (Böckers et al., 2004), permettant une mise à disposition rapide de cette protéine dans la postsynapse et une régulation dynamique et rapide au sein de la synapse.

Finalement, mis à part les régulations classiques mettant en jeu des mécanismes épigénétiques et de dégradation de la protéine, aucun autre moyen de régulation de SHANK n'est encore connu. Pourtant, avec son rôle central dans la synapse et ses nombreux partenaires associés, cette protéine est vraisemblablement régulée finement par de multiples voies. Ces informations font d'autant plus défaut que les protéines SHANK ont un rôle crucial, et qu'un dosage fin est nécessaire pour le bon fonctionnement neuronal. L'étude de la régulation de SHANK3 serait donc non seulement intéressante d'un point de vue fondamental mais aussi prometteur d'un point de vue thérapeutique pour le traitement des différentes maladies provoquées par la dérégulation d'expression de SHANK3 (Partie III-1).

5. Modèles pour l'étude des formes d'autisme liées à SHANK3

a. Modèles de souris SHANK3

Plusieurs lignées de souris déficientes en SHANK3 ont été générées et utilisées pour rechercher la contribution de SHANK3 dans la neuropathologie de l'autisme. Selon les études, pour la génération des modèles animaux, les mutations introduites sur le gène *SHANK3* sont différentes, affectant des zones diverses du gène et de ce fait plus ou moins d'isoformes. Les différences de phénotypes observées entre les modèles en seraient en partie la cause (Tableau 6). Les souris montrent en règle générale des symptômes de type « autistiques » comme des comportements répétitifs (excès de toilettage), et/ou des déficits en communication et interaction sociale, confirmant l'implication de SHANK3 dans l'autisme. De plus, les observations des défauts moléculaires liées à la déficience de *SHANK3* ont permis de grandement améliorer la connaissance sur les rôles de la protéine SHANK3, notamment dans la transmission glutamatergique et la plasticité synaptique.

Bozdagi et al. ont été les premiers à reporter la génération d'une souris déficiente en *SHANK3* avec une délétion ciblée allant de l'exon 4 à l'exon 9, qui code pour le domaine ANK, et qui résulte en la disparition de la forme longue de la protéine SHANK3. Dans cette étude, un modèle de souris homozygote et hétérozygote ont été générés, menant respectivement à la perte totale ou à la réduction de 50 % de la forme longue de la protéine. La souris hétérozygote (*SHANK3*^{+/-}) a été privilégiée pour leur étude puisqu'on observe uniquement des mutations hétérozygotes chez l'homme. Ces souris hétérozygotes montrent une diminution de la transmission synaptique glutamatergique basale et des déficits dans la plasticité, incluant des déficits de LTP (mais pas de LTD), accompagnés d'une expression réduite de la sous-unité GluR1 des récepteurs à l'AMPA. Au niveau phénotypique, les souris *SHANK3*^{+/-} montrent des déficits d'interaction sociale et de communication, les mâles hétérozygotes montrant moins d'interaction avec les femelles (diminution des reniflements et des vocalisations ultrasoniques) (Bozdagi et al., 2010 ; Yang et al., 2012). Ce modèle a ainsi permis un an plus tard de valider que des approches thérapeutiques pour des formes d'autisme dues à des mutations sur *SHANK3* étaient envisageables, puisque l'IGF-1 a été capable de corriger les défauts de plasticité synaptique et les légers déficits moteurs observés chez les souris *SHANK3*^{+/-} (Bozdagi et al., 2013).

Wang et al. ont généré eux aussi un modèle de souris homozygote pour *SHANK3* (*SHANK3*^{-/-}), portant la même délétion que précédemment (exon 4-9), et qui développe des phénotypes assez similaires. En effet, les souris montrent également des défauts dans leur comportement social et dans leur mode de communication avec des défauts de vocalisations. De plus, des comportements répétitifs (augmentation des mouvements de tête et excès de toilettage), des problèmes d'apprentissage et de mémoire, ainsi que des défauts dans la coordination motrice ont été observés. Concernant leur phénotype moléculaire, les souris *SHANK3*^{-/-} présentent également des défauts protéiques synaptiques avec une diminution des protéines HOMER1b/c, GKAP, NR2A et GluR1 à la PSD, accompagnés d'un défaut de plasticité synaptique avec une déficience de LTP. Un léger défaut morphologique a également été observé, avec une augmentation de la longueur des épines dendritiques (Wang et al., 2011).

Peça et al. ont généré deux modèles de souris invalidés pour *SHANK3*. Le premier modèle de souris *SHANK3A*^{-/-} est déficient pour la forme la plus longue de SHANK3 (SHANK3 α) et a été créé en supprimant une partie de la région ANK (exon 4 à 7) du gène. Le deuxième modèle de souris *SHANK3B*^{-/-} est déficient des formes SHANK3 α et β , avec une diminution significative de l'isoforme γ à la PSD grâce à une délétion ciblée de l'exon 13 à l'exon 16, qui code pour le domaine PDZ. Des deux modèles, seul le dernier mutant, pour lequel la délétion est la plus sévère, présente des défauts comportementaux et physiologiques prononcés. En effet, les souris *SHANK3B*^{-/-} développent des déficits d'interactions sociales et par rapport à la nouveauté, alors que les souris *SHANK3A*^{-/-} ne montrent qu'un léger défaut de réponses à la nouveauté. Ajouté à cela, les souris *SHANK3B*^{-/-} montrent des comportements de type anxieux et excessifs, des automutilations et un excès de toilettage, qui ne sont pas observés chez les souris *SHANK3A*^{-/-}.

Concernant les défauts physiologiques, une étude de la composition de la PSD dans le striatum des souris *SHANK3*^{-/-} a permis d'identifier une diminution de SAPAP3, HOMER1 et PSD-93 ainsi que des sous unités des récepteurs glutamatergiques GluR2 (GRIA2), NR2A (GRIN2A) et NR2B (GRIN2B), mettant en lumière une altération de la composition moléculaire de la

machinerie postsynaptique et un possible défaut de la transmission glutamatergique. Cette dernière hypothèse a d'ailleurs été confirmée par l'observation d'une réduction de la fréquence et de l'amplitude des courants excitateurs postsynaptiques des synapses cortico-striatales chez ces souris. Dans cette étude, l'analyse des neurones de projection (MSN pour Medium Spiny Neurons), a également permis d'identifier un problème morphologique neuronal lié à la déficience de SHANK3. En effet, une hypertrophie neuronale, mesurée par la complexification de l'arborisation dendritique, de la longueur dendritique totale et de l'aire de surface a été observé dans les MSN de souris SHANK3B^{-/-} (Peça et al., 2011).

Un modèle de souris homozygote portant la délétion de l'exon 11 (perte des isoformes a, b et c de SHANK3) a également été développé. Celui-ci présente uniquement des comportements répétitifs (excès de toilettage). Concernant le phénotype moléculaire, une augmentation des niveaux de la sous unité NR2B dans l'hippocampe des souris SHANK3 ^{-/-} a été observée pour la première fois. De plus, une augmentation de SHANK2 a été visualisée dans le striatum de ce modèle de souris, suggérant un effet de compensation de celui-ci pour pallier la déficience de SHANK3. De façon intéressante, l'observation inverse (augmentation de SHANK3 dans le striatum) avait été faite chez des souris SHANK2^{-/-} supportant d'autant plus l'hypothèse de compensation (Schmeisser et al., 2012).

Une lignée de souris transgénique déficiente de l'exon 9 (codant pour le domaine ANK) du gène SHANK3 confirme la réduction de la transmission synaptique excitatrice et montre une augmentation de la fréquence des événements synaptiques inhibiteurs spontanés dans l'hippocampe. De façon intéressante, ce modèle a permis de montrer que la fréquence des événements synaptiques inhibiteurs spontanés est quant à elle diminuée dans le cortex préfrontal, suggérant que l'altération du ratio E/I est différente selon les régions du cerveau. D'un point de vue comportemental, ces souris montrent un comportement social normal et un léger comportement répétitif, déterminant que les variants contenant l'exon 9 peuvent avoir un rôle dans le développement de ces phénotypes (Lee et al., 2015).

La première souris homozygote déficiente pour l'exon 21 de SHANK3, incluant le domaine HOMER, a été reportée en 2013. Celle-ci a montré des altérations de la transmission synaptique et de la plasticité de manière assez identique. En effet, la souris présentait une diminution du ratio des courants excitateurs NMDA/AMPA et une réduction des LTP dans l'hippocampe, accompagnées de déficits de coordination motrice, d'apprentissage spatial et de mémoire ainsi que de quelques problèmes sociaux (face à la nouveauté) (Kouser et al., 2013).

Récemment, un modèle de souris réversible a été créé, pour une forme d'autisme connue causée par une mutation insertionnelle d'une guanine dans l'exon 21 du gène SHANK3 menant à un codon stop prématuré et la perte des isoformes de haut poids moléculaires. Ces souris *Shank3*^{G/G} montrent des déficits pour l'apprentissage spatial, des problèmes de coordination motrice et de traitement sensoriel ainsi qu'une altération des réponses à la nouveauté. Au niveau cellulaire, les souris *Shank3*^{G/G} montrent également des déficits de la transmission excitatrice hippocampique et de la plasticité synaptique, accompagnés d'une altération de la réponse synaptique couplée aux récepteurs NMDA (Speed et al., 2015). Ce modèle conçu pour être réversible, grâce à la technologie de recombinaison Cre-Lox permettra pour la première fois d'étudier la réversibilité des symptômes autistiques au cours du temps.

Tableau 6 : Comparaison des phénotypes synaptiques et comportementaux des modèles de souris SHANK3. Adapté de Yoo et al., 2014 et Jiang and Ehlers, 2013.

Génotype et référence	Morphologie synaptique	Transmission basale et plasticité	Composition synaptique	Comportements
<i>SHANK3</i> ^{+/-} Δ4-9 (Bozdagi et al., 2010) (Yang et al., 2012)	Non déterminé	Diminution de la transmission basale Défaut de LTP LTD ok	Réduction de GluR1	Sociaux : moins de reniflement et de vocalisation Répétitifs : excès de toilettage
<i>SHANK3</i> ^{+/-} Δ4-9 (Wang et al., 2011)	Augmentation de la longueur des épines	Pas de différence dans la transmission Défaut de LTP	Réduction de NR2A, GluR1, GKAP, HOMER1	Sociaux : interaction et vocalisations Répétitifs : mouvements de têtes et excès de toilettage Apprentissage et mémoire
<i>SHANK3</i> ^{-/-} Δ4-7 (Peça et al., 2011)	Non déterminé	Légère diminution de la transmission cortico-striatale	Non déterminé	Sociaux : défaut de nouveauté sociale
<i>SHANK3</i> ^{-/-} Δ13-16 (Peça et al., 2011)	Diminution de la densité des épines Complexification de l'arborisation des MSN	Diminution de la transmission cortico-striatale	Réduction de SAPAP3, HOMER1, PSD93, GluR2, NR2A et NR2B	Sociaux : défaut de d'interaction Répétitifs : excès de toilettage Anxiété
<i>SHANK3</i> ^{+/-} Δ11 (Schmeisser et al., 2012)	Non déterminé	Non déterminé	Augmentation de NR2B et SHANK2	Répétitifs : Excès de toilettage
<i>SHANK3</i> ^{-/-} Δ21 (Kouser et al., 2013)	Non déterminé	Diminution du ratio NMDA/AMPA Défaut de LTP	Augmentation de mGluR5 dans les synaptosomes et la PSD	Déficits de coordination motrice, d'apprentissage spatial et de mémoire Sociaux : évasion face à la nouveauté
<i>SHANK3</i> ^{-/-} Δ9 (Lee et al., 2015)	Non déterminé	Altération du ratio E/I	Non déterminé	Répétitifs : augmentation du cabrement dans un nouvel environnement Altération de la mémoire spatiale
<i>SHANK3</i> G/G (Speed et al., 2015)	Non déterminé	Déficits de la transmission excitatrice Défaut de plasticité synaptique Altération de la réponse synaptique couplée aux récepteurs NMDA	Diminution du niveau de phosphorylation de NR2B	Déficits dans l'apprentissage spatial Problèmes de coordination motrice Défauts du traitement sensoriel Altération des réponses à la nouveauté

Alors qu'il n'existe que des mutations hétérozygotes sur *SHANK3* chez les patients, la principale limite des modèles de souris réside dans le fait que seules des mutations homozygotes sur *SHANK3* déclenchent des phénotypes autistiques prononcés. Le phénomène de compensation, avec l'augmentation de la protéine SHANK2 (observée dans le modèle de souris *SHANK3*^{-/-} de (Schmeisser et al., 2012) est peut être une explication de la différence phénotypique observée entre la souris et l'humain. Quoi qu'il en soit, le modèle animal apporte forcément un biais à la compréhension de la physiopathologie chez l'humain et à la découverte de nouveaux

médicaments, puisque le fond génétique est différent. Des modèles humains, grâce à la technologie iPSC, pourraient être une alternative à ces limites.

b. Modèles iPSC

Jusqu'à présent, seul un modèle d'iPSC pour le PMS a permis de modéliser l'autisme causé par de grandes délétions englobant le gène *SHANK3*. Ce modèle a été abordé précédemment dans la partie II-4. Celui-ci a permis de montrer que la diminution de la neurotransmission glutamatergique était une caractéristique centrale des neurones humains porteurs d'une haploinsuffisance de *SHANK3* et qu'une augmentation du niveau d'expression de la protéine *SHANK3* était suffisante pour contrecarrer les déficits de transmission synaptique *in vitro* (Shcheglovitov et al., 2013).

Ainsi, notre étude visant à modéliser les formes génétiques d'autisme liées à *SHANK3* avec la technologie des hPSC est d'autant plus intéressante qu'il n'existe pas encore de modèles développés. De plus, cette étude menée par Shcheglovitov a permis de valider qu'une approche thérapeutique visant à corriger l'expression du gène *SHANK3* peut être pertinente pour la restauration des fonctions neuronales dans l'autisme.

Objectifs

Comme dit précédemment, l'autisme comprend un large groupe hétérogène de patients avec différentes étiologies, divers phénotypes cliniques et moléculaires et des âges d'apparition variables. Etant donné cette hétérogénéité, le développement d'une médecine plus personnalisée doit être envisagé, avec des essais précliniques et cliniques spécifiques pour des sous types de patients. Des médicaments plus spécifiques permettraient d'optimiser le traitement des sujets et donneraient l'opportunité de déterminer quels phénotypes autistiques sont réversibles chez l'homme. Delorme et al. proposent ainsi de concentrer les recherches sur le regroupement des patients atteints d'autisme en sous-groupes. En plus de la possibilité de les regrouper sur la base des gènes touchés directement par une mutation (plus de 100 gènes impliqués dans l'autisme), ils suggèrent aussi de les rassembler sur la base de voies communes synaptiques perturbées chez ces patients (Figure 22).

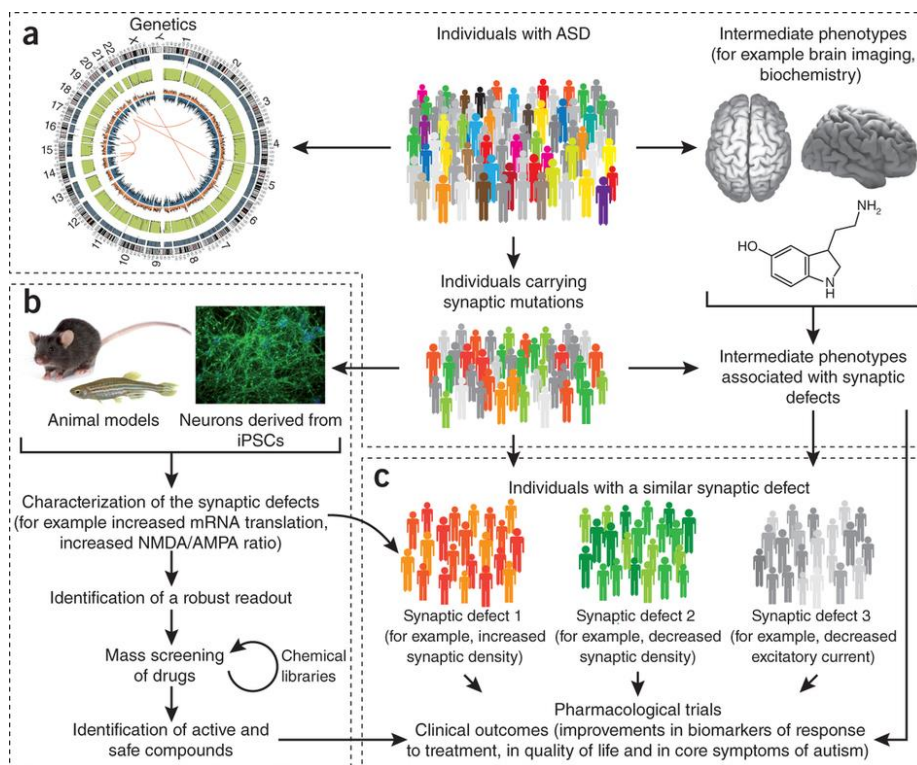


Figure 22 : Stratégies pour les essais cliniques pour l'autisme. Issue de Delorme et al., 2013.

Ainsi, dans cette optique il serait nécessaire d'identifier des phénotypes intermédiaires et biomarqueurs reliés aux défauts synaptiques. Pour cela, l'utilisation de modèles animaux et modèles iPSC peuvent être utilisés pour mieux caractériser les défauts synaptiques présents chez les patients, et mener à bien cette classification. La stratégie de recherche de composés ciblée sur des formes rares monogéniques a d'ailleurs déjà été bien établie sur modèles animaux. En effet, les résultats sur modèles de souris d'autisme déjà existants ont permis d'élaborer des premières catégories de défauts synaptiques (augmentation des densités synaptiques ou des courants excitateurs dans le syndrome X fragile, diminution des densités synaptiques ou des courants

excitateurs dans les modèles de souris RTT et les souris SHANK1 et SHANK3 etc.) et de découvrir des premières molécules thérapeutiques prometteuses plus spécifiques. Les modèles iPSC, de par leur nouveauté, commencent seulement à émerger mais offrent beaucoup d'espoir pour cette stratégie. En effet, les premiers travaux ont permis de confirmer les défauts synaptiques et de valider l'effet des composés thérapeutiques découverts grâce aux modèles animaux (Tableau 3). La technologie iPSC est d'autant plus prometteuse qu'elle pourrait permettre d'identifier à plus large échelle de nouveaux composés chimiques, plus spécifiques d'un sous-groupe donné, par criblage à haut débit, lorsque le biomarqueur identifié est robuste.

Une fois que la classification serait faite, les patients avec des défauts synaptiques similaires pourraient être enrôlés dans des essais cliniques pharmacologiques pour tester l'efficacité des composés précédemment sélectionnés spécifiquement de ce sous-groupe.

C'est exactement dans ce contexte que ce projet de thèse s'inscrit. L'équipe Neuroplasticité et Thérapeutiques, dans laquelle j'ai fait ma thèse, a choisi de démarrer le travail, et d'évaluer si cette stratégie est réalisable, en prenant comme premier exemple les formes d'autisme associées aux mutations du gène *SHANK3*. La technologie des hPSC, domaine d'expertise du laboratoire, a été adoptée pour rechercher/confirmer les défauts synaptiques liés à la maladie. Ce travail visait à plus grande échelle à estimer si la stratégie est efficace et envisageable avec les iPSC (et éventuellement découvrir les limites du modèle) et si elle peut être concevable « en routine » pour les différentes formes d'autisme d'origine génétique. Un autre pan de mon travail visait à mettre en place du criblage de molécules thérapeutiques grâce à la technologie des hPSC pour l'identification de modulateurs pertinents pour une voie spécifique de l'autisme et la découverte de nouveaux médicaments. Comme chez les malades, les mutations *de novo* n'affectent systématiquement qu'un allèle du gène *SHANK3*, une stratégie ciblant l'augmentation de la transcription de l'allèle sain a été choisie ici, dans le but de corriger l'altération du dosage de SHANK3. Nous avons donc développé un criblage à haut débit permettant d'identifier des composés augmentant les niveaux d'ARNm de SHANK3 dans des neurones humains dérivés d'ESC en utilisant la méthode de RT-qPCR en duplex. L'idée était ensuite de valider cette approche, en testant les composés thérapeutiques dans un contexte pathologique, sur des neurones de patients portant différentes mutations, avec différents fonds génétiques, grâce aux neurones dérivés d'iPSC. Ces neurones dérivés d'iPSC peuvent ainsi être utilisés comme des patients « *in vitro* » et pourraient offrir la possibilité de tester préalablement le composé thérapeutique le plus pertinent, patient par patient, toujours dans la même optique d'un traitement plus personnalisé pour l'autisme.

Résultats

I. Création des modèles cellulaires

Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi d'utiliser un modèle neuronal dérivé d'hESC pour la recherche et la validation de nouveaux composés thérapeutiques pour l'autisme par criblage à haut débit. Ce choix s'est porté sur un modèle neuronal issu d'hESC plutôt qu'un modèle dérivé d'iPSC pour éviter les biais dus aux problèmes épigénétiques (Partie Limites des iPSC) et parce que leur culture est plus maîtrisée et plus reproductible.

La différenciation des hPSC en neurones corticaux glutamatergiques a été permise grâce à un protocole développé par le laboratoire ISTEM. Notre protocole s'inspire de la méthode de différenciation neuronale de Chambers et al., 2009 mais a été spécialement adapté pour du HTS. En effet, jusqu'à maintenant, l'application de protocoles neuronaux en HTS était encore associée à de nombreuses limites, en matière de temps de différenciation ou d'homogénéité des cultures neuronales générées. De plus, les neurones étant des cellules post-mitotiques, les protocoles de différenciation directe ne permettent pas d'avoir assez de matériel pour faire du HTS. C'est pourquoi des protocoles de différenciation passant par un stade de précurseur neuronal, facilement amplifiable et banquable, semble être bien plus appropriés. L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a récemment reporté un nouveau protocole de différenciation qui surmonte la plupart de ces obstacles. En effet, il permet la génération d'une population stable et auto-renouvelable de progéniteurs corticaux tardifs (*Late cortical progenitors*, LCP) à partir de NEP humains dérivés d'hPSC, qui peuvent être banqués et congelés. Ces LCP ont la capacité de se différencier efficacement et rapidement (14 jours), sans ajout de cytokines, en neurones glutamatergiques des couches superficielles du cortex (II-IV), en plaques 384 puits (Figure 23).

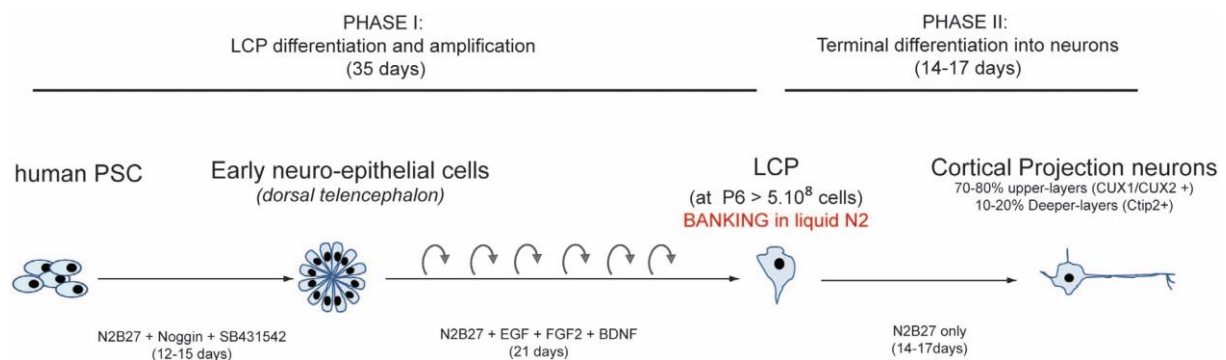


Figure 23 : Protocole de différenciation utilisé. Issue de Boissart et al., 2013.

La lignée cellulaire de LCP dérivée d'hESC SA001 utilisée pour ma thèse avait été déjà différenciée, caractérisée et banquée avant mon arrivée. Leur culture de façon automatisée et miniaturisée en plaque 384 puits avait pu être également développée. Ce modèle cellulaire a fait l'objet d'une publication et d'un premier criblage pour identifier des composés agissant sur la prolifération et la différenciation neuronale (article ci-dessous, Boissart et al., 2013), montrant la pertinence de ce modèle pour du criblage à haut débit. Le protocole de différenciation, la méthode de culture automatisée, ainsi que les contrôles qualités utilisés apparaissent dans l'article.

1. Protocole de différenciation

A partir d'hPSC, le protocole permet la génération en une dizaine de jours de NEP, bien organisées comme un épithélium polarisé, exprimant la protéine apicale ZO-1 ainsi que la protéine caractéristique SOX1. Le double marquage avec le marqueur dorsal PAX6 et le marqueur télencéphalique canonique BF1 permet d'identifier plus précisément les cellules télencéphaliques dorsales. La présence de Nestine indique leur appartenance à la glie radiale corticale. Après plusieurs passages, les cellules perdent rapidement l'expression de ZO-1 mais maintiennent l'expression des marqueurs de la glie radiale corticale : Nestine, Pax6, Blbp et SOX2 (Figure 24). Leur culture dans un milieu contenant les cytokines EGF (epidermal growth factor), FGF2 (basic fibroblast growth factor) et BDNF (brain-derived neurotrophic factor), permet de bloquer la différenciation neuronale spontanée et de favoriser le cycle cellulaire. Ainsi une population de LCP homogène et autorenouvelable est produite, avec un profil génique et morphologique identique jusqu'à 20 passages.

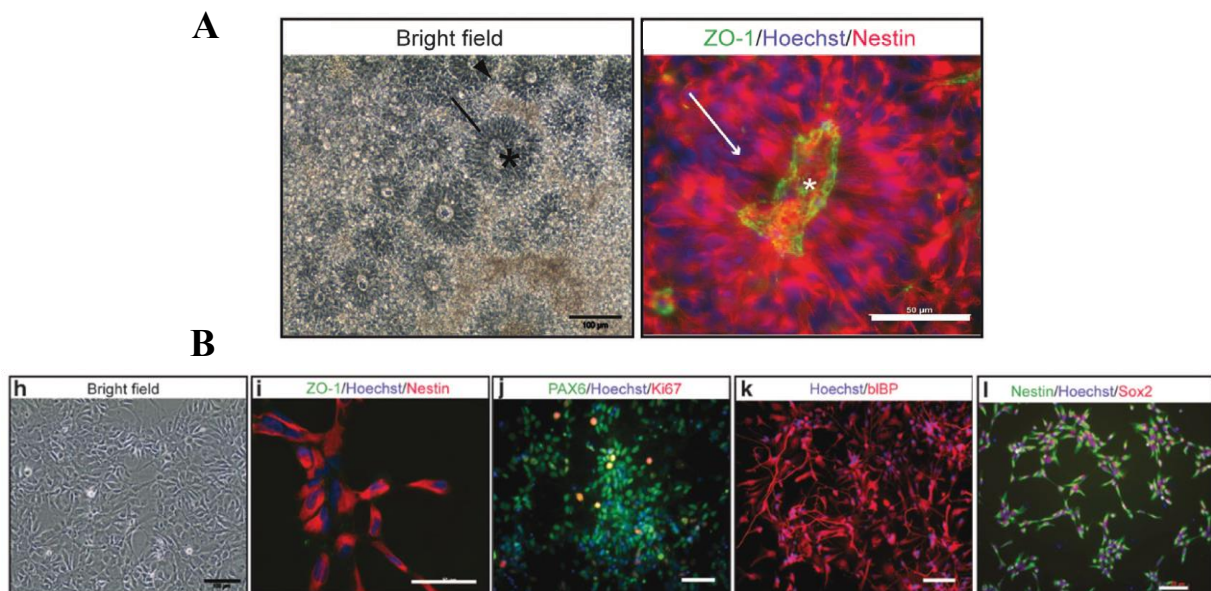


Figure 24 : Morphologie et marqueurs spécifiques. A. des NEP et B. des LCP. Issue de Boissart et al. 2013.

Les neurones sont obtenus *in vitro* en 14 jours à partir des LCP, de manière spontanée en enlevant les cytokines du milieu de culture. Un réseau neuritique branché et complexe est visible dès le 7ème jour de différenciation. Les cellules sont caractérisées par des marqueurs neuronaux, qui révèlent l'efficacité de la différenciation terminale vers le lignage neural, comme Tuj-1 (Neuron-specific class III beta-tubulin) et MAP-2 (Microtubule-Associated Protein 2), deux protéines du cytosquelette associées aux axones et aux dendrites, ainsi que le marqueur neuronal HuC/D. Avec le protocole utilisé pour la thèse, nous obtenons une population homogène et relativement pure de neurones glutamatergiques, puisqu'après 21 jours de différenciation plus de 80 % des neurones expriment les marqueurs glutamatergiques vGlut-1 et v-Glut-2. Ont été identifiés également, 10 % de neurones GABAergiques (exprimant GABA), 2 % de neurones catécholaminergiques (exprimant la tyrosine hydroxylase) et quelques astrocytes (exprimant GFAP) qui apparaissent de

façon plus tardive. La présence de marqueurs postsynaptiques tels que PSD-95 ou SHANK3 peut aussi témoigner de la spécificité glutamatergique des neurones. Enfin, 70 % des neurones expriment Cux1, Cux2 et Brn2 qui sont spécifiquement exprimés dans les couches corticales II-IV. Les neurones restants expriment CTIP-2, un marqueur des couches corticales inférieures (Figure 25).

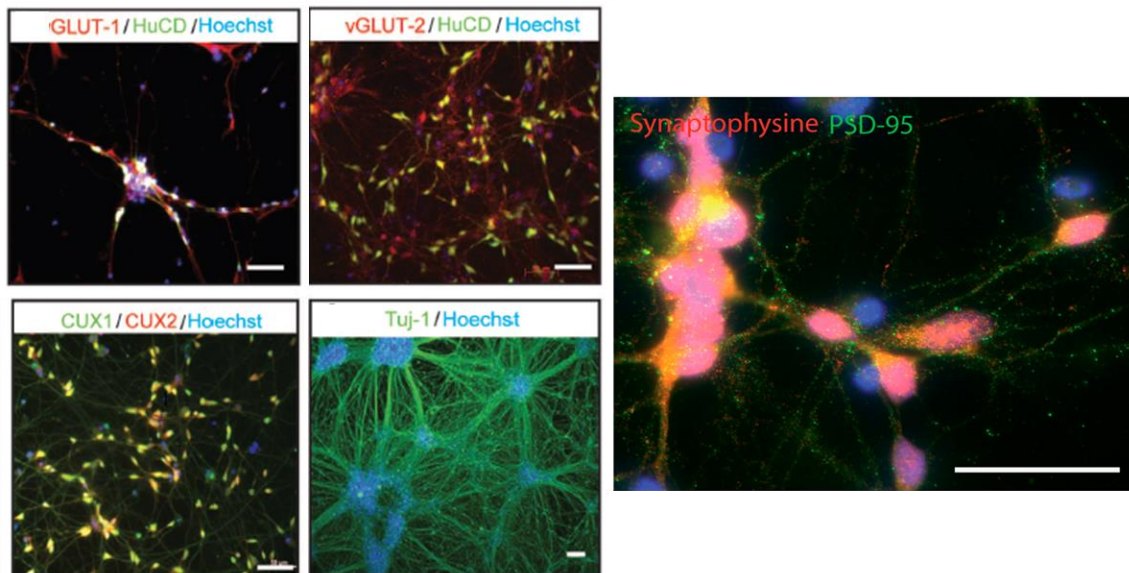


Figure 25 : Morphologie et marqueurs des neurones glutamatergiques corticaux. Issue de Boissart et al. 2013.

2. Différenciation de lignées neuronales à partir d'iPSC saines et atteintes

Ma participation à ce travail a été de produire des iPSC de patients autistes portant une mutation sur le gène *SHANK3* et de montrer que le protocole de différenciation pouvait être reproduit sur des lignées d'iPSC pathologiques. C'était une étape clé pour envisager de travailler sur les iPSC *SHANK3* à haut débit et à haut contenu. Des iPSC ont donc été reprogrammées à partir de fibroblastes de trois patients atteints d'autisme portant des mutations *de novo* sur le gène *SHANK3* (Figure 26).

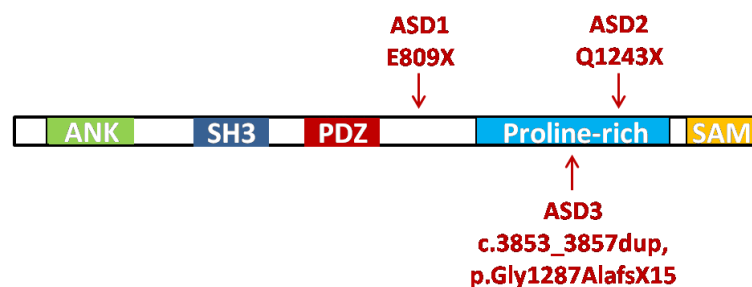


Figure 26 : Localisation des mutations *de novo* sur le gène *SHANK3* pour les 3 patients atteints d'autisme.

Dans l'article, seules les deux premières lignées d'iPSC générées y sont présentes (ASD1 et ASD2). La technique de reprogrammation a été permise grâce au virus Sendai et les facteurs de Yamanaka. La reprogrammation a été réalisée avec succès puisqu'elle a permis de générer des lignées iPSC répondant aux critères de contrôle qualité (CQ). En effet, les 3 iPSC ont présenté une morphologie typique, en formant des colonies rondes aplaties et réfringentes, et expriment des marqueurs de surface spécifiques, comme les glycolipides SSEA-3 et SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen 3 et 4) et les antigènes TRA-1-60 et TRA-1-81 (Tumeur Rejection Antigen). Les cellules expriment également les facteurs de transcription Oct-4, SOX2 et Nanog. Les iPSC ont ensuite été différenciées en LCP et, à leur tour, caractérisés et banqués de la même façon. Ces lignées iPSC *SHANK3* complètent les lignées issues d'individus sains déjà présents dans l'équipe (1869 et 4603). Une troisième lignée d'iPSC contrôle, présente au laboratoire, a été par la suite intégrée au travail (PB12). Le lancement de ces lignées de LCP en neurones a montré que les modèles neuronaux dérivés d'individus atteints de TSA avaient la capacité de se différencier en neurones de la même façon que les cellules iPSC ou ESC saines (Figure 27). La caractérisation des lignées ASD3 et PB12 ne figurant pas dans l'article est représentée en Figure 28. Les informations concernant toutes les lignées d'iPSC, de LCP et de neurones dérivés d'iPSC de patients autistes (ASD) et contrôles (CTRL) sont récapitulées en Tableau 7.

Tableau 7 : Récapitulatif des lignées ASD et CTRL.

	1869	4603	PB12	ASD1	ASD2	ASD3
Type de patient	Sain	Sain	Sain	Mutation Shank3 E809X Exon 21	Mutation Shank3 Q1243X	Mutation faux sens Shank3 Exon 21
Sexe	Masculin	Masculin	Féminin	Féminin	Masculin	Masculin
Age	15 ans	Adulte	Adulte	15 ans	10 ans	13 ans
CQ iPSC	Caryotype normal FACS : SSEA3/TRA-1-81 positif IF : Nanog, TRA-1-60, SSEA4 et Oct-4 positif					
CQ LCP	Caryotype normal Facs : ≥ 15 % HNK1/P75 HNK1/NCAM positif IF : Nestine, SOX2 positif, Oct-4 négatif					
CQ Neurones J14	IF : HUC/D, PSD-95, SHANK3 positif					

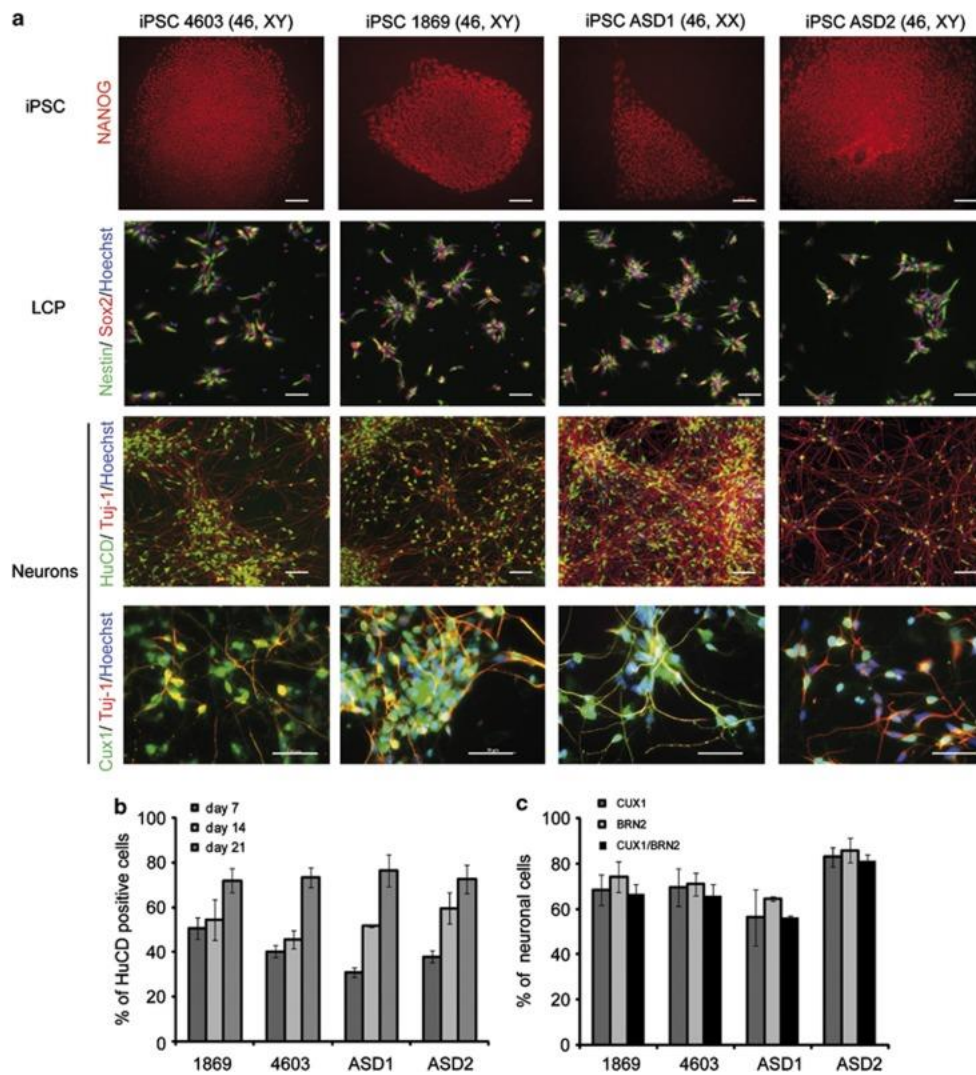


Figure 27 : Caractérisation des lignées d'iPSC saines (1869, 4603) et autistes (ASD1, ASD2) et de leurs dérivés neuronaux. Issue de Boissart et al. 2013.

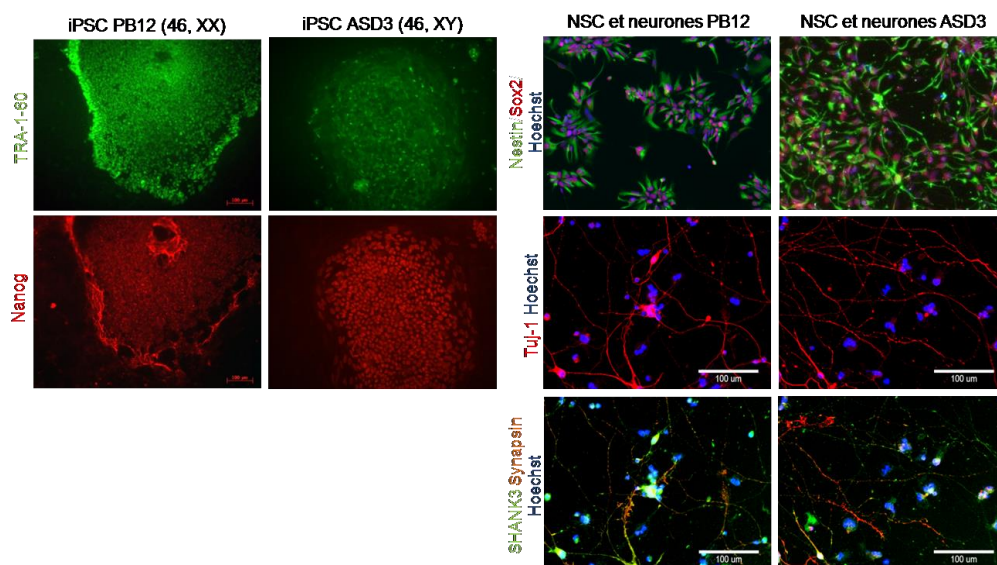


Figure 28 : Caractérisation des lignées d'iPSC saine (PB12) et autiste (ASD03) et de leurs dérivés neuronaux

Article 1

Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening

Claire Boissart, Aurélie Poulet, Pauline Georges, Hélène Darville, Emeline Julita, Richard Delorme, Thomas Bourgeron, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua

ORIGINAL ARTICLE

Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening

C Boissart^{1,7}, A Poulet^{1,7}, P Georges¹, H Darville¹, E Julita¹, R Delorme^{2,3}, T Bourgeron^{2,4,5}, M Peschanski⁶ and A Benchoua¹

Cortical neurons of the superficial layers (II-IV) represent a pivotal neuronal population involved in the higher cognitive functions of the human and are particularly affected by psychiatric diseases with developmental manifestations such as schizophrenia and autism. Differentiation protocols of human pluripotent stem cells (PSC) into cortical neurons have been achieved, opening the way to *in vitro* modeling of neuropsychiatric diseases. However, these protocols commonly result in the asynchronous production of neurons typical for the different layers of the cortex within an extended period of culture, thus precluding the analysis of specific subtypes of neurons in a standardized manner. Addressing this issue, we have successfully captured a stable population of self-renewing late cortical progenitors (LCPs) that synchronously and massively differentiate into glutamatergic cortical neurons of the upper layers. The short time course of differentiation into neurons of these progenitors has made them amenable to high-throughput assays. This has allowed us to analyze the capability of LCPs at differentiating into post mitotic neurons as well as extending and branching neurites in response to a collection of selected bioactive molecules. LCPs and cortical neurons of the upper layers were successfully produced from patient-derived-induced PSC, indicating that this system enables functional studies of individual-specific cortical neurons *ex vivo* for disease modeling and therapeutic purposes.

Translational Psychiatry (2013) 3, e294; doi:10.1038/tp.2013.71; published online 20 August 2013

Keywords: cortical superficial layers; disease modeling; drug discovery; high-throughput screening; human pluripotent stem cells

INTRODUCTION

Advances on the molecular understanding of psychiatric diseases have long been challenged by the limited access to live human neurons with a genetic background associated with the disease state. For obvious reasons, biopsies of neuronal tissues in affected patients are not feasible and do not allow the full *in vitro* recapitulation of key events involved in the initiation and progression of the disease. In addition, high-throughput screening of potential therapeutic compounds (HTS), which would greatly enhance the rate of drug discovery, is compromised by the fact that live human neurons are post mitotic cells that cannot be amplified to reach the amount of biological resources needed for such of large screening campaigns. Therefore, disease-affected neurons have to be produced on demand from validated banks of human neuronal progenitors. Human pluripotent stem cells (PSC) derived from mutation-bearing blastocysts (human embryonic stem cells, hESC) or directly reprogrammed from patient somatic cells (human-induced PSC, iPSC) open a new area of disease modeling as they can virtually be differentiated into any cell type, at a scale compatible with high-throughput cell-based studies, including neuronal progenitors and post mitotic neurons.^{1,2} However, it is critical to fully control the differentiation of these PSC into neuronal types relevant to psychiatric conditions in a robust, homogeneous and timely manner.

Cortical neurons are among the primary targets of psychiatric conditions of developmental origin such as autism spectrum disorder (ASD) and schizophrenia. Common neuronal phenotypes include altered neuronal differentiation and migration, potentially leading to cortical layers disorganization, reduced soma size, abnormal neurite arborization and impaired synaptogenesis.³ As a rule, these pathological phenotypes affect glutamatergic neurons of the superficial cortical layers (II-IV), a subtype of neurons predominantly involved in interconnectivity between cortical regions within a hemisphere.⁴⁻⁷ Cortical neurons of superficial layers are thought to underlie the enhanced cognitive abilities of humans⁸⁻¹⁰ and therefore represent an attractive neuronal subtype regarding modeling of psychiatric disorders and meaningful cellular targets for high-throughput drug screening. Differentiation of PSC toward cortical excitatory neurons has been successfully achieved in mouse and human cells by forming three-dimensional epithelial structures, named rosettes, containing early neuroepithelial cells (NEP) that progressively produce the neuronal types typical for the different cortical layers in a time-dependent manner.^{11,12} These studies have clearly demonstrated that, in contrast to mouse PSC, human PSC can form superficial layer neurons, respecting the key milestones of human cortical development. Specific neuronal subtypes are produced in a predictable temporal manner with the sequential generation of preplate neurons, deep layers neurons (V-VI) and, finally, more

¹Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, Evry Cedex, France; ²Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, Paris, France; ³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, Paris, France; ⁴CNRS URA 2182 'Genes, synapses and cognition', Institut Pasteur, Paris, France; ⁵University Denis Diderot Paris 7, Paris, France and ⁶INSERM/UEVE UMR 861 I-STEM AFM, Evry Cedex, France. Correspondence: Dr A Benchoua, Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, 5 rue Henri Desbrières, Genopole campus 1, Evry Cedex 91030, France.

E-mail: abenchoua@istem.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 17 April 2013; revised 19 July 2013; accepted 19 July 2013

superficial layers (II-IV).^{12,13} However, the transposition of these protocols to high-throughput technologies, including drug screening, face limitations. The first one is the protracted time course of these protocols. Several weeks of differentiation are necessary to obtain late-born neurons because these protocols do not involve the capture of any stable, self-renewing population of neuronal precursors but rather a slowly evolving equilibrium between progenitors and neurons progressively generated through asymmetric divisions. Consequently, these protocols have led to a mixture of the different cortical layers sequentially generated and did not allow the homogenous production of specific neuron subtypes. Second, the involvement of compact three-dimensional multilayered structures, although representative of the complex cortical organization, excludes the possibility to use a systematic and automated image-based quantification of the different aspects of neurogenesis, an approach necessary to objectively compare disease-affected and control cells then to monitor appropriately the effects of potential therapeutic compounds.

Genetic manipulations in mice have shown that cortical development can be influenced to promote the production of superficial layers.^{14,15} Here we report that this strategy of preventing spontaneous neuronal differentiation cells while promoting neurogenic competence can be applied to human PSC-derived early NEP cells. This allows the production of homogeneous and stable population of late cortical progenitors (LCP) that mainly differentiate into glutamatergic neurons of the cortical superficial layers upon removal of the neuronal differentiation barrier. The rapid and on demand production of mature neurons from these progenitors has permitted the development of HTS assays based on the quantification of the efficiency of neuronal differentiation and of the neurite outgrowth and arborization capacities of the resulting neurons. A collection of 130 small molecules with known biological activities affecting signaling pathways potentially involved in those mechanisms was built and used to validate the scale-up of the assay.

MATERIALS AND METHODS

Human iPSC derivation

Induced PSC were derived from two autistic patients (ASD lines) following appropriate ethical rules. The two patients were diagnosed with non-syndromic autism at Robert Debré Hospital according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV for the classification of neuropsychiatric disorders. Both patients carried a de novo mutation on SHANK-3 gene (ASD1: E809X, ASD2 Q1243X¹⁶). After patient's legal representatives approval and patient consent when appropriated, 8-mm skin punch biopsies were obtained (study approval no. C07-33). Fibroblasts were derived from the donated tissue using standardized in-house protocols and expanded in standard fibroblast culture medium. For control iPSC lines (GM4603 and GM1869), fibroblast were obtained from the Coriell Biorepository (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA). Reprogramming was performed using the four human genes OCT4, SOX2, c-Myc and KLF4 cloned in Sendai viruses (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and iPSC lines characterized according to.¹⁷

PSC culture

Next to the four iPSC lines, one hESC line (SA001, 46 XY, Cellartis, Goteborg, Sweden) was used in this study. All human PSC were maintained on a layer of mitotically inactivated murine embryonic STO fibroblasts in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 Glutamax supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, 0.55 mM 2-mercaptoethanol and 5 ng ml⁻¹ recombinant human fibroblast growth factor-2 (all from Invitrogen). Cultures were fed daily and passaged every 5–7 days. Manual dissection rather than enzymatic methods were routinely used to passage the cells.

PSC commitment to the dorsal telencephalic lineage

Commitment of PSC to the neural lineage was performed as described in.¹⁸ PSC were manually detached from the feeder layer, collected in N2B27

supplemented with human recombinant Noggin (500 ng ml⁻¹, Peprotech, London, UK), SB431542 (20 nM, Tocris Biosciences, Ellisville, MO, USA) and fibroblast growth factor-2 (4 ng ml⁻¹, Peprotech). They were subsequently transferred to a low-attachment Petridish and incubated for at least 4 h in order to fully remove them from the influence of the feeders. Cells were then seeded on poly-ornithine and laminin-coated (Sigma, St. Louis, MO, USA) Petridishes. The Rock inhibitor Y27632 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) was used at 10 nM at the time of plating to optimize cell survival and seeding. The differentiation medium was changed after 24 h, then every other day until day 10.

LCP derivation, amplification and banking

At day 10, neural rosettes containing NEP cells were manually collected under a binocular microscope under sterile conditions. They were plated en bloc in poly-ornithine/laminin-treated culture dishes in N2B27 medium containing epidermal growth factor (10 ng ml⁻¹), fibroblast growth factor-2 (10 ng ml⁻¹) and brain-derived growth factor (20 ng ml⁻¹). At confluence, the cells were passed using trypsin first as small multicellular clumps (passages 2–4) at a ratio of 1:3, then as a single-cell suspension with a density of 100 000 cells cm⁻². Mass amplification was performed until passages 8–10 and cells were frozen in a mixture containing 10% dimethyl sulfoxide and 90% fetal calf serum (Invitrogen). Cryotubes were stored in liquid nitrogen until used. The Rock inhibitor Y27632 was used at the time of thawing to enhance cell recovery.

Neuronal differentiation

Neuronal differentiation of LCP-like cells was induced by plating the cells at low density (50 000 cells cm⁻²) in poly-ornithine/laminin-treated multi-well culture plates, with or without round glass coverslips, in N2B27 without growth factors. The medium was changed every 4 days with systematic addition of 2 ng ml⁻¹ of laminin to avoid detachment and clumping of neurons.

Immunostaining

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and incubated for 10 min in blocking buffer (phosphate-buffered saline, 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100). Primary antibodies (Supplementary Table 3) were diluted in blocking buffer and applied overnight at 4 °C. After three washes in phosphate-buffered saline, secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were diluted at 1:1000 in blocking buffer and applied for 2 h at room temperature. The cells were washed at least three times in phosphate-buffered saline and visualized on a Zeiss inverted fluorescence microscope (Axiovert, Carl Zeiss, Le Pecq, France). Image acquisition was performed using the Axiovision LE software (Carl Zeiss). For nuclear counterstaining, cells were incubated in 10 ng ml⁻¹ Hoechst 33258 (Sigma) for 10 min after immunostaining.

Flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting)

Cells were trypsinized for 5 min and a solution of 10% fetal calf serum was added to stop the reaction. The cells were collected and washed by resuspension in N2B27 and centrifugation at 1500 g for 10 min. Cells were fixed in 200 nM of freshly prepared 2% paraformaldehyde solution for 10 min on ice, washed by centrifugation and permeabilized with a 0.1% solution of saponin. After centrifugation, cells were incubated 2 h at room temperature in a solution of 200 nM of primary antibody as described in Supplementary Table 3. Cells were washed and incubated 1 h at room temperature with Alexa 488-coupled anti-isotype antibodies. Fluorescence-activated cell sorting-based counting was performed on a MACSquant cell analyzer (Miltenyi, Paris, France). Proper gating, compensations and exclusion of auto-fluorescent cells were performed using several control conditions, which included cells only probed with primary antibodies or with isotype-related non-binding antibodies.

Quantitative reverse transcription-PCR (qPCR)

Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA levels and quality were quantified using a Nanodrop spectrophotometer. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative PCR assays were prepared by loading primer mixes (1 nM of each primer in the final reaction) in duplicate wells of 384-well plates

followed by the addition of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and 12.5 ng of complementary DNA. PCR reactions were run and quantified using an ABI 7900 light cycler (Applied Biosystems). The quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized to 18S expression. Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR product specificities and exclude non-specific amplification. The list of primers is provided in Supplementary Table 4 excepting Sox5 primers that were purchased at Qiagen. In addition, extensive molecular profiling of cortical progenitors was performed using 'Neurogenesis' qPCR array (SA Biosciences, Qiagen)

Chemical collections

A list of 130 small molecules of interest was constituted from a commercially available collection of 80 inhibitors of kinases (Enzo Life Sciences, Villerbanne, France) and 50 compounds selected from the literature and previously shown to be active in models of neurogenesis¹⁹. A complete list of the molecules, as well as their reported efficient dose, is provided in (Supplementary Table 2).

Automated seeding and compound delivery in the 384-well plates assay format

LCP were dissociated and plated in N2B27 at a density of 3000 cells per well in poly-ornithine/laminin pretreated 384-well plates using the Bravo automated liquid handling platform equipped with a 384 pipette head (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA, USA). Six hours after plating, compounds were added using the same platform. Half of the medium was removed on days 4, 7 and 11, and replaced with fresh compound containing N2B27 medium + 2 ng ml⁻¹ laminin.

Automated image-based high-content screening

For high-content screening assays, the fluorescent labeling was performed as described above in an automated manner using the Bravo liquid handling system. Image acquisition and analyses were performed using the Cellomics Arrayscan automated microscope (ThermoFisher, Hudson, NH, USA). The 'Colocalization' bioapplication was used to identify and count cells positive for HuCD (differentiation assay). Hoechst staining was used to identify objects to include in the analysis. A minimum of 1000 cells were analyzed per well in at least four wells at a $\times 10$ magnification to reach statistical robustness. To quantify neurite outgrowth and branching points, the 'neuronal profiling' bioapplication was used to track Tuj-1-positive neurites. A minimum of 200 neurons per well were analyzed in a minimum of four wells.

Statistical analyses

To assess the quality of the assay, the z' factor value was determined. This factor represents a dimensionless parameter, whose value can range between 0 and 1. It is defined as $z' = \frac{1}{\sigma} \sqrt{\frac{(\sum s^2 - 3s^2)}{n^2}} / (\sum m^2 - nm^2)$, where s and m are the s.d.'s and the means, respectively, of the positive (b) and negative (A) controls.²⁰

The raw data of the screening were subjected to analysis of variance following by a Dunnett's test to evaluate statistical differences between cells treated with tested compounds and dimethyl sulfoxide-treated controls.

RESULTS

Differentiation of hESC into cortical NEP cells

The first crucial step in the formation of specific cortical neuronal subtypes consists in efficiently inducing the differentiation of PSC into early NEP cells of the dorsal telencephalon (NEP). We induced early NEP differentiation in a monolayer system using the two SMAD inhibitors SB431542 and Noggin²¹ in combination with the defined medium N2B27.¹⁸ We have previously reported that the efficient neural commitment of hESC can be obtained using these conditions, avoiding the use of batch-dependent component like the knockout serum replacement and suppressing the need of using a medium preconditioned by feeder fibroblasts, thus removing a source of factors that may be instrumental in patterning the nervous system. After 10 days, more than 80% of

the cells organized in 'rosettes' expressed the protein SOX1, which is characteristically associated to early NEP (Figure 1a). They were identified as dorsal telencephalic cells by their immunopositivity for both the dorsal marker PAX6 (Figure 1b) and the canonical telencephalic marker BF1 (Figure 1c). Even more precisely, they were engaged in neocortical differentiation as shown by high levels of expression of EMX2 and OTX1 (Figure 1a), whereas they hardly expressed any of either the ventral forebrain markers DLX2 and GSH2 or the more caudal markers EN-1, PAX2, PAX5 and HOXB9. The cells organized as a polarized epithelium with a luminal side expressing the apical protein ZO-1 (Figures 1d and e). Belonging to the radial glia lineage was indicated by nestin immunoreactivity (Figure 1e). Consistent with previous descriptions, however, these progenitors only produced about 40% of differentiated HuC/D immunopositive neurons upon replating for 3 weeks after mitogens withdrawal (42.33 ± 9.71 ; Figure 2a). They primarily expressed Ctip2, a molecular marker of the deeper layers of the cortex (Figure 2b).

Derivation of a homogeneous self-renewing population of precursors generating glutamatergic neurons of the cortex superficial layers

We then reasoned that the late production of neurons of the superficial layers during development in vivo implied that cortical NEP performed a large number of divisions before producing them, and tested the hypothesis allowing them to do so in vitro before inducing differentiation would have a similar effect. Accordingly, rosettes were collected manually without cell dissociation and transferred into a pro-proliferative medium with N2B27, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and brain-derived growth factor (EFB medium). Under these conditions, rosettes dissociated spontaneously over time, as cortical progenitors lost ZO-1 immunopositivity while maintaining nestin immunoreactivity (Figures 1f and g). After a second passage using trypsin, a population of morphologically homogenous cells growing as a monolayer was obtained and further amplified (Figure 1h). After eight passages in the EFB medium, the cells maintained the expression of the cortical radial glia markers nestin (Figure 1i), Pax6 (Figure 1j), Blbp (Figure 1k) and Sox2 (Figure 1l). In contrast, they did not express Tbr2, which is classically associated with intermediate cortical progenitors (Figure 1m). Treatment with the EFB medium successfully blocked spontaneous neuronal differentiation and promoted active cell cycling (Figures 1n and o). Molecular profiling of EFB amplified progenitors cells using qPCR arrays showed that they expressed high levels of polarized neural stem cells and radial glia markers, including Pax6, POU3F3 (Bm2), NRCAM and PARD3, in addition to genes involved in corticogenesis-like MEF2C, brain-derived growth factor, RTN4 (NOGO), ODZ1 (a target of EMX2), Filamin A and LIS1 (Figure 1p). These results were confirmed by additional qPCR analysis (Supplementary Figure 1). The same profile was maintained for at least 20 passages without either morphological changes or genomic instability (Supplementary Figure 2) and conserved upon freezing (Supplementary Figure 3). We named those cells 'LCP'.

LCPs were plated at low density, and mitogens removed in order to induce neuronal differentiation, and they quickly stopped cycling. Time course quantification of cells expressing the two neuronal markers Tuj-1 and HuC/D revealed an efficient differentiation along the neuronal lineage (Figures 2b, c and m). In parallel, quantitative reverse transcription analysis indicated the progressive appearance, over a period of 3 weeks, of Tau, MAP-2 and SNAP-25, associated to terminally differentiated neurons (Supplementary Figure 4) as well as the glutamatergic markers vGlut-1 and vGlut2 (Supplementary Figure 4). After 21 days of differentiation, more than 80% of the neurons were

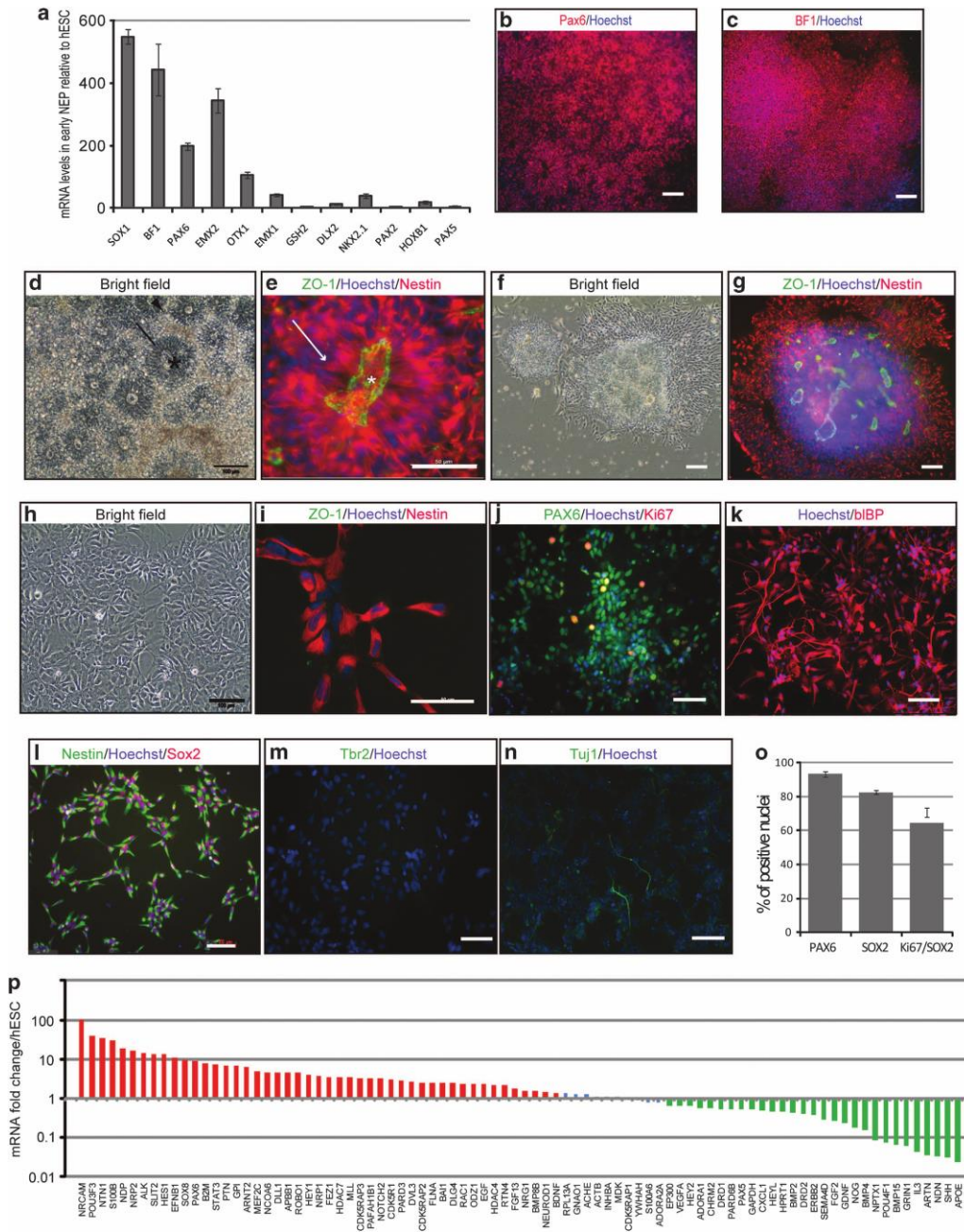


Figure 1. Differentiation of human embryonic stem cells (hESC) into late cortical progenitors (LCPs). (a) Regional profiling of neuroepithelial cells (NEPs) 10 days after induction of neural commitment. Results represent mean \pm s.d. of three independent biological replicates. (b, c) Representative photomicrographs illustrating PAX6 (b) and BF1 (c) expression in hESC-derived neural rosettes. NEPs organized into nestin immunopositive neuroepithelial structures (arrow) surrounding a lumen (star) with an apical side expressing ZO-1 (d, e). Loss of expression of ZO-1 and maintenance of strong expression of nestin after the first passage (g). After several passages homogeneous neural cell population (h) that does not express ZO-1 but maintains nestin expression (i) and express PAX6 (j), Blbp (k) and Sox2 (l) but neither Tbr2 (m) nor Tuj-1 (n). (o) Proportion of cells expressing radial glia markers, and of proliferating neural progenitors (Ki67/Sox2 double-immunopositive cells). (p) Expression profile of progenitors amplified in EFB medium. Green bars indicated genes downregulated in neural progenitors compared with the parental hESC, genes upregulated are shown in red. Results represent mean \pm s.d. of three independent experiments. Scale bar $\frac{1}{4}$ 100 nm.

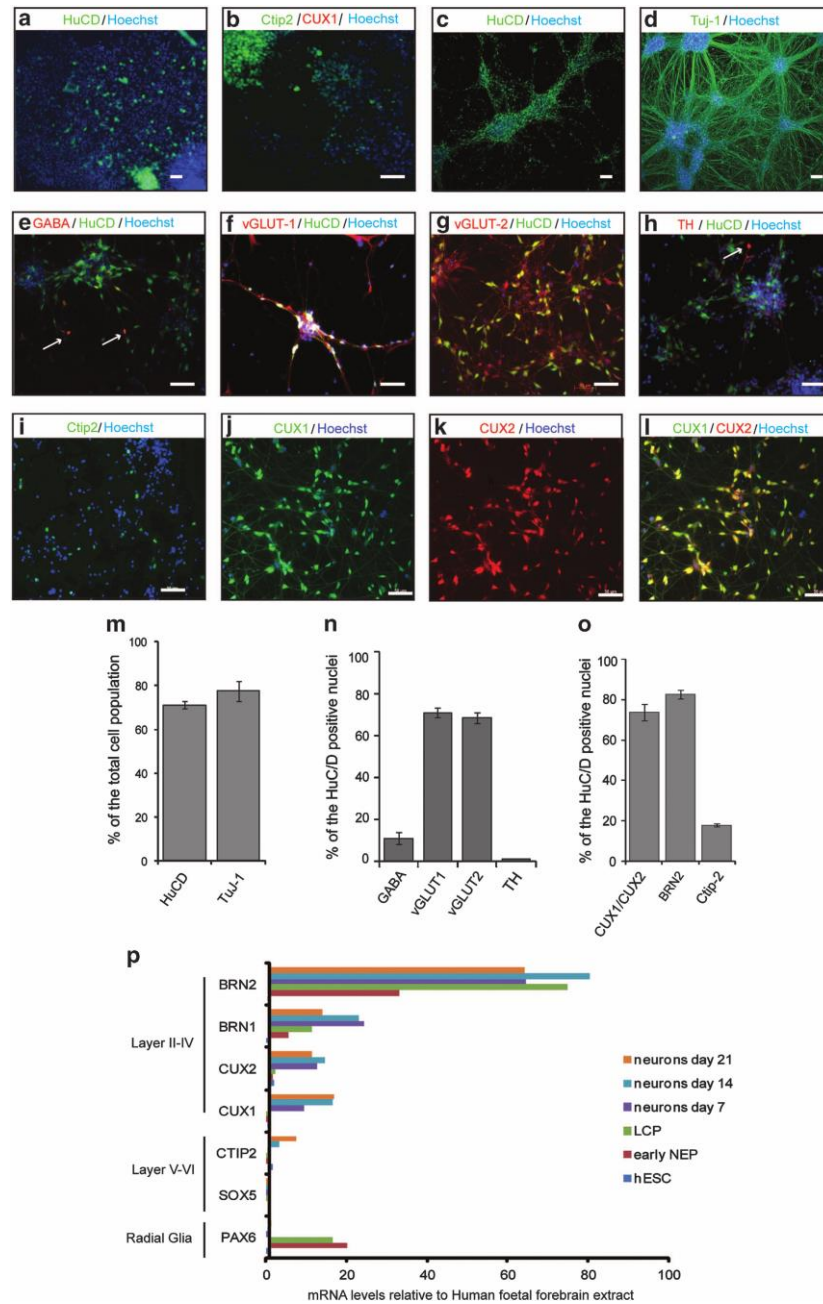


Figure 2. Production of superficial-layer neurons from late cortical progenitors (LCPs). (a, b) Cortical neurons produced by NEP differentiation 21 days after mitogen withdrawal. (c) HuC/D and (d) Tuj-1 immunopositive neurons produced by LCPs 21 days after mitogen withdrawal. (e–i) Immunocytochemical characterization of neurons produced by LCPs. (m) Automated quantification of the proportion of HuC/D and Tuj-1-positive neurons produced by LCPs after 21 days of differentiation. (n) Automated quantification of HuC/D-positive neurons expressing markers of a neuronal subtype or (o) of a cortical molecular layer. (p) Molecular profiling by RT-qPCR of hESC-derived early neuroepithelial cells (NEP), LCPs and differentiated neurons at different time points of differentiation. Results are expressed as mean \pm s.d. of three independent experiments. Scale bar $\frac{1}{4}$ 50 nm. TH, tyrosine hydroxylase.

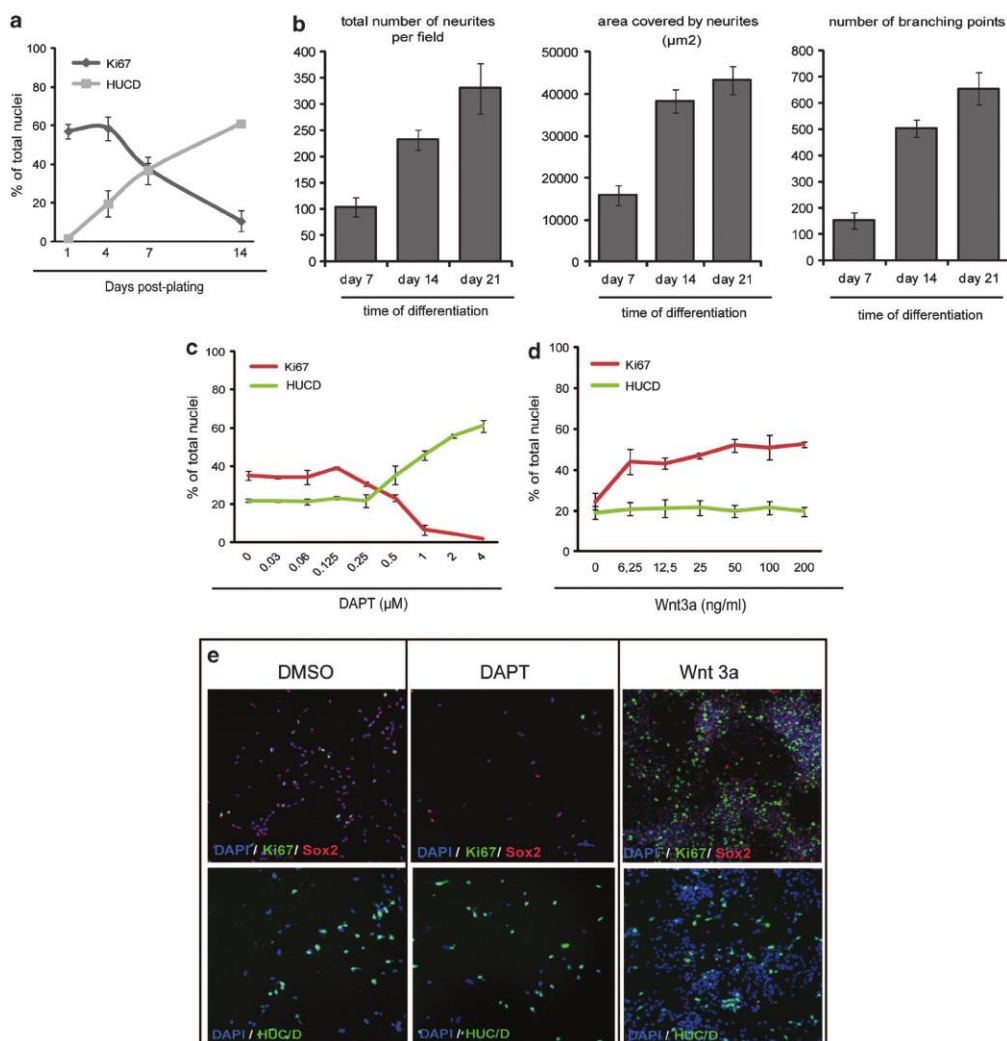


Figure 3. Amenability of late cortical progenitors (LCP) terminal differentiation into a high-throughput screening format. (a) Automated quantification showing the kinetics of neural proliferation (Ki-67) and neuronal differentiation (HuC/D) of LCPs in 384-well plates. (b) Automated quantification of the kinetic of neuritic outgrowth (Tuj-1-positive neurites). Results represent mean \pm s.d. of each parameter per field of 109 000 nm² in at least 16 independent wells (representative of one of three independent experiments). (c, d) Response of LCPs to increasing doses of DAPT (c) or Wnt3a (d). Results are expressed as mean \pm s.d. (e) Representative photographs captured by the Arrayscan microscope.

immunopositive for vGlut-1 and v-Glut-2, whereas 10% expressed gamma-aminobutyric acid and less than 2% the catecholaminergic enzymatic marker tyrosine hydroxylase (Figures 2e–h and n). Neurons formed complex and branched neuritic networks as well as PSD-95 immunopositive glutamatergic synapses (Supplementary Figure 4). Over 70% of them expressed Cux1, Cux2 and Brn2, which are specifically expressed in upper layers I–IV (Figures 2j–l and o); thus validating our working hypothesis that an extended period of proliferation of cortical progenitors would strongly bias differentiation toward late-appearing neurons of the superficial cortical layers. The remaining neurons expressed CTIP-2, a marker of lower-layer cortical neurons (Figures 2i–o). This was confirmed by analyzing additional layer markers by qPCR (Figure 2p).

Responses of LCPs to a collection of 130 compounds in a HTS plate format

The amenability of LCP-differentiated neurons to drug screening was then analyzed. LCPs were successfully adapted to a miniaturized culture format in 384-well plates and differentiated into post mitotic neurons with a time course similar to that observed in larger culture dishes. Over 60% of HuC/D immunopositive neurons were detected after 14 days of differentiation, whereas less than 15% of Sox2 cycling cells were still present (Figure 3a). Neurons progressively formed a complex neuritic network starting at day 14 (Figure 3b). Control molecules with known opposing impact on neural differentiation were first assayed, with Wnt3a as a pro-proliferative agent²³ and Notch signaling inhibition by the gamma-secretase inhibitor DAPT as a pro-differentiating agent,²⁰

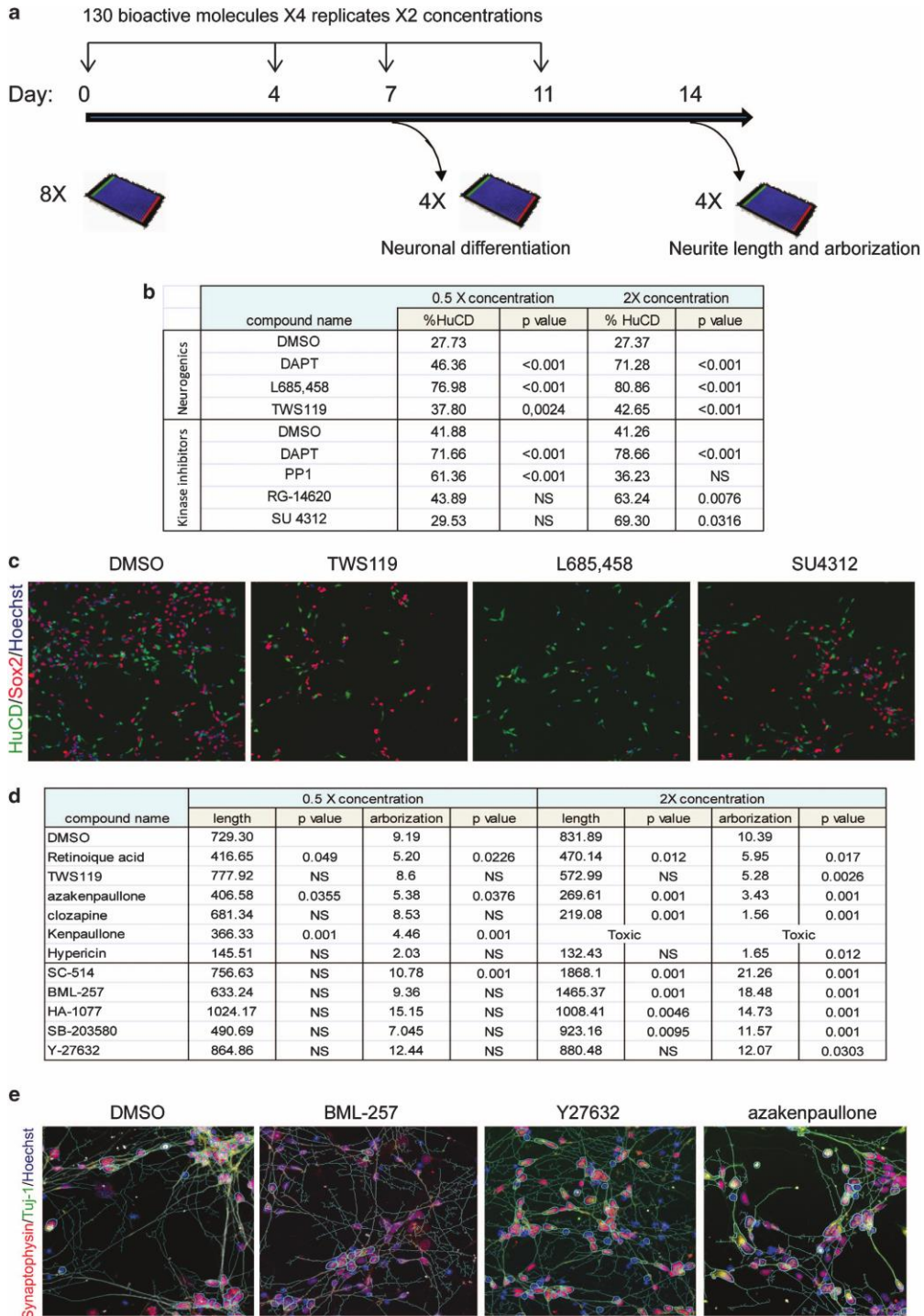


Figure 4. High-content screening of a library of 130 bioactive chemical compounds. (a) Screening flowchart. (b) List of compounds that increased the proportion of HuCD-positive neurons in the culture by more than 15%. (c) Representative results captured by the Arrayscan microscope. (d) List of compounds that modified significantly neurite length and/or arborization. (e) Representative results captured by the Arrayscan microscope, including the tracking of neurites. P-values were calculated using the Dunnett's test after an analysis of variance, NS; non significant.

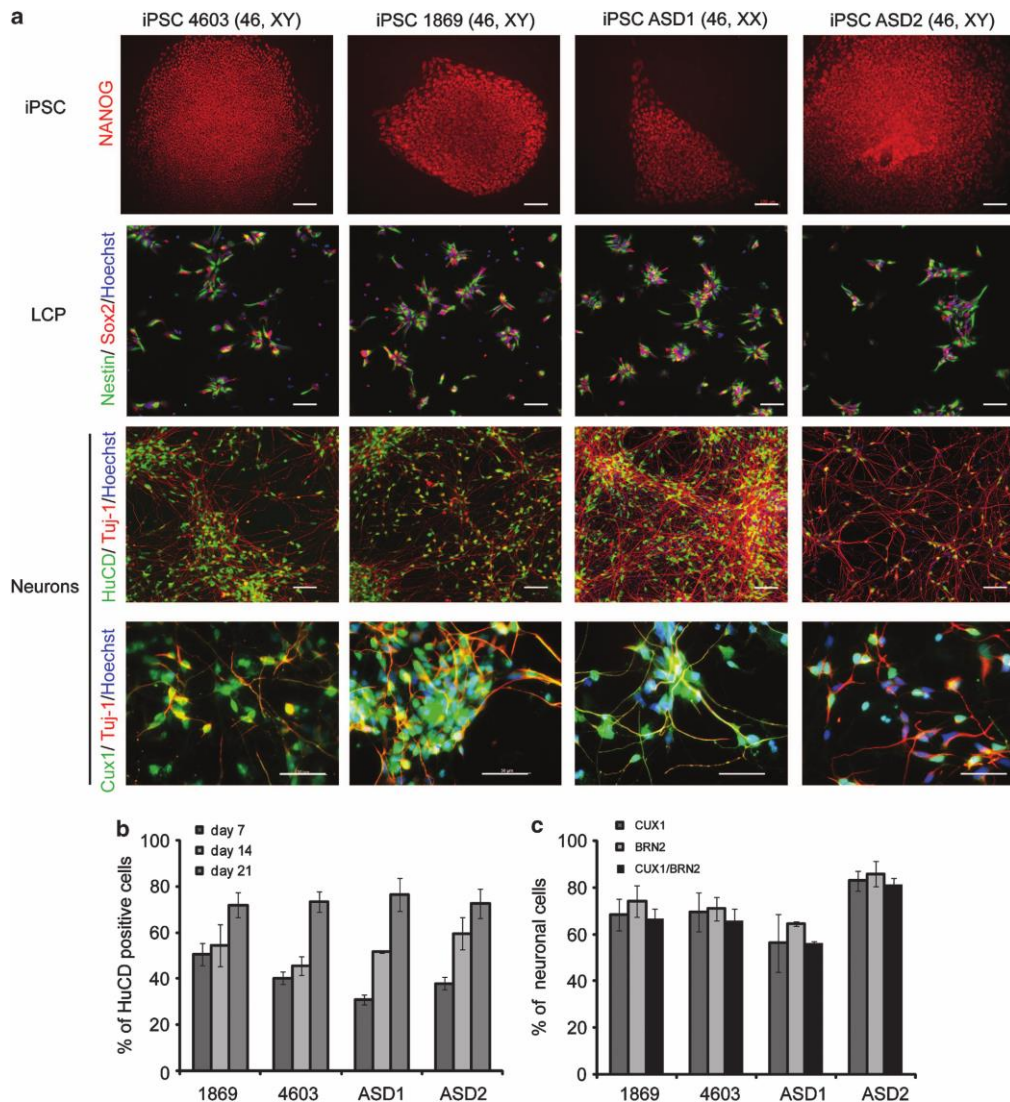


Figure 5 Differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSC) into neurons of the superficial layers. (a) Representative immunocytochemistry of late cortical progenitors (LCP) and cortical neurons produced from four different iPSC lines. 4603 and 1869 iPSC lines were derived from control donors and autism spectrum disorder 1 (ASD1) and ASD2 from autistic children with SHANK-3 mutations. Scale bar 1/450 mm (b) Kinetic of differentiation of iPSC-derived cortical neurons. (c) Percentage of upper layers neurons produced after 17 days of differentiation of iPSC-derived LCP. For (b, c) results are expressed as mean \pm s.d. of three independent experiments.

respectively. Cells were exposed to increasing doses of either of the two molecules at the time of plating and at day 4, and the analysis was performed at day 7. As expected, Wnt-3a increased the proportion of Ki67/Sox2 immunopositive cycling LCPs while blocking the appearance of HuC/D-positive neurons, whereas DAPT strongly promoted LCPs differentiation as HuC/D immunopositive neurons (Figures 3c and d). Z' factor calculation validated the robustness of the screening assays according to (Z' factor of dimethyl sulfoxide vs controls) 0.2 and Z' factor of control min vs control max 0.5, Supplementary Figure 5.^{24,25}

A primary screening was then performed in a search for regulators of those two functions based upon a selected chemical compounds library of 130 small molecules with known effects on

discrete signaling pathways. These included 80 kinase inhibitors and 50 additional compounds that had been reported as modifiers of neurogenesis in a variety of cellular and animal models¹⁹ (Supplementary Table 1). Changes in the production of post mitotic neurons from LCPs—revealing compounds promoting neural differentiation—were analyzed after 7 days of treatment using HuC/D nuclear labeling. Modulation of neurite outgrowth and arborization was analyzed after 14 days—revealing compounds acting on neuronal maturation—using Tuj-1 cytoplasmic labeling (Figure 4a). Hit compounds were obtained in the two assays (Supplementary Table 2). Compounds stimulating differentiation of LCPs into post mitotic neurons included a gamma-secretase inhibitor different from DAPT (L695,458), a highly potent

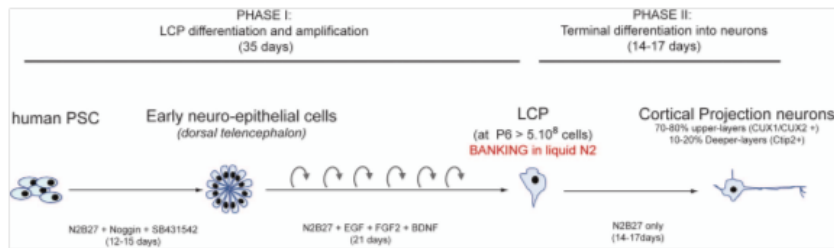


Figure 6 Overview of the timelines of the differentiation protocol. Phase I (days 0–35) corresponds to the steps of differentiation of human pluripotent stem cells (hPSC) into early cortical progenitors, the subsequent phenotypic transition to late cortical progenitors (LCP) and further amplification to create a large cell bank. After this phase, neuronal differentiation into cortical projection neurons is achieved in 14–17 days (phase II). As neuronal differentiation can be started directly from the stock of frozen LCP, the phase 1 does not need to be completed at each experiment. Liquid N₂; liquid nitrogen.

and selective inhibitor of Src family tyrosine kinases (PP1), an epidermal growth factor receptor inhibitor (RG14620), a selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2 (SU4312) and a glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) β inhibitor (TWS 119) (Figures 4b and c). Among the compounds that did not modify the rate of neuronal differentiation were five molecules that, nevertheless, promoted neuronal maturation as revealed by increased neurite length and/or arborization (number of branching points): a mitogen-activated protein kinase/p38 pathway inhibitor (SB203580), two Rock inhibitors (HA-1077 and Y27632), an IKK-2 inhibitor (SC-514) and an Akt-1 inhibitor (BML-257). Six compounds decreased the rate of neuronal maturation without altering either cell survival or differentiation: three GSK-3 inhibitors (kenpauillone, azapauillone and TWS 119), two antipsychotics or mood regulators (hypericin and clozapine), and retinoic acid (Figures 4d and e).

LPCs and cortical neurons of the superficial layers can be produced from control and autistic patient-derived iPSCs

In order to evaluate whether our protocol was applicable in the context of psychiatric diseases, LCP and neurons of the cortical superficial layers were produced from iPSCs, both from controls and from two autistic patients bearing *de novo* mutations on SHANK-3⁽¹⁶⁾. All four lines were efficiently converted into early cortical NEPs and stabilized as proliferating LCPs expressing Sox2 and nestin (Figure 5a). LCPs readily differentiated into HuCD/Tuj-1-positive neurons with the same efficiency than hESC (Figures 5a and b). The majority of neurons produced were also similarly positive for superficial layers marker in the four lines.

DISCUSSION

The goal of this study was to use human PSCs as a biological resource to robustly produce live glutamatergic neurons of the superficial layers of the cortex, a population of neurons particularly affected by psychiatric diseases, in order to study the impact of these diseases on their development and perform HTS campaigns for drug discovery. We successfully differentiated hPSCs into stable population of late cortical precursors that preferentially generated neurons of the superficial layers in a rapid and standardized manner. We showed that these cells could be used to conduct large throughput drug screening studies, identifying modifiers of human corticogenesis that may be involved in the etiology of psychiatric diseases, or conversely pointing to potential therapeutic strategies.

Superficial layer neurons represent a pivotal neuronal population particularly affected by psychiatric diseases.^{4–6,26,27} As expanded superficial layers of the cortex are among the most distinguishing features of the human brain, modeling the impact

of psychiatric diseases using these neurons may help revealing human-specific aspects. Superficial layers of the cortex are poorly developed in rodents as compared with humans, a situation replicated *in vitro* when corticogenesis is recapitulated from PSCs.^{11,12} Superficial layers neurons are late-born cells and, accordingly, their derivation from human PSCs only occurs after an extended period of differentiation. In their pioneer study, Shi et al.^{12,28} described a protocol recapitulating key features of corticogenesis starting from human PSC. In this three-stage process, PSC first differentiated to cortical progenitors cells resembling the cortical sub-ventricular radial glia cells that will spontaneously produce intermediate progenitors and the different types of projection neurons of the deep and superficial layers in stereotypical temporal order reminiscent of *in vivo* corticogenesis. Accordingly, superficial layer neurons appeared in small amount (B 30%) after 80–90 days of differentiation, mixed with undifferentiated progenitors and earlier-born neurons of the deeper layers. Although very elegant, this approach, which was to our knowledge the only producing superficial layer neurons from hPSC, precluded a robust and a systematic study of the impact of a disease state on genesis and maturation of these neurons because of this protracted time of differentiation. Consequently, studies of neurons derived from neuropsychiatric patients iPSC were so far conducted using quicker protocols of differentiation leading to a mixture of GABAergic and glutamatergic neurons with not known regional identity.^{29,30} This temporal challenge is also particularly critical when addressing drug discovery using HTS as this powerful technique requires that the terminal differentiation and maturation steps of these neurons occurs in a rapid, reproducible and synchronous manner. The approach described here allowed us to differentiate and stabilize cortical precursors that could be largely amplified and preferentially produced glutamatergic neurons of the superficial layers. This was achieved by mimicking the chronobiology of the human corticogenesis, that is, by preventing the spontaneous neuronal differentiation of early NEPs patterned to adopt a dorsal telencephalic fate while promoting active cell divisions. Accordingly, the neurogenic potential of the PSC-derived cortical precursors changed from deep to superficial layers after the period of active division. Consequently, large amounts (4 70%) of superficial layers neurons can be produced in less than 50 days starting from PSC (instead of 80–90 days). Importantly, as the self-renewing LCP can be cultivated and amplified as single-cell culture, they can be stored frozen as very large banks. Terminal differentiation can therefore be restarted directly from the LCP at any time, and superficial layer neurons were produced in less than 17 days (Figure 6).

The results obtained by large throughput drug screening in the present study validated the biological pertinence of our model by highlighting signaling pathways that are known to be involved in

psychiatric diseases, namely the RhoA kinase and the GSK-3-dependant pathways. Inhibitors of the Rho kinase increased neurite outgrowth and arborization in our model. The role of Rho proteins in controlling neurite growth and morphology has been largely documented, in particular for RhoA. Activation of RhoA-dependant signaling cascades indeed inhibits neurite outgrowth in response to various stimuli^{31,32} whereas neurite outgrowth induced by neurotrophin is dependent on Rho A inhibition.³³ Mutations in several genes involved in RhoA-dependant signaling pathways have been linked to genetic forms of mental retardation, autism and schizophrenia.^{20,34–37} Conversely, three GSK-3 inhibitors strongly blocked neurite growth and arborization while impairing neither cell survival nor neuronal differentiation. Impaired GSK-3-dependant pathways have been reported in several mood disorders and are the targets of many anti-psychotic agents,³⁸ including dozapine which also showed a blocking effect on neurite growth in our screening assay. Inhibition of GSK-3 represents a promising therapeutic option for Fragile X-syndrome as phenotypic improvements have been observed in mouse models of the disease after treatment with GSK-3 inhibitors, including a normalization of the pathological increase in neurite arborization and spine density.³⁹ This has been corroborated by the results of a pilot clinical study of lithium, which targets GSK-3.⁴⁰ Interestingly, thanks to our cell-based assay, we also identified pathways involved in the very early steps of neuronal differentiation, a developmental stage hardly accessible *in vivo* but particularly important in the context of psychiatric diseases of developmental origins, where impaired neuron number and abnormal cortical organization are commonly found.

To date, several PSC lines, from embryonic origin or induced from patient somatic cells, have been obtained for diseases involving cortical dysfunction. For some of these, evidence has been obtained that known cell-autonomous phenomena can be replicated *in vitro*, including the Fragile-X syndrome,^{41,42} Rett's syndrome,⁴³ Down's syndrome⁴⁴ and schizophrenia.³⁰ In this context, our results point to the possibility of specifically exploring the impact of a mutant gene deemed responsible for neuropsychiatric diseases on the differentiation and maturation of live neurons of the superficial layers of the cortex, which are one of the most relevant cell populations in such studies. High-throughput treatment of these cells with either pharmacological agents or small interfering RNA would greatly enhanced the identification of signaling pathways involved in the development of the neuronal phenotypes associated to such diseases and improve the rate of discovery of potential therapeutic molecules.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Cecile Denis and Dr Mathilde Girard for their help with the iPSC lines, Yves Maury and Marc Lechuga for training and constant support on HTS and HCS platforms, Christine Varela and Dr Nathalie Lefort for karyotyping the cells lines. We also thank the cell bank of Pitié-Salpêtrière hospitals and the Clinical Investigation Center of Robert Debré hospitals for their technical assistance. We also thank Fabienne Giuliano who helps us with ASD1 sample collection. This study has been in part funded by Hoffmann-Laroche and Servier's laboratories, region Ile de France (DIM STEM Pole), the Bettencourt-Schueller foundation, the Orange foundation, the Fondation Mental foundation, the Conny-Maeva foundation, the Cognacq-Jay foundation, the ANR (ANR-08-MNPS-037-01—SynGen), Neuron-ERANET (EUHF-AUTISM).

REFERENCES

- 1 Marchetto MC, Winner B, Gage FH. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Genet* 2012; 19: R71–R76.

- 2 Phillips BW, Crook JM. Pluripotent human stem cells: a novel tool in drug discovery. *BioDrugs* 2012; 24: 99–108.
- 3 Brennan KJ, Simone A, Tran N, Gage FH. Modeling psychiatric disorders at the cellular and network levels. *Mol Psychiatry* 2012; 17: 1239–1253.
- 4 Ferland RJ, Guemini R. Nodular heterotopia is built upon layers. *Neurology* 2009; 73: 742–743.
- 5 Smiley JF, Rosoklija G, Mancevski B, Mann JJ, Dwork AJ, Javitt DC. Altered volume and hemispheric asymmetry of the superficial cortical layers in the schizophrenia planum temporale. *Eu J Neurosci* 2009; 30: 449–463.
- 6 Hutslers JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res* 2010; 1309: 83–94.
- 7 Kwon HB, Kozorovitskiy Y, Oh WJ, Peixoto RT, Akhtar N, Saulnier JL et al. Neuro-ligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci* 2012; 15: 1667–1674.
- 8 Marin-Padilla M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J Comp Neurol* 1992; 321: 223–240.
- 9 Hill RS, Walsh CA. Molecular insights into human brain evolution. *Nature* 2005; 437: 64–67.
- 10 Hutslers JJ, Lee DG, Porter KC. Comparative analysis of cortical layering and supragranular layer enlargement in rodent carnivore and primate species. *Brain Res* 2005; 1052: 71–81.
- 11 Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 519–532.
- 12 Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HP, Livesey FJ. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci* 2012; 15: S471.
- 13 Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM et al. Modeling human cortical development *in vitro* using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 12770–12775.
- 14 Mizutani K, Saito T. Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* 2005; 132: 1295–1304.
- 15 Rodriguez M, Choi J, Park S, Sockanathan S. Gde2 regulates cortical neuronal identity by controlling the timing of cortical progenitor differentiation. *Development* 2012; 139: 3870–3879.
- 16 Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 2007; 39: 25–27.
- 17 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 101–106.
- 18 Boissart C, Nissan X, Graud-Triboulet K, Peschanski M, Benchoua A. miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* 2012; 139: 1247–1257.
- 19 Rishon GM. Small molecules that promote neurogenesis *in vitro*. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2008; 3: 200–208.
- 20 Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 2010; 464: 554–561.
- 21 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and IPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 275–280.
- 22 Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T et al. Neocortical layer formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. *Cereb Cortex* 2011; 21: 588–596.
- 23 Munji RN, Choe Y, Li G, Segenthaler JA, Pleasure SJ. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci* 2011; 31: 1676–1687.
- 24 Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KRA. Simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; 4: 67–73.
- 25 Desbordes SC, Studer L. Adapting human pluripotent stem cells to high-throughput and high-content screening. *Nat Protoc* 2012; 8: 111–130.
- 26 Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS. Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 215–224.
- 27 Hill JJ, Hashimoto T, Lewis DA. Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 557–566.
- 28 Shi Y, Kirwan P, Livesey FJ. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc* 2012; 7: 1836–1846.
- 29 Marchetto MC, Carroumeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2012; 143: 527–539.

- 30 Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhardt C, Tran N, Sangar S et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 473: 221–225.
- 31 Tashiro A, Minden A, Yuste R. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* 2000; 10: 927–938.
- 32 Wahl S, Barth H, Gossek T, Aktories K, Mueller BK. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* 2000; 149: 263–270.
- 33 Lin MY, Lin YM, Kao TC, Chuang HH, Chen RH. PDZ-RhoGEF ubiquitination by Cullin3-KLHL20 controls neurotrophin-induced neurite outgrowth. *J Cell Biol* 2011; 193: 985–994.
- 34 Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J, EP. Henske. Tuberlin, the tuberous sclerosis complex 2 tumor suppressor gene product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. *Oncogene* 2002; 21: 8470–8476.
- 35 Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 2002; 25: 191–199.
- 36 Margolis RL, Ross CA. Neuronal signaling pathways: genetic insights into the pathophysiology of major mental illness. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 350–351.
- 37 Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, Lafreniere RG, Yang Y, Henrion E et al. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 867–880.
- 38 Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Front Mol Neurosci* 2011; 4: 16.
- 39 Mines MA, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3: a promising therapeutic target for fragile x syndrome. *Front Mol Neurosci* 2011; 4: 35.
- 40 Bery-Kravis E, Krause SE, Block SS, Guter S, Wu J, Leurgans S et al. Effect of CX516, an AMPA-modulating compound, on cognition and behavior in fragile X syndrome: a controlled trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2006; 16: 525–540.
- 41 Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 6: 407–411.
- 42 Bar-Nur O, Caspi I, Benvenisty N. Molecular analysis of FMR1 reactivation in fragile-X induced pluripotent stem cells and their neuronal derivatives. *J Mol Cell Biol* 2012; 4: 180–183.
- 43 Kim KY, Hysolli E, Park JH. Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 14169–14174.
- 44 Mou X, Wu Y, Cao H, Meng Q, Wang Q, Sun C et al. Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with different karyotypes of Down syndrome. *Stem Cell Res Therap* 2012; 3: 14.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

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

II. Identification et validation de composés thérapeutiques pour l'autisme

1. Mise au point du test de criblage

Le premier grand enjeu de la thèse a été de mettre au point la méthode de criblage à haut débit pour l'identification de nouveaux composés thérapeutiques pour l'autisme. Le criblage visait à déterminer des composés régulant la transcription de *SHANK3*, dans le but de corriger l'altération du dosage chez les patients atteints d'autisme due à des mutations hétérozygotes sur le gène *SHANK3*. Comme dit précédemment, le test de criblage à haut débit que nous avons souhaité développer repose sur la mesure de l'expression de l'ARNm natif de *SHANK3* dans des neurones humains sains dérivés d'hESC.

Comme pour tout criblage, le test a dû être miniaturisé et automatisé. Pour ce faire, les cellules ont été cultivées en petit format, dans des plaques 384 puits. Les protocoles de cultures miniaturisées et automatisées étant déjà maîtrisés au laboratoire (Boissart et al., 2013), seule la mise au point du test de criblage a été nécessaire. La méthode HTS choisie pour ce travail repose sur un processus d'extraction/purification des ARNm directement dans les plaques 384 puits, grâce au kit commercial FastLane Cell Multiplex (Qiagen), suivi d'une mesure de l'expression de l'ARNm de *SHANK3* versus un gène de ménage par RT-qPCR Taqman en duplex.

Il a fallu, dans un premier temps, déterminer la densité cellulaire d'ensemencement nécessaire pour avoir un bon signal en qPCR, déterminé par les valeurs de Ct (Cycle threshold), (reflétant une quantité suffisante d'ARNm de *SHANK3* dans la culture) tout en conservant un bon pourcentage de différenciation neuronale. Différentes densités cellulaires d'ensemencement ont été testées, avec un minimum de 100 000 cellules/cm² (C/cm²). Cette densité cellulaire d'ensemencement minimale de 100 000 C/cm², soit 6 000 C/puits de p384, a finalement été choisie, car elle était suffisante pour avoir un bon signal de *SHANK3* en RT-qPCR Taqman (Tableau 8).

Tableau 8 : Mise au point de la densité cellulaire d'ensemencement pour le test de criblage.

Densité d'ensemencement	Ct SHANK3	% neurones
100 000 C/cm ²	24,2 ± 0,6	69,5 ± 2,8
133 000 C/cm ²	23,9 ± 0,4	70,6 ± 4,2
166 000 C/cm ²	24,0 ± 0,5	71,1 ± 5,3
200 000 C/cm ²	23,9 ± 0,4	74,5 ± 3,9

Grâce à la technologie FastLane, le processus d'extraction/purification de l'ARNm est réalisé théoriquement en moins de 12 min et repose sur trois grandes étapes :

- Une étape de lavage, où le milieu de culture est retiré et les cellules rincées avec un tampon spécifique. Cette étape est critique car la solution de lavage est toxique pour les cellules s'il reste trop longtemps à leur contact.

- Une étape d'incubation des cellules pendant 5 min à température ambiante avec un tampon permettant la lyse des cellules et l'extraction/stabilisation de leurs ARNm tout en éliminant l'ADN génomique.
- Une étape d'inactivation de l'enzyme DNase (contenu dans le précédent tampon), où le lysat d'ARNm est incubé à 75 °C pendant 5 min. A ce stade, le lysat peut être congelé et analysé par qPCR extemporanément.

Ces trois étapes ont dû être automatisées en utilisant la plateforme robotisée Bravo (Agilent) avec une tête pipeteuse 384. Les solutions tamponnées ont dû être transférées préalablement en microplaques 384 puits afin qu'elles puissent être délivrées de façon automatisée dans les plaques de culture. L'automatisation de la première étape, la plus critique, a nécessité la maîtrise de la vitesse et de la distance d'aspiration de la plateforme robotisée, afin de répondre aux exigences techniques telles que de retirer un maximum de milieu de culture et de tampon de lavage sans décoller les cellules, dans un délai acceptable. Le tableau 9 montre le succès de l'optimisation des deux premières étapes avec la plateforme robotisée.

Tableau 9 : Comparaison aspiration manuelle vs aspiration robotisée.

Type d'extraction	Ct SHANK3
Aspiration manuelle	24,4 ± 0,4
Aspiration robotisée	24,2 ± 0,6

L'étape 3, qui ne concerne que le transfert des lysats en plaque PCR 384 puits pour l'incubation à 75°C à l'aide d'un thermocycleur, a dû également être optimisée. En effet, les 5 minutes indiquées par le protocole du fournisseur ne suffisaient pas à inactiver la DNase, perdant ainsi le signal de SHANK3 en qPCR (Tableau 10). L'allongement du temps d'incubation à 20 minutes a été nécessaire pour restaurer un signal correct de SHANK3. L'automatisation de la méthode a ainsi permis de réaliser le processus d'extraction/purification de l'ARNm en 30 min de façon robuste et reproductible.

Tableau 10 : Optimisation du temps d'incubation pour l'étape d'inactivation de la DNase.

Temps d'incubation	Ct SHANK3
5 min	33,7 ± 3,9
8 min	28,1 ± 1,7
15 min	26,2 ± 1,1
20 min	23,6 ± 0,2
Contrôle 5 min en tube PCR	24,1 ± 0,5

La validation de la méthode d'analyse de l'expression de l'ARNm de SHANK3 par qPCR Taqman en duplex a été permise, en choisissant des sondes/amorces Taqman commerciales (Qiagen) pour *SHANK3* et un gène de ménage et en vérifiant la méthode de détection en duplex (Tableau 11).

Tableau 11 : Validation de la méthode Taqman en duplex.

	Ct SHANK3		Ct 18 S	
qPCR simplex	24,8	0,1	7,8	0,4
qPCR duplex	24,6	0,1	8,0	0,2

Concernant le gène de ménage, le gène de la *cyclophiline A (PPIA)* a été préférentiellement choisi par rapport au *18S*. En effet, ayant environ le même niveau d'expression que *SHANK3* (valeurs de Ct proches) (Tableau 12), la sélection de ce gène de ménage permet d'augmenter la sensibilité du test. Ainsi, l'analyse de l'ARNm de *SHANK3* par la technique Taqman en duplex, en utilisant le gène de ménage *PPIA*, est capable de mettre en évidence la diminution de 60 % de l'expression d'ARNm de *SHANK3* (observée par la technique de qPCR Sybr en simplex utilisée en routine au laboratoire) dans une lignée de neurones SA001 exprimant des ShRNA dirigés contre *SHANK3* (Figure 29).

Tableau 12 : Choix du gène de ménage.

Ct SHANK3		Ct 18S		Ct PPIA	
Moyenne	Ecartype	Moyenne	Ecartype	Moyenne	Ecartype
25,6	0,2	8,1	0,1	24,2	0,2

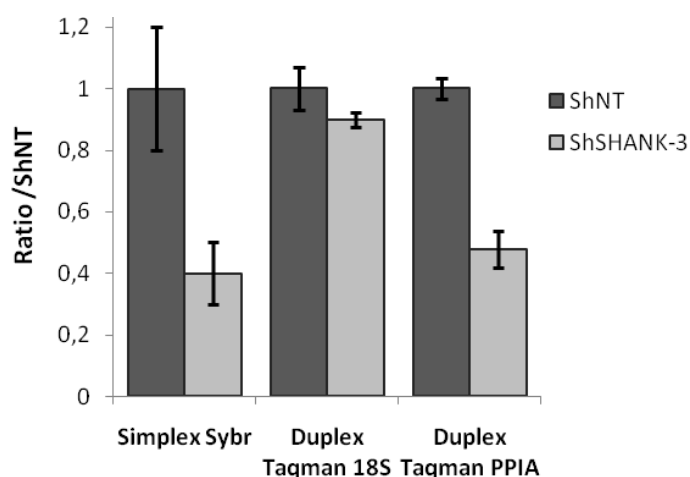


Figure 29 : Sensibilité de la méthode qPCR Taqman en multiplex.

Pour finir, la reproductibilité de la technique a été validée, en vérifiant les faibles variations des valeurs de Ct entre les puits (Tableau 13).

Tableau 13 : Reproductibilité du test de criblage employant l'extraction/purification des ARNm suivie de l'analyse RT-qPCR Taqman en duplex sur 66 puits.

	Moyenne	Ecartype
Ct SHANK3	24,12	0,73
Ct PPIA	23,64	0,82
$\Delta C(t)$	1,01	0,16

2. Criblage par HTS et validation des composés par HCS

Une fois, la méthode HTS mise au point, le criblage a pu démarrer. L'essentiel du travail de thèse, allant de la découverte de nouveaux composés par HTS jusqu'à la validation de ces molécules avec des tests secondaires par HCS sur neurones sains et malades, a fait l'objet d'un article en soumission (Darville et al. submitted).

Pour résumer, après avoir mis au point le test de criblage, évaluer les temps de traitement (24h) et de différenciation adéquats des neurones (14 jours) (Figure 30), un criblage sur 205 composés a été réalisé. Vingt neuf hits ont été identifiés lors du criblage primaire avec un critère de seuillage correspondant à 30 % d'augmentation de l'expression de l'ARNm de SHANK3. Quinze ont ensuite été confirmés grâce à des expériences de dose réponse. Parmi ces 15 hits, 6 ont été choisis pour une évaluation plus poussée de leurs effets, avec des tests secondaires. Des composés approuvés par la FDA ont été préférentiellement choisis : la fendiline dihydrochloride, le lithium, l'acide valproïque (VPA), l'aripiprazole et la fluoxétine. Enfin un composé, ciblant une nouvelle voie pharmacologique possible, a également été investigué : l'inhibiteur de la 5-lipoxygénase BWB70C (Figure 31). Les concentrations optimales pour chaque composés pharmacologiques ont été déterminées à partir des expériences de dose réponses : lithium 0,5 mM, VPA 2 mM, fluoxétine 10 μ M, aripiprazole 7,5 μ M, fendiline dihydrochloride 5 μ M et BWB70C 40 μ M.

La roscovitine n'apparaît pas dans l'article mais a également été investiguée. Sa dose optimale de 40 μ M (déterminée avec les expériences de doses réponses) étant toxique à long terme, sa dose a été diminuée à 10 μ M.

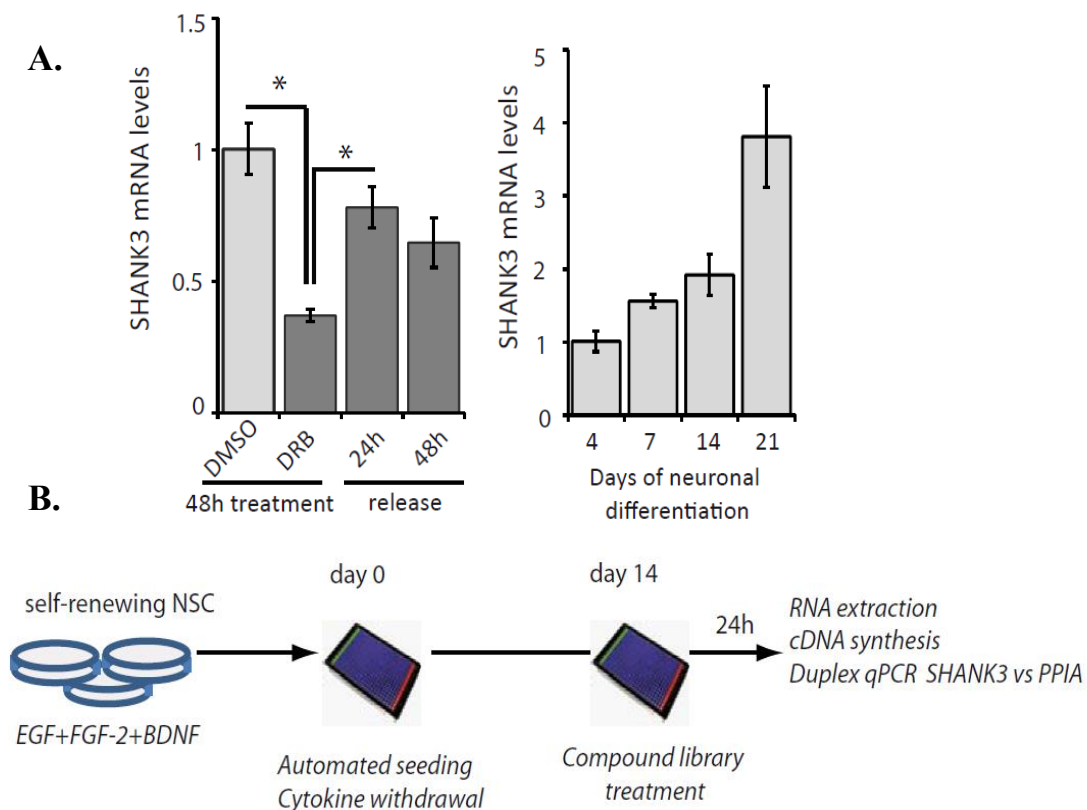
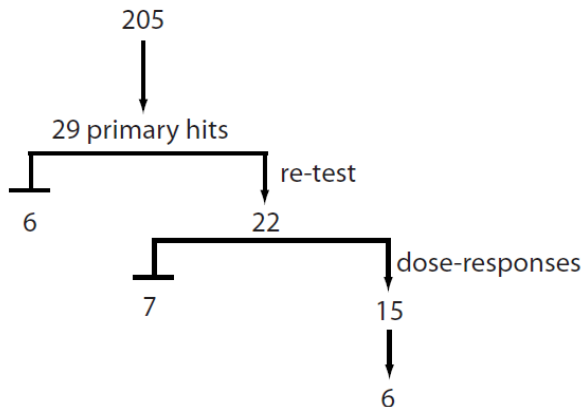


Figure 30 : Mise au point du test de criblage. A. Détermination du temps de traitement (24h) et du temps de différenciation neuronale (14 jours). B. Principe du test. Issue de Darville et al. submitted.



Compounds	Targets	Mean	SD (n=4)
PD 166865	FGF receptor kinase activity inhibitor	1.37	0.28
Tyrphostin 46	EGF receptor kinase activity inhibitor	1.63	0.19
Dorsomorphin	BMP receptor inhibitor	1.48	0.37
Trichostatin A	HDAC inhibitors	1.55	0.21
Fluoro-SAHA		1.43	0.50
Oxamflatin		1.37	0.14
Vorinostat (SAHA)		1.77	1.00
BWB 70C	5-lipoxygenase inhibitor	1.37	0.19
BML-259	Cyclin-dependant Kinases inhibitors	1.44	0.35
Roscovitine		1.50	0.11
Fendiline hydrochloride	Ca2+ channel inhibitor	1.80	0.75
Lithium	Central Nervous System, FDA-approved	1.38	0.19
Valproic acid		1.34	0.06
Aripiprazole		1.36	0.47
Fluoxetine		1.34	0.28

Figure 31 : Les hits découverts du HTS. Sur 205 composés criblés, 15 hits ont été confirmés pour augmenter la transcription de l'ARNm de SHANK3 et 6 (en rouge dans le tableau) ont été choisis pour faire l'objet d'études plus poussées avec des tests secondaires. Issue de Darville et al. submitted.

Les tests secondaires ont concerné la même lignée de neurones sains dérivée d'hESC SA001. Le but était de confirmer que l'effet positif des composés sur la transcription de l'ARNm de SHANK3 permettait bien l'augmentation de l'expression de la protéine SHANK3 et de l'activité glutamatergique.

Le premier test secondaire visait à évaluer l'effet des composés sur la production de la protéine SHANK3 et sa bonne localisation synaptique, apposée à des marqueurs présynaptiques et postsynaptiques dans des synapses glutamatergiques. Pour cela, des expériences immunocytochimiques par HCS ont été conduites, sur des neurones à 28 jours de différenciation (J28) préalablement traités pendant cinq jours avec les composés retenus du criblage primaire. Seuls 3 hits augmentent significativement l'expression de la protéine SHANK3 dans les neurites : le lithium, l'acide valproïque et la fluoxétine. Ces trois composés augmentent non seulement l'expression de la protéine, mais également le nombre de sites neuritiques où SHANK3 est accolée à un élément présynaptique (synapsine) et un élément postsynaptique (PSD-95), créant de nouvelles synapses glutamatergiques au sein de la culture neuronale (Figure 32). La roscovitine a également montré un effet positif à 10 μ M sur l'augmentation de la protéine SHANK3 et le nombre de synapses incluant SHANK3 (données non montrées).

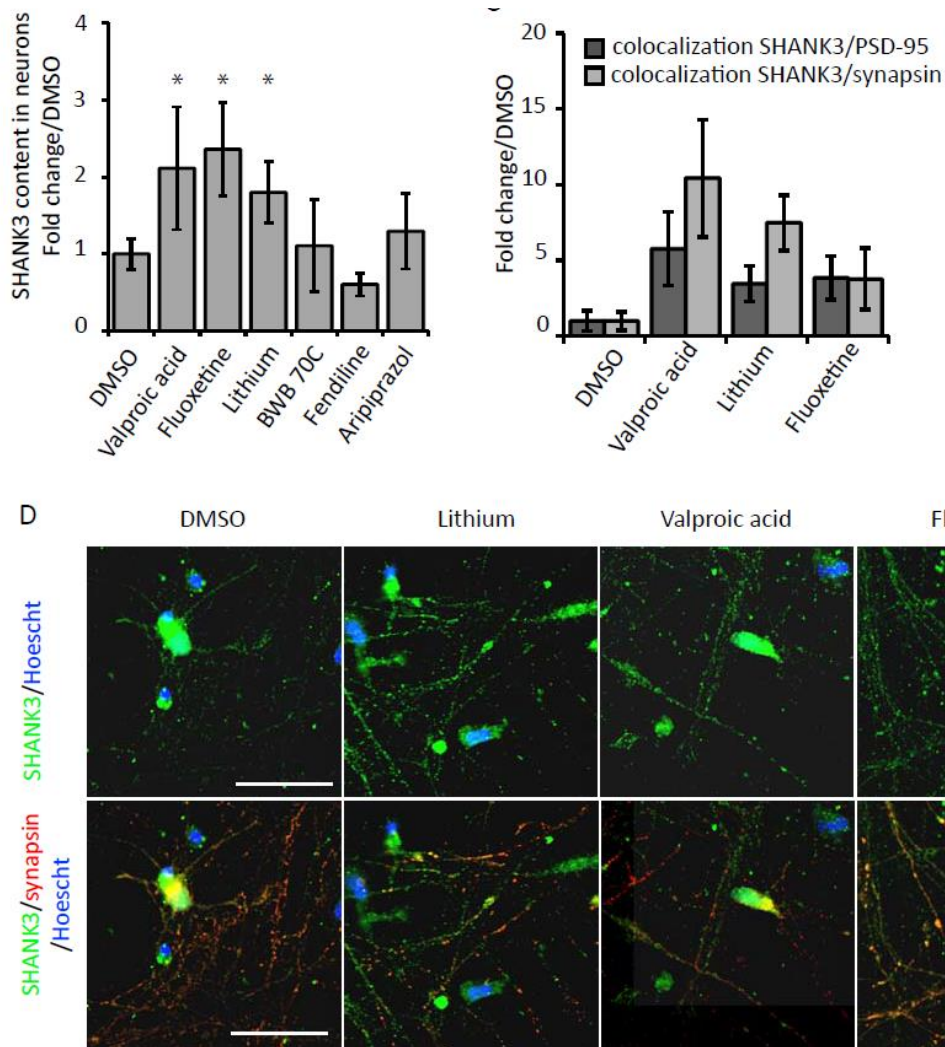


Figure 32 : Effet des composés sur l'augmentation de la protéine SHANK3 et le nombre de synapses incluant SHANK3 dans des neurones SA001 par immunocytochimie et HCS. Issue de Darville et al. submitted.

Le deuxième test secondaire visait à déterminer si l'effet des composés sur l'augmentation du nombre de synapses, contenant SHANK3, était associé à un changement fonctionnel de la connectivité neuronale. Des expériences secondaires de flux calciques, par HCS, ont donc été développées et menées. Les oscillations calciques spontanées de réseaux neuronaux à J42, préalablement traités pendant 5 jours, ont été mesurées en utilisant la sonde calcique Fluo-4. Les composés lithium et VPA augmentent significativement la fréquence des SCO, indiquant leur effet positif sur l'activité neuritique glutamatergique. Leurs effets ont été diminués avec le VPA voire totalement perdus avec le lithium sur des neurones exprimant des ShRNA dirigés contre SHANK3, indiquant que l'effet de ces molécules sur l'activité calcique dépendait, au moins en partie, de l'augmentation de l'expression de SHANK3. Cela suggère également une meilleure spécificité de l'effet du lithium, contrairement au VPA, par rapport à SHANK3, puisqu'une amélioration de l'activité est visible avec le VPA même dans des cultures neuronales déficientes en SHANK3 (Figure 33).

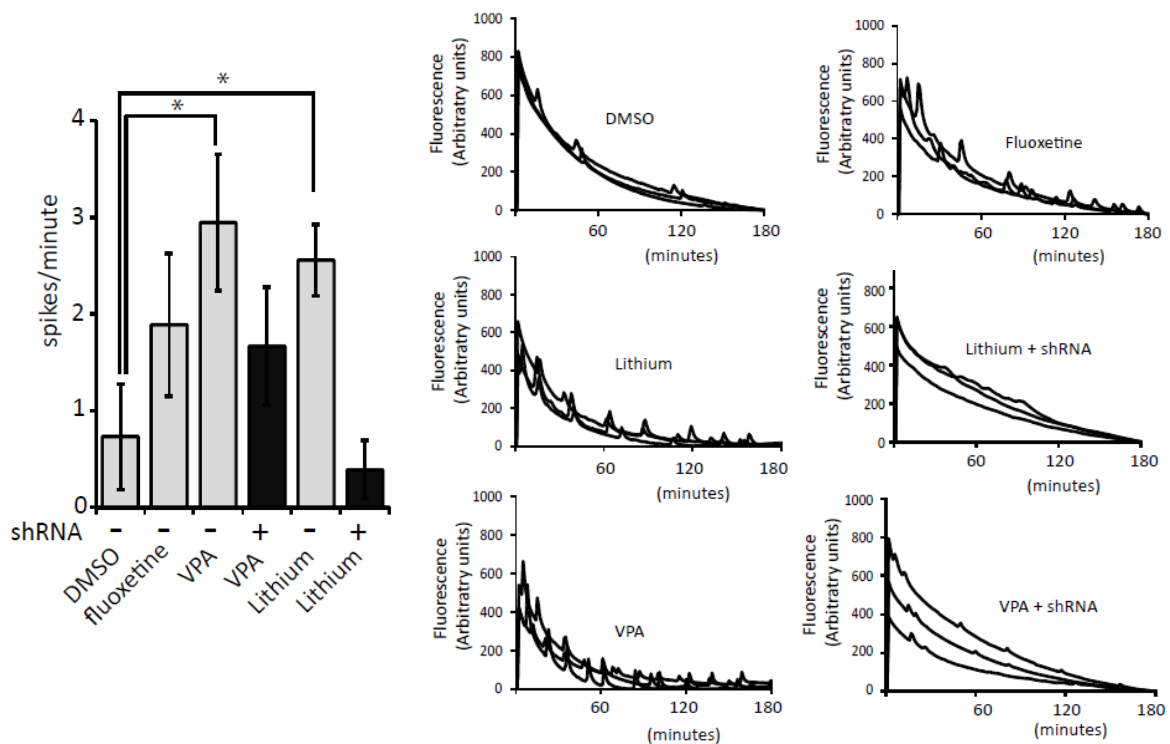


Figure 33 : Effet des composés sur l'activité neuritique glutamatergique par technique de flux calcique en HCS dans des neurones SA001 exprimant ou non des ShRNA dirigés contre *SHANK3*. Issue de Darville et al. submitted.

Afin d'étudier un peu mieux la spécificité de ces deux composés, des qPCR arrays commerciaux ont été utilisés pour déterminer les effets du lithium et du VPA sur la modification d'expression de gènes clés pour la plasticité synaptique et la neurotransmission GABAergique et glutamatergique (environ 150 gènes testés). Cette expérience a montré que le lithium exerçait un effet discret (de 40 à 300 % d'augmentation) sur seulement quinze gènes, dont six partenaires directs ou indirects de *SHANK3* à la synapse : *HOMER2*, les récepteurs métabotropiques au glutamate *GRM1*, *GRM3* et *GRM6*, la sous-unité *NR4A1* des récepteurs au NMDA et la métalloprotéinase matricielle 9 (*MMP-9*). Les neuf gènes additionnels concernés sont deux neurotrophines (*NTF3* et *NTF4*), deux transporteurs du GABA (*SLC6A12* et *SLC6A13*), l'interleukine *IL1B*, la vasopressine (*AVP*), le récepteur purinergique *P2RX7* et deux protéines kinases (*PRKG1* et *PRKCG*). Au contraire, le VPA modifie profondément la synapse, avec plus de 65 % des gènes surexprimés (de 50 à 3 400 %), suggérant que l'effet de ce dernier n'est pas du tout spécifique de *SHANK3*. Le lithium est probablement donc un candidat plus adéquat pour la stratégie d'une médecine plus spécifique et plus personnalisée (Figure 34).



Figure 34 : Heat map de l'effet du lithium et du VPA sur l'expression de 150 gènes impliqués dans la plasticité synaptique et la neurotransmission glutamatergique et GABAergique. Issue de Darville et al. submitted.

Pour finir, nous avons voulu tester les composés en condition pathologique et valider notre stratégie de travail. Notre hypothèse était que la restauration d'un dosage correct de SHANK3, en augmentant la transcription de l'allèle sain, suffirait à améliorer la transmission glutamatergique déficiente associée à l'haploinsuffisance de *SHANK3* chez les individus atteints d'autisme. Pour cela, nous avons donc produit des neurones dérivés d'iPSC de patients autistes portant des mutations sur le gène *SHANK3* (voir Résultats partie I) et testé l'efficacité des deux composés sur ceux-ci. SHANK3-STOP correspond à l'ASD1 de l'article Boissart et al., 2013 et SHANK3 frame shift à l'ASD3. De la même façon que dans les neurones SA001, le lithium et le VPA ont été capables d'augmenter le nombre de synapses incluant la protéine SHANK3 dans les neurones ASD. Pour évaluer la récupération fonctionnelle, des expériences de flux calcique ont été réalisées sur les deux lignées de neurones ASD (\pm traités) et les deux lignées contrôles (SA001 et 1869). Les neurones ASD à J45 ont montré une réduction de l'amplitude et de la fréquence des SCO comparés aux deux lignées contrôles, qui a pu être partiellement restaurée avec un traitement au VPA et au lithium. Ce résultat valide ainsi notre hypothèse de travail. De plus, cet effet bénéfique a été rapporté quelque soit la mutation du patient (mutation non sens ou frame shift), suggérant que la démarche thérapeutique choisie est pertinente et pourrait convenir à de nombreux patients autistes ayant une haploinsuffisance de *SHANK3* (Figure 35).

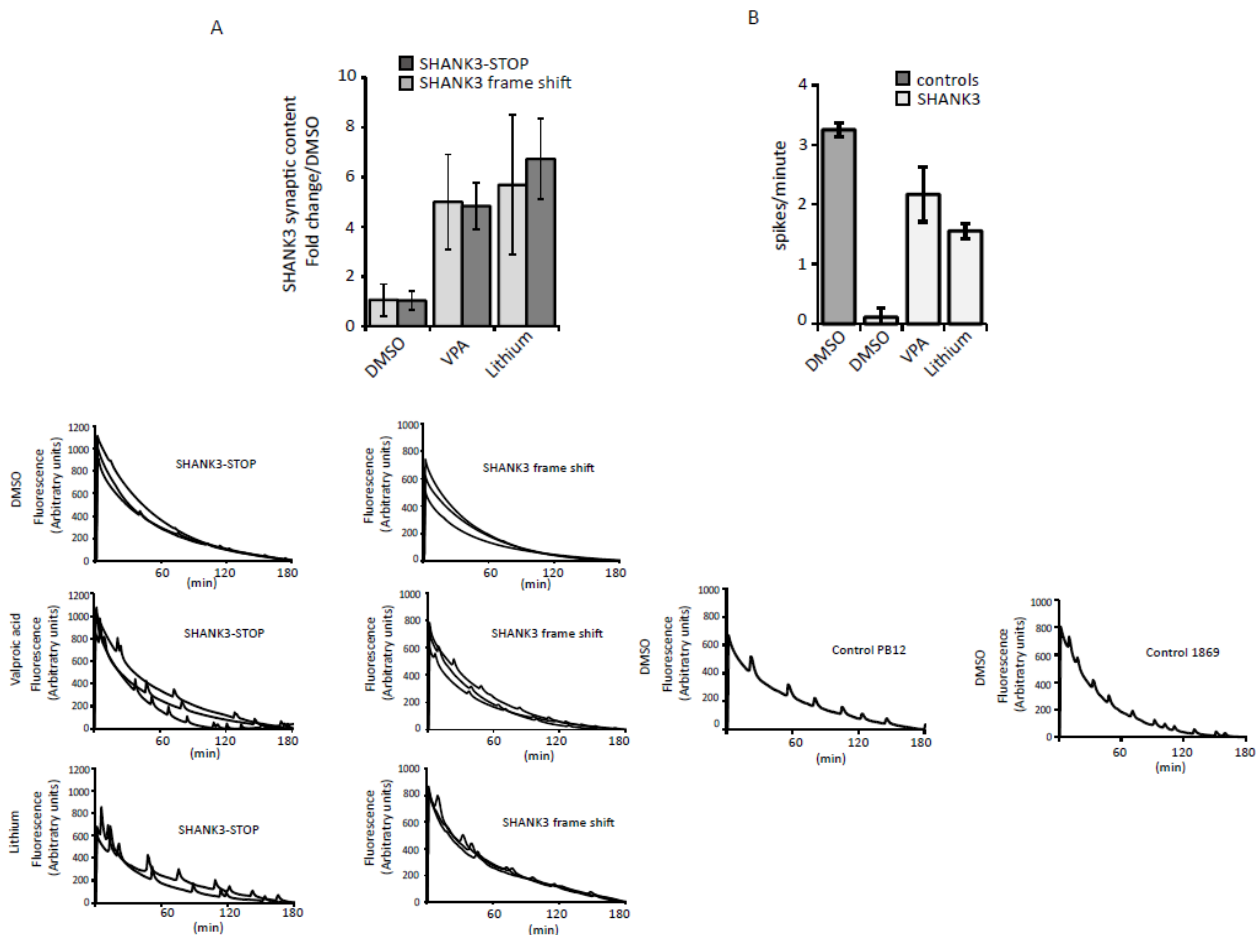


Figure 35 : Effet des composés dans des neurones dérivés d'iPSC de patients autistes portant des mutations sur le gène *SHANK3*. A. Sur le nombre de synapses incluant SHANK3 par immunocytochimie. B. Sur l'activité neuritique glutamatergique par technique de flux calcique. Issue de Darville et al. submitted.

Article 2

Human pluripotent stem cell-derived cortical neurons for high throughput medication screening in autism: a proof of concept study in SHANK3 haplo-insufficiency syndrome

Hélène Darville, Aurélie Poulet, Frédérique Rodet-Amsellem, Laure Chatrousse, Julie Pernelle, Claire Boissart, Francis Cogé, Mark J Millan, Thomas Bourgeron, Marc Peschanski, Richard Delorme and Alexandra Benchoua

Human pluripotent stem cell-derived cortical neurons for high throughput medication screening in autism: a proof of concept study in SHANK3 haplo-insufficiency syndrome

Hélène Darville¹, Aurélie Poulet¹, Frédérique Rodet-Amsellem², Laure Chatrousse¹, Julie Pernelle^{3,4}, Claire Boissart¹, Francis Cogé⁵, Mark J Millan⁵, Thomas Bourgeron^{6,7,8}, Marc Peschanski³, Richard Delorme^{2,7} and Alexandra Benchoua¹

¹CECS, I-STEM, AFM, 91030 Evry Cedex, France;

²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, Paris, France

³INSERM UMR 861 I-STEM AFM, 91030 Evry Cedex, France

⁴UEVE UMR 861 I-STEM AFM, 91030 Evry Cedex, France

⁵IDR Servier, Croissy sur Seine, France

⁶Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, Paris, France

⁷CNRS URA 2182 'Genes, synapses and cognition', Institut Pasteur, Paris, France

⁸University Denis Diderot Paris 7, Paris, France

Correspondence to A.B.: CECS, I-STEM, AFM, 5 rue Henri Desbrueres, Genopole campus 1, 91030, Evry Cedex, France. E-mail: abenchoua@istem.fr

Key words: autism, SHANK3, personalized medicine, high throughput screening, lithium, drug repurposing

ABSTRACT (244)

Background

Autism spectrum disorders (ASD) affect millions of individuals worldwide, but their heterogeneity complicates therapeutic intervention that is essentially symptomatic. A versatile yet relevant model to rationally screen among hundreds of therapeutic options in a patient-oriented manner would help improving clinical practice. Here we investigated whether neurons differentiated from pluripotent stem cells can provide such a tool using ASD associated to *SHANK3* haplo-insufficiency as a proof of principle.

Methods

A library of compounds was screened for potential to increase *SHANK3* mRNA content in neurons differentiated from control human embryonic stem cells. Using induced pluripotent stem

cell technology, active compounds were then evaluated for efficacy in correcting dysfunctional networks of neurons differentiated from individuals with deleterious point mutations of *SHANK3*.

Findings

Amongst 205 compounds tested, 15 increased significantly *SHANK3* expression, including 6 FDA-approved drugs. Two of the latter, lithium and valproic acid, increased the number of *SHANK3*-containing synapses and neuronal connectivity. Further, agents both corrected the abnormal functional phenotype associated with *SHANK3* haplo-insufficiency in patient-derived neurons. Lithium pharmacotherapy was subsequently evaluated in one patient and, after one year, a decrease in autism severity was observed.

Interpretation

Pluripotent stem cell-derived neurons provide a novel cellular paradigm exploitable in the search for specific disease-modifying treatments focusing on the correction of anomalous molecular pathway causing autism, rather than just relief of symptoms. They allow for evaluation of hundreds of candidates on neurons derived from patients themselves, thus enhancing the chance of therapeutic success in specific sub-groups of individuals.

Funding

Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon), French National Health Institute (INSERM), French National Research Agency (ANR), Bettencourt-Schueller foundation, Conny-Maeva Charitable Foundation, Cognacq Jay Foundation, Orange Foundation, Fundamental Foundation, Servier laboratories.

INTRODUCTION

Autism spectrum disorders (ASD) are a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders that affect 1% of the population in developed countries and are characterized by persistent impairment in reciprocal social communication and restricted repetitive patterns of behavior¹. Challenges in developing efficient pharmacotherapies for ASD reside in the limited understanding of ASD etiology, the difficulties to experimentally model the disease, the heterogeneity of symptoms and the large variety of potential triggers. Nonetheless, in around a third of patients a genetic cause has been identified² and there appears to be a convergence on mechanisms controlling synaptic homeostasis and neuronal connectivity^{2,3,4}. Synapses and altered neuronal networks could be a relevant target to develop new therapeutic strategies for ASD^{5,6}. Improved understanding of the molecular substrates of autism is raising the hope of innovative “disease-modifying” treatments for altering the course of the disorder.

However, while resulting in similar pattern core of symptoms, the synaptic/connectivity alterations in individuals with ASD show a considerable degree of heterogeneity, which may mask the potential beneficial effects of a tested treatment if it is not addressed properly to a subgroup of individuals stratified on the basis of the affected genes or pathways rather than on the clinical phenotype *per se*⁶. This pleads for the design of new experimental and pre-clinical models to identify more personalized pharmacotherapies, approaches that require an access to relevant

cellular models and tools that would allow analyzing at highthroughput the effects of potential therapeutic compounds on human neurons.

In this light, we have previously shown that cortical neurons can be specifically differentiated from pluripotent stem cells (PSC) of either embryonic origin (human embryonic stem cells, hESC) or reprogrammed from somatic cells of patients with ASD (human induced pluripotent stem cells, hiPSC), and that they can serve as a cellular paradigm for high throughput screening (HTS) campaigns⁷. Permitting the systematic comparison of hundreds of small molecules in parallel, this can therefore accelerate identification of therapeutic compounds targeting pathophysiological mechanisms underlying distinct forms of ASD. The goal of the present study was to verify such a strategy by focusing on a key autism-associated gene *SHANK3* that synthesized synaptic protein.

The synaptic protein SHANK3 has been linked to autism in different genetic screens where deleterious mutations affecting the *SHANK3* gene were present in 0.69 to 2.12% of individuals^{8,9}. SHANK3 is an abundant component of the post-synaptic density (PSD) where it acts as a scaffolding protein recruiting key post-synaptic elements, such as glutamate receptors, and linking them to the actin cytoskeleton¹⁰. This scaffolding role contributes to the formation, stabilization and strengthening of the glutamatergic synapses and increases the efficiency of the glutamatergic transmission¹¹. *SHANK3* Knock-Out mice recapitulate some key autistic behaviors and show reduced number and activity of glutamatergic synapses as well as loss in experience-linked plasticity¹². At the cellular level, neurons differentiated from iPSC derived from individuals with SHANK3 haplo-insufficiency, exhibit impaired electrophysiological responses to glutamatergic synapse stimulations that can be corrected by re-introducing SHANK3 expression¹³. Decreased glutamatergic neurotransmission thus appears as a central feature of SHANK3 haplo-insufficiency and it can be reversed by restoring correct dosage of *SHANK3*³. In ASD individuals, *de novo* loss-of-function mutations of *SHANK3* reported in the literature affect only one allele of the gene, offering the opportunity to enhance transcription of the second allele, or improve mRNA stability and translation. We have therefore developed a high throughput molecular screening assay in order to pinpoint compounds increasing SHANK3 mRNA levels in human neurons derived from pluripotent stem cells.

METHODS

Human Pluripotent Stem Cells (hPSC) origin

One hESC and 4 iPSC lines were used in this study. The male hESC line SA001 was obtained from Cellartis (Goteborg, Sweden). The work involving hESC line was supervised by the French Bioethics Agency (Agreement number NOR AFSB 12002 43S). The control iPSC line 1869 was published previously⁷ and reprogrammed from fibroblast obtained at the Coriell's biorepository (Coriell Institute for Medical Research, NJ, USA). The control line PB12 was reprogrammed from PBMC obtained from an anonymous blood donor at the French Blood Donor Organization (EFS) after obtaining the full consent of the donor. SHANK3-iPSC lines were derived from fibroblasts of 2 autistic children with *de novo* SHANK-3 mutations. The 2 patients were diagnosed with

autism and severe intellectual deficiency at the Robert Debré Hospital according to DSM-IVTR criteria. Patient 1 (AUN-003,⁹) carries a *de novo* truncating mutation E809X in exon 22 and corresponds to iPSC line SHANK3-STOP. Patient 2 carries a frame shift mutation (c.3853_3857dup, p. Gly1287Alafs X15) and corresponds to the iPSC line SHANK3 frame-shift. Both were included initially in a national observational study (IDRCB 2008-A00019-46) and, in this context, were submitted to whole genome sequencing to exclude additional autism-linked mutations. After patient's legal representatives approval, 8-mm skin punch biopsies were obtained (study approval by Comity for the Protection of Persons CPP no. C07-33). Fibroblasts were derived from the donated tissue and reprogrammed using the four human genes *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc*, and *KLF4* cloned in Sendai viruses (Invitrogen) and iPSC lines characterized according to Nakagawa et al.,¹⁴.

Derivation of cortical Neural Stem Cells (NSC) from PSC

Commitment of PSC to the neural lineage and derivation of stable cortical NSC was described previously^{7,15}. Briefly, neural commitment was induced using the BMP inhibitor Noggin (500 ng/ml, Peprotech, London, UK) and the Nodal inhibitor SB431542 (20µM, Tocris Biosciences, Ellisville, Missouri, USA). At day 10, neural rosettes containing neuro-epithelial cells were collected and plated *en bloc* in poly-ornithin/laminin treated culture dishes in N2B27 medium containing Epidermal Growth Factor (EGF, 10ng/ml), FGF-2 (10ng/ml) and Brain-derived Growth Factor (BDNF, 20ng/ml). At confluence, the cells passages were performed using trypsin at a density of 50,000 cells/cm². Mass amplification was performed until passage 8 and cells were frozen. To start the terminal differentiation as post-mitotic neurons, cortical NSC were dissociated and plated in N2B27 without growth factors.

Compound library

Two hundred and five small molecules were investigated, belonging to two commercially available libraries (Screen-Well[®] Kinase Inhibitor library, Enzo-life Sciences, 80 compounds and Screen-Well[®] Epigenetics library, Enzo-life Sciences, 43 compounds), I-stem laboratory reference compounds (⁷, 50 compounds) and FDA approved drugs or related active principle (33 compounds). The complete list of compounds is provided in Table S1.

Automated and high throughput quantification of SHANK3 mRNA in human neurons

To start cortical neuron differentiation, NSC were dissociated and plated in N2B27 at a density of 6000 cells/wells in poly-ornithin/laminin pre-treated 384 well plates using the Bravo[™] automated liquid handling platform equipped with a 384 pipette head (Agilent Technologies Inc, Santa-Clara, CA, USA). Half of the medium was changed twice a week. In those conditions, neuronal differentiation is achieved after 11 to 14 days. Kinetic of SHANK3 mRNA expression was established to determine the best time point to perform the screening (Figure S1) and day 14 was chosen since it offered the best dynamic range to quantify increase in SHANK3 mRNA expression. At day 14, compounds to be tested were added using the same platform in four replicates. The development and validation of the automated high throughput PCR assay by itself was performed following published standards for qPCR based HTS¹⁶. mRNAs were extracted and

directly converted in cDNA in the assay plate using the Fastlane technology (FastLane Cell Multiplex Kit, Qiagen) with minor modifications. A duplex qPCR strategy was used, consisting in amplifying and quantifying both *SHANK3* and the house keeping gene *PeptidylProlyl Isomerase A* (PPIA) in the same well (QuantiFast Probe Assay DP Kit). The robustness of this method was evaluated by performing it in 66 technical replicates. Ct values were consistent between technical replicates with minimal inter-well variations (Figure S1). In order to evaluate the sensitivity of the duplex TaqMan PCR to *SHANK3* mRNA level modifications, *SHANK3* specific shRNAs were used to artificially decrease the level of transcripts in PSC-derived neurons. Sister neuronal cultures were nucleofected (Amaxa, Lonza, Amboise, France) with non-targeting shRNAs as controls. The performance of the simplex method was compared with the automated duplex Taqman qPCR strategy and both strategies found equally efficient, indicating that automation and multiplexing had not compromised the sensitivity and specificity of the assay (Figure S1). Finally, the dynamics of *SHANK3* mRNA synthesis was analyzed in order to estimate a relevant duration of treatment with the tested compounds. Neurons were treated with 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) during 48h to block mRNA production (Figure S1¹⁷). Treatment with 100µM of DRB decreased SHANK3 mRNA content by 63%. After 24h of release from DRB, SHANK3 mRNA contents were partially reconstituted and reached 80% of the non-treated cells. Neurons were, therefore, treated over 24h for drug screening. The final screening workflow is summarized in Figure 1. Fold change variations induced by compound treatments were calculated using the $2\Delta\text{Ct}$ method with DMSO-treated cells as controls and PPIA as the reference gene.

Automated image-based high content screening

For high-content screening assays, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. Primary antibodies (Table S2) diluted in blocking buffer were applied overnight at 4°C. Hoechst 33258 (10µg/ml, Sigma) and secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States) were diluted at 1:1,000 in blocking buffer and applied for 2h at room temperature. Image acquisition and analyses were performed using the ImageXpress® Micro XLS System (MolecularDevices). To quantify synapses, a presynaptic marker and a postsynaptic marker were used and multiplexed with the neuronal markers HuC/D and beta III Tubulin (anti-Tuj-1 antibodies) to identify neurons and create a “neurite” mask. An algorithm was then generated using MetaXpress™ software application modules in order to identify pre- and post-synaptic spots specifically located on neurites, then to count the number of spot co-localization (considered as synapses). A minimum of 4 sites by well (approximately 200 neurons) was analyzed in at least 6 wells to reach statistical robustness.

Spontaneous calcium oscillation recording

After 35 days of differentiation, neurons were treated during 120h with compounds of interest in 384 well-plates. Cells were incubated for 10 min at 37°C with the Fluo-4 probe diluted at 1mM in a loading buffer (HBSS 1X, Hepes Buffer 20mM, pH 7.4). After 3 wash with a Mg²⁺-free Buffer (HBSS w/o CaCl₂, w/o MgCl₂, Hepes Buffer 20mM, CaCl₂ 2mM, pH=7.4), neurons were recorded in the Mg²⁺-free Buffer. The fluorescence reading was performed with the

ImageXpress® Micro XLS System (MolecularDevices) at 37°C. Neurons were recorded every second during 3 minutes with an exposure time of 350 ms. The total fluorescence curves were extrapolated using MetaXpress software.

Statistical analyses

Data were subjected to ANOVA following by a t-test to evaluate statistical differences between cells treated with tested compounds and DMSO-treated controls.

Role of the funding sources

Funders of the study had no role in study design, data analysis, data interpretation, or writing of the report. All authors had full access to the data and were jointly responsible for the decision to submit the manuscript.

RESULTS

A collection of 205 compounds was chosen for the primary screening of *SHANK3* regulators. This collection included a set of FDA-approved therapeutic compounds widely used for a variety of psychiatric and neurological diseases including epilepsy, bipolar disorders, major depressive disorders or schizophrenia. It also included epigenetic regulators, kinase inhibitors and compounds identified previously as modulators of neurogenesis⁷ (Table S1). Reprogramming of somatic cells into iPSC being potentially responsible for induction of epigenetic and imprinting alterations that could bias the study of gene regulation^{18, 19,20}, the primary drug screening was conducted using neurons differentiated from the control hESC line SA001. The 205 compounds were screened in 4 technical replicates at one concentration determined for each compound based on data from the literature or from our own previous findings^{7,21}. This primary drug screening identified 29 primary hits that increased *SHANK3* mRNA content by at least 30% as compared to DMSO-treated cells and with a deviation from the DMSO mean of more than 2 σ (Figure 1B and Table S1). Re-testing of these 29 hits in an independent experiment confirmed 22 compounds (Figure 1B). Dose-response experiments were then conducted and revealed a concentration-dependent mode of action for 15 of them (Figure S2). Among this list of 15 compounds, 6 were chosen to be further investigated: 5 FDA-approved compounds because they were potentially repurposable (fendiline dihydrochloride, lithium, valproic acid-VPA, aripiprazol and fluoxetine) and the 5-lipoxygenase inhibitor BWB-70C since this pathway can be targeted by the FDA-approved compound Zileuton. The optimal concentrations for each pharmacological compound were determined from the mRNA dose-responses curves, and defined as follows: lithium 0.5 mM, valproic acid 2 mM, aripiprazol 7.5 μ M, fluoxetine 10 μ M, fendiline 5 μ M, BWB70C 40 μ M (Figure S2).

Modification of SHANK3 synaptic content and neuronal activity by hit compounds

The functional potential of the six drugs was evaluated using as markers SHANK3 protein levels and its recruitment to the glutamatergic synapses, as well as the alteration of neuronal network

activity. The time course of synaptogenesis was analyzed by quantifying the number of spots of the pre-synaptic protein Synapsin and of the post-synaptic density component PSD-95 present on neurites, a co-localization suggesting a glutamatergic synapse (Figure 2A). In control cell cultures, expression of Synapsin and PSD-95 in the neuritic compartment progressively increased from day 14 to 28 and synapses were clearly present at day 28. The effects of the 6 compounds on SHANK3 synaptic content was therefore analyzed at that later stage. In order to optimally quantify SHANK3 protein production following treatment, cells were exposed to compounds for at least 120h.

Only 3 out of the 6 compounds increased SHANK3 at the protein level in neurons at the tested concentrations, namely lithium, VPA, and fluoxetine (Figure 2B). The same 3 compounds also significantly increased the number of neuritic sites in which SHANK3 co-localized with PSD-95 (Figure 2C and Figure S3), suggesting an efficient recruitment at the post-synaptic density. Treatment with lithium and VPA, but not fluoxetine, increased in a statistically-significant manner the co-localization of SHANK3 with the presynaptic marker Synapsin, taken as the indication of SHANK3 containing synapses (Figure 2C and D).

The relationship between the increased number of SHANK3-containing synapses and functional changes in the neuronal network connectivity was then investigated. At day 37, neurons were treated with Lithium, VPA or Fluoxetine during 5 days, then network spontaneous calcium oscillations (SCOs), reflecting the number of mature synapses^{22,23}, were measured using Fluo-4 calcium probe (Figure 3). Lithium and VPA, but not fluoxetine, increased SCOs frequency in treated cortical neurons in a statistically significant manner indicating increased network connectivity. This effect was strongly decreased (VPA) or totally lost (Lithium) in neurons in which shRNAs targeting SHANK3 were expressed, confirming that the effects of the drugs were dependent of SHANK3.

Global mRNA profiling of synaptic components following VPA and Lithium treatments

In order to document more globally the effect of lithium and VPA on synaptic mRNAs, expression profile of 150 neuronal and synaptic genes was established (Figure 4 and Table S3). Lithium exerted a discrete effect with only 16 genes up-regulated in the same range as *SHANK3*, i.e. with a fold change compared to DMSO of more than 1.4, none of them being up-regulated more than 3 fold. Among these 16 genes, 6 were direct or indirect partners of SHANK3 at the synapse, namely, the PSD protein HOMER2, the metabotropic glutamate receptors GRM1, GRM3 and GRM6, the NMDA receptor sub-unit NR4A1 and the metalloprotease MMP-9. The 10 additional genes were neurotrophins (*NTF3* and *NTF4*), GABA transporters (*SLC6A12* and *SLC6A13*), one purinergic receptor (*P2RX7*), interleukin *IL1B*, arginine vasopressin *AVP*, NO synthase *NOS-1* and two protein kinases (*PRKG1* and *PRKCG*). In contrast, VPA profoundly modified synaptic mRNAs content with more than 65% of the genes being up-regulated above 1.5 fold as compared to DMSO, and up to 34 fold changes.

Functional effects of Lithium and VPA on neurons differentiated from iPSC of ASD patients with a loss-of-function point mutation in the *SHANK3* gene.

iPSC lines were derived from two children with autism and severe mental retardation ID who carried two different deleterious mutations in one allele of *SHANK3* (*SHANK3*-STOP and *SHANK3* frame-shift, Figure S4⁹). The two mutations were predicted to lead to loss of function of one of the two alleles of *SHANK3*, leaving one functional allele. Neurons were differentiated and treated with either VPA or lithium. The two drugs increased the number of *SHANK3*-containing synapses in the two *SHANK3* genetic backgrounds (Figure 5A and Figure S4B). Day 45 neurons differentiated from *SHANK3* lines consistently showed reduced frequency and amplitude of SCO when compared to 3 control lines (SA001 and the iPSC lines 1869 and PB12, Figure 5B). VPA and lithium both restored SCO in *SHANK3* mutated lines (Figure 5B and C). This suggested that these two compounds may be of interest for patients from whom iPSC are derived.

Clinical assessment of lithium treatment on ASD severity in a *SHANK3*-STOP Patient

Patient AUN-003, from whom the iPSC line *SHANK3*-STOP was derived (*de novo* truncating mutation E809X) was enrolled in 2012, aged 12 years old, in an observational clinical study (Figure 6, T0). She had a severe autism spectrum disorder measured with the Social Responsiveness Scale (SRS, raw score = 101, t-score = 89), the Autism Diagnosis Observational Scale (ADOS, social affect domain raw score = 23) and the Autism Diagnosis Interview-Revised version (data not shown). She displayed a mild intellectual disability with contrasting results on the Peabody Picture Vocabulary Test (PPVT) (t-score: 101) and the Raven's progressive matrices (RPM) (raw score = 9, t-score: < 65). However, her adaptive behavior was below her cognitive ability based on the Vineland's module 2 (communication domain raw score = 41) or the Global Assessment Scale (GAS, raw score = 30). At T0, by screening her psychiatric comorbidity with the Kiddie SADS, a semi-structured interview, patient AUN-003 had no lifetime history of attention deficit hyperactive disorder (ADHD) or of bipolar affective disorders (including manic symptoms). Seven months later (Figure 6, black arrow), she developed symptoms of mood deregulation. During several months, she displayed major depressive symptoms followed by a hypomanic episode with mixed features. The maximum intensity of manic symptoms was retrospectively assessed with the Young-Mania rating Scale (Y-MRS, raw score = 26). Five months later, (Figure 6, red arrow), facing inability to control the symptoms, lithium was introduced as an indication for bipolarity. Considering the *in vitro* results obtained on her iPSC derived neurons, ASD scores were carefully assessed. After 8 months of treatment (T1), she displayed a clear improvement on manic symptoms (Y-MRS raw score = 18). In addition, a modest but significant positive effect was identified on ASD severity, as evaluated by the SRS (raw score = 84, t-score = 80), as well as on her cognitive performance measured with the RPM (raw score = 13, t-score < 70). However, the adaptive behavior was not improved whatever the scale considered (GAS = 25, Vineland communication domain score = 31). After one year (T2) adaptive behavior started to improve as compared to T1, though still close to the performance at T0 (GAS = 30, Vineland score = 35), i.e. before regression. In contrast, the caregivers reported additional improvement of autistic symptoms on the SRS (raw score = 73, t-score = 75), which was further confirmed by results on the ADOS (social affect domain raw score = 17). These two

tests revealed that ASD symptoms were lower than before regression. In contrast, there has been a degradation of her ability to control her impulsivity between T1 and T2, associated to distractibility. Caregivers mentioned that these symptoms differed from those observed during the manic episodes. Despite their late onset, symptoms were congruent with a diagnosis of ADHD (ADHD-RS, global raw score = 25). Table S4 reports in details the scores obtained for each tests and each sub-categories.

DISCUSSION

The main result of this study is the demonstration that Lithium, the FDA-approved drug for bipolar disorders, regulates *SHANK3* expression in a way that bears therapeutic potential for patients with autistic disorders associated to *SHANK3* haplo-insufficiency. This result has been obtained on the basis of a drug screening challenging molecular and functional phenotypes relevant to the disease in neurons derived from pluripotent stem cell lines, including from patients awaiting a treatment. This novel methodology for drug discovery is applicable to other forms of ASD with contrasting pathophysiological substrates, as well as to other CNS disorders with known molecular anomalies. As such, it offers an avenue to the stratification of treatment and, ultimately, personalized medicine.

SHANK3 haplo-insufficiency induced by heterozygous loss of function mutations represents a clear model of abnormal gene dosage leading to ASD phenotypes that can be reversed by re-introducing *SHANK3* normal levels of expression^{8,13}. As mentioned above, amongst the compounds regulating *SHANK3* identified in the present study, lithium proved a promising therapeutic agent for correcting *SHANK-3* haplo-insufficiency. Supporting our observations, lithium overcomes neonatal isolation-induced autistic-like behavior in a rat model by restoring the compromised balance between excitatory/inhibitory synaptic activities²⁴. In addition, lithium is proposed as a potential therapeutic approach for Fragile X syndrome. Chronic lithium treatment contributes to normalized behavior and synaptic transmission in mice models of Fragile X syndrome and pilot clinical trials have shown promising results in individuals with Fragile X syndrome²⁵. This suggests that lithium may have a global positive effect on glutamatergic synapse genesis and homeostasis. This would be consistent with mRNA profiling performed in the present study, which indicate that lithium positively regulates *SHANK3* and at least 6 of its protein-partners at the glutamatergic synapse. How lithium regulates *SHANK3* remains, however, to be fully characterized as lithium acts on a large variety of signaling pathways, including GSK-3 and HDAC^{26, 27, 28}. Clinical assessment of patient AUN-003 suggested that lithium, initially provided for bipolar disorders, improved also her ASD symptoms as evaluated using SRS and ADOS. Interestingly, after one year of treatment, performances on SRS and ADOS were better than when she was first enrolled in the study 2.5 years before (T0), i.e. before the beginning of mood deregulation. These effects on scales exploring ASD were not correlated with performance on global adaptation behavior scales (Vineland and GAS), suggesting that the improvement recorded for ASD symptoms was not, at least not only due to a recovery from regression or a placebo effect. Concomitantly, the patient developed ADHD like symptoms. These symptoms resembled

the hyperkinetic, manic-like, disorders described previously in two patients with SHANK3 duplication and mimicked in SHANK3 overexpressing mice²⁹. In this mouse model, lithium was inefficient at correcting SHANK3 dependent maniac-like behavior, in contrast to VPA, an atypical pharmacological profile for manic-like disorders. In light of our results, the up-regulation of SHANK3 by lithium may explain the lack of efficacy. Additional action of VPA on the GABAergic system may overall result in a correction of the manic-like behavior despite up-regulating SHANK3. Collectively, this suggests that lithium may have improved ASD symptoms but induced ADHD-like behavior by increasing SHANK3 in AUN-003. It would be interesting to challenge that hypothesis by accurately measuring the expression of SHANK3 in patients but, to our knowledge, there is still no technical method available to perform it on blood. These observations highlight that fact that proper SHANK3 dosage is critical for normal brain function and warrant deeper investigation of the mechanisms of action of lithium, VPA and related agents and their potential benefits for patients with SHANK3 haplo-insufficiency.

Over the past years, several hPSC from ASD individuals have been generated and neurons differentiated from these hPSC lines characterized³⁰. While primarily focused on identifying relevant cellular phenotypes that could discriminate disease-affected neurons from controls, these studies suggested that neurons differentiated from hPSC may serve as a valuable tool to support drug discovery. The present study is moving one step further towards personalized medicine in psychiatry: the assessment of the treatment success probability (among hundreds of therapeutic options) by using directly neurons derived from ASD patients awaiting treatment. In addition, the present study has broader implications for the rational design of a novel suite of course altering therapies for the treatment of ASD.

CONTRIBUTORS

Conception and design of the study: AB, MP, TB, RD; Screening and *in vitro* experimental design: HD, AP, AB, LC, CB, FC, MJM; Data collection, analysis and interpretation: HD, AP, FRA, LC, CB, JP, TB, RD, AB; Compound library design and providing: HD, MJM, FC, AB; Patients recruitment, genetic characterization and sampling: CN, TB, RD; Patients clinical evaluation and post-treatment follow-up: FRA, RD; Report first draft writing: HD, AB; Critical review and editing, MJM, TB, MP, RD. Study supervision: AB

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to I-Stem's HTS platform staff for constant technical support. We thank Cristel Depienne for patient recruitment, evaluation and sampling, the cell bank of Pitié-Salpêtrière hospital and the Clinical Investigation Center of Robert Debré hospital for technical assistance. H.D. received a PhD grant from Servier's laboratories. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This study has been in part funded by grants from "Investissements

d'Avenir" –(ANR-11-INBS-0009 - INGESTEM – and ANR-11-INBS-0011- NeurATRIS), the French national research agency ANR (ANR-13-SAMA-0006; SynDivAutism), the Bettencourt-Schueller foundation, the Conny-Maeva Charitable Foundation, the Cognacq Jay Foundation, the Orange Foundation, and the Fondamental Foundation. This study used samples from the NINDS Human Genetics Resource Center DNA and Cell Line Repository, as well as clinical data. NINDS Repository sample numbers corresponding to the samples used are GM 1869.

REFERENCES

1. Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, et al. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annual review of public health* 2007; **28**: 235-58.
2. Kumar RA, Christian SL. Genetics of autism spectrum disorders. *Current neurology and neuroscience reports* 2009; **9**(3): 188-97.
3. Toro R, Konyukh M, Delorme R, et al. Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends in genetics : TIG* 2010; **26**(8): 363-72.
4. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature reviews Neuroscience* 2015; **16**(9): 551-63.
5. Spooren W, Lindemann L, Ghosh A, Santarelli L. Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. *Trends in pharmacological sciences* 2012; **33**(12): 669-84.
6. Delorme R, Ey E, Toro R, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nature medicine* 2013; **19**(6): 685-94.
7. Boissart C, Poulet A, Georges P, et al. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Translational psychiatry* 2013; **3**: e294.
8. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature genetics* 2007; **39**(1): 25-7.
9. Leblond CS, Nava C, Polge A, et al. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS genetics* 2014; **10**(9): e1004580.
10. Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED. ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *Journal of neurochemistry* 2002; **81**(5): 903-10.
11. Grabrucker AM, Knight MJ, Proepper C, et al. Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *The EMBO journal* 2011; **30**(3): 569-81.
12. Peca J, Feliciano C, Ting JT, et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 2011; **472**(7344): 437-42.
13. Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, et al. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* 2013; **503**(7475): 267-71.
14. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* 2008; **26**(1): 101-6.
15. Boissart C, Nissan X, Giraud-Triboulet K, Peschanski M, Benchoua A. miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* 2012; **139**(7): 1247-57.
16. Bittker JA. High-Throughput RT-PCR for small-molecule screening assays. *Current protocols in chemical biology* 2012; **4**(1): 49-63.
17. Sehgal PB, Darnell JE, Jr., Tamm I. The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* 1976; **9**(3): 473-80.
18. Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Maysar Y, Eden A, Benvenisty N. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem cells* 2009; **27**(11): 2686-90.
19. Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 2010; **6**(5): 407-11.

20. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; **471**(7336): 68-73.
21. Georges P, Boissart C, Poulet A, Peschanski M, Benchoua A. Protein Kinase-A inhibition is sufficient to support human neural stem cells self-renewal. *Stem cells* 2015.
22. Dravid SM, Murray TF. Spontaneous synchronized calcium oscillations in neocortical neurons in the presence of physiological [Mg(2+)]: involvement of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors. *Brain research* 2004; **1006**(1): 8-17.
23. Cao Z, Zou X, Cui Y, et al. Rapid throughput analysis demonstrates that chemicals with distinct seizurogenic mechanisms differentially alter Ca²⁺ dynamics in networks formed by hippocampal neurons in culture. *Molecular pharmacology* 2015; **87**(4): 595-605.
24. Wu X, Bai Y, Tan T, et al. Lithium ameliorates autistic-like behaviors induced by neonatal isolation in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2014; **8**: 234.
25. Liu Z, Smith CB. Lithium: a promising treatment for fragile X syndrome. *ACS chemical neuroscience* 2014; **5**(6): 477-83.
26. Pasquali L, Busceti CL, Fulceri F, Paparelli A, Fornai F. Intracellular pathways underlying the effects of lithium. *Behavioural pharmacology* 2010; **21**(5-6): 473-92.
27. Wu S, Zheng SD, Huang HL, et al. Lithium down-regulates histone deacetylase 1 (HDAC1) and induces degradation of mutant huntingtin. *The Journal of biological chemistry* 2013; **288**(49): 35500-10.
28. Millan MJ. An epigenetic framework for neurodevelopmental disorders: from pathogenesis to potential therapy. *Neuropharmacology* 2013; **68**: 2-82.
29. Han K, Holder JL, Jr., Schaaf CP, et al. SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* 2013; **503**(7474): 72-7.
30. Acab A, Muotri AR. The Use of Induced Pluripotent Stem Cell Technology to Advance Autism Research and Treatment. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2015; **12**(3): 534-45.

FIGURES

Figure 1: SHANK-3 screening results

A: Screening work flow. B: Screening success rate. Among 205 molecules, 29 primary hits (increase of at least 30% of expression of the DMSO-treated wells which correspond to a statistical deviation of more than 2σ) were identified. Independent re-testing confirmed 22 compounds. Dose response experiments revealed a concentration-dependent mode of action for 15 compounds. Among this list of 15 compounds, 6 were chosen for further investigation. C: Table summarizing the name of the 15 compounds demonstrating a dose-dependent effect on up-regulating SHANK-3 mRNA, their known biological target or medical application and their performance in the primary screening. Results are presented as the mean fold-change values compared to DMSO treated cells and standard deviations (SD) of the 4 biological replicates. The 6 compounds chosen for further investigation are in red.

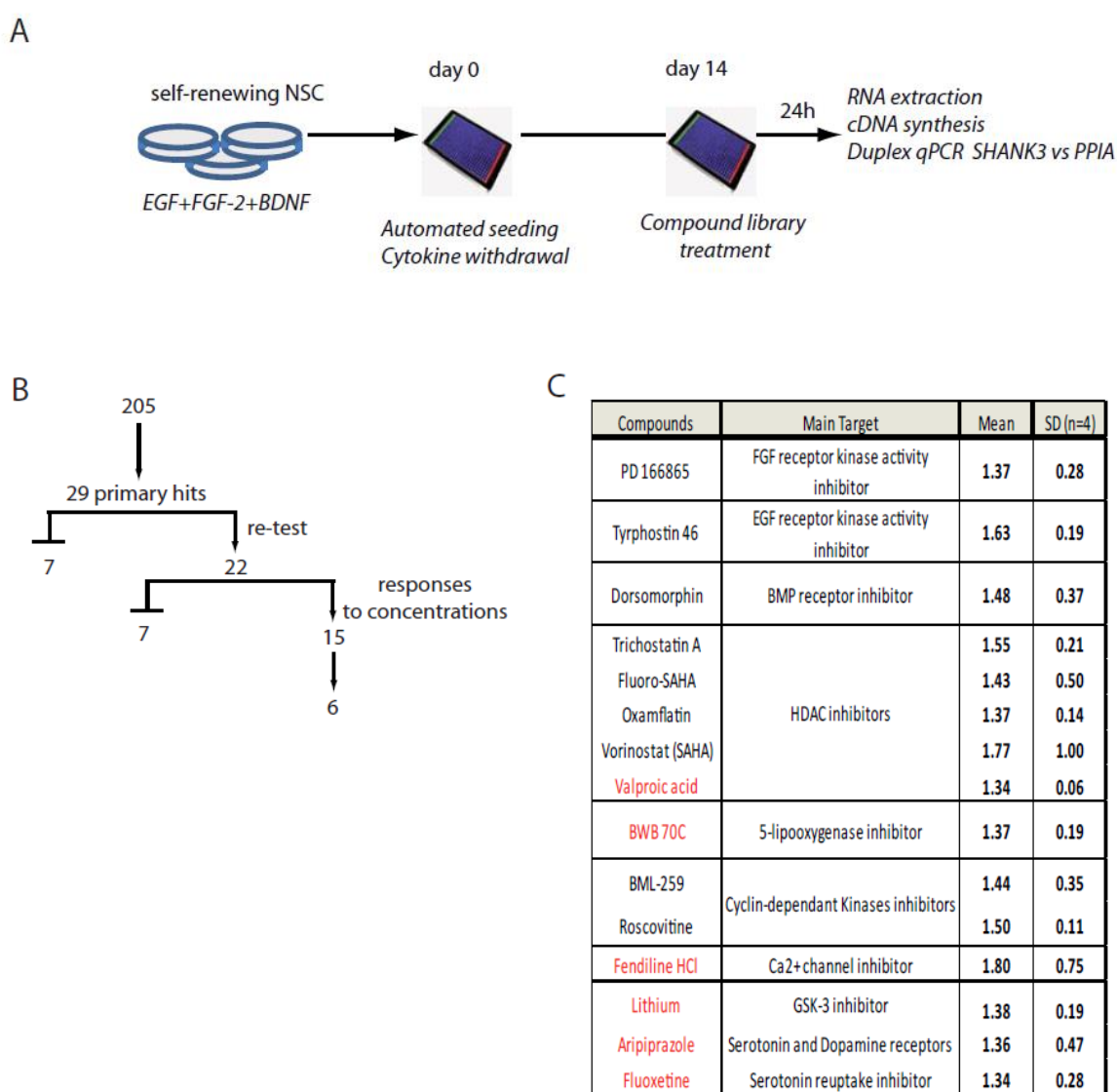


Figure 2: Effect of hit compounds on SHANK-3 protein expression and synaptic location

A. Time course analysis of synapse formation in hESC-derived developing neurons. Results are expressed as mean +/- SD of 3 independent experiments (left panel). Representative images of the pre-synaptic marker Synapsin (green) and the post-synaptic marker PSD-95 (red) are shown on the right panels. Arrow indicates example of colocalization of PSD-95 and Synapsin signaling structural synapses. B. Quantification of SHANK-3 protein expression on dendrites after treatment with hit compounds. Results are expressed as mean +/- SD of 3 independent experiments and as fold change compared to DMSO-treated cells. * p<0.01 Dunnet's test. C. Quantification of SHANK-3 protein colocalization with synapsin and PSD-95 after compound treatment. Results are expressed as fold change of DMSO treated cells (mean +/-SD). D. Representative image of SHANK-3 (green) colocalisation with Synapsin (red). Scale bar = 50 μm.

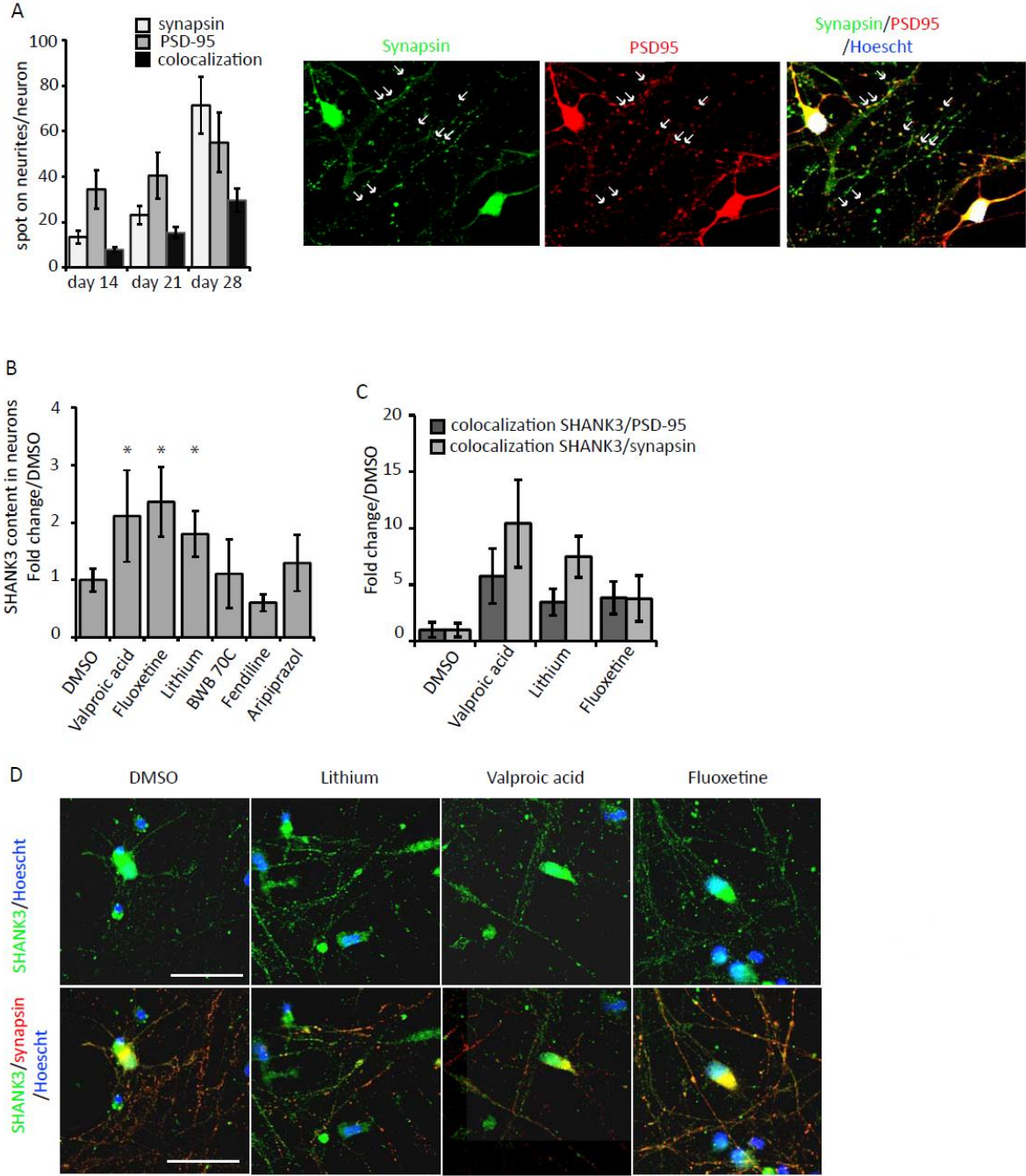


Figure 3: Functional analysis of neuronal network activity following compounds treatment.

A: Quantification of spontaneous calcium oscillations frequency (spikes/minutes) in neurons treated with Fluoxetine, Lithium and Valproic acid (VPA). OSC were recorded over a period of 180 minutes, results represent mean +/- of 3 independent experiments with several recording /treatment/experiment. *p<0.01 Dunnet’s test compared to DMSO treated cells. B: representative example of recordings.

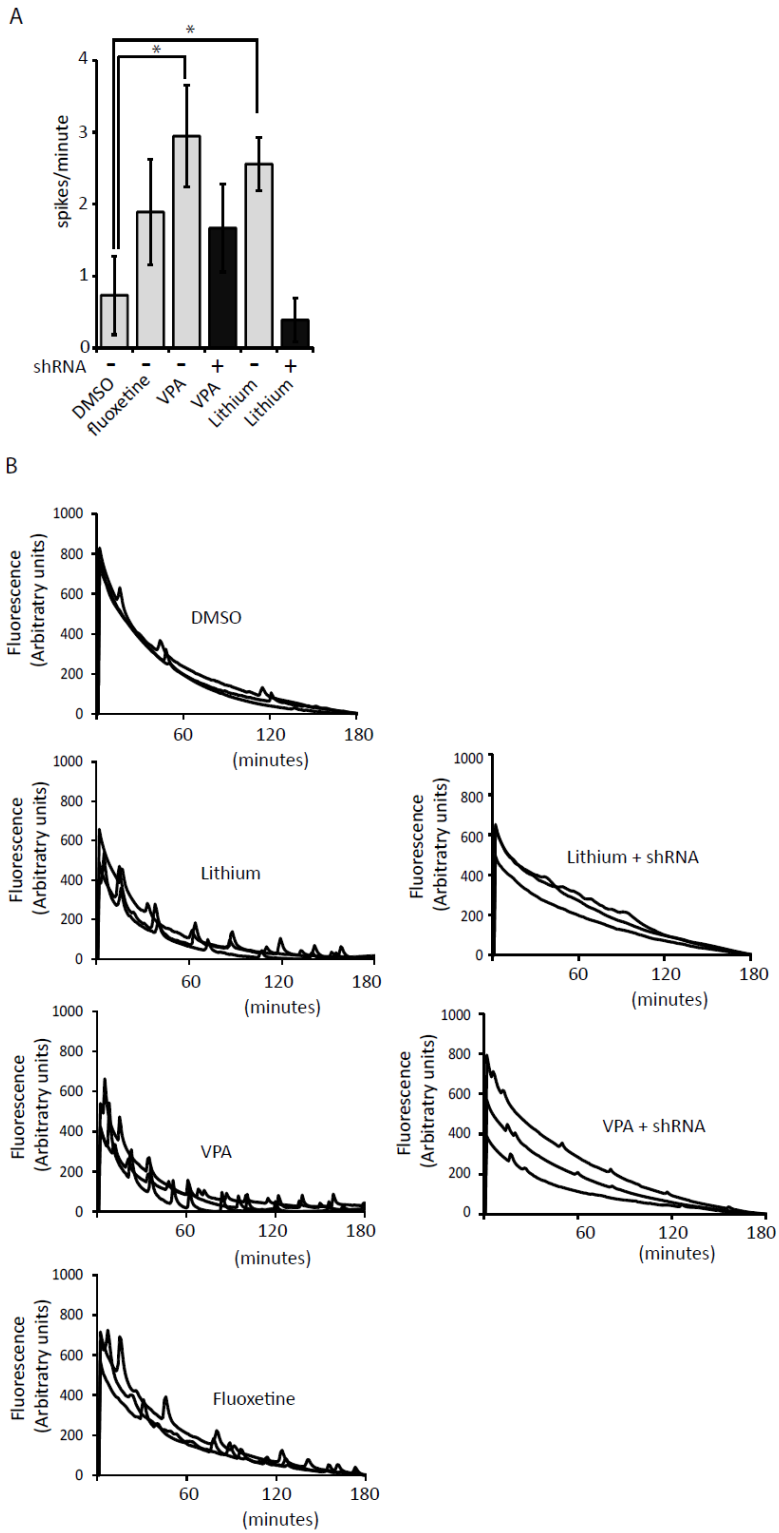


Figure 4: Expression profile of synaptic and neuronal mRNAs following compound treatment.

Heat map of gene expression profiling of 150 genes involved in synaptic plasticity (A) or GABA/gluatamate pathways (B) in DMSO (column 1), Valproic acid (VPA, column 2) or Lithium (column 3) treated neurons. FC: Fold change of mRNA expression when compared to DMSO-treated cells.



Figure 5: Compound efficiency in neurons differentiated from ASD individual-derived iPSCs.

A. Quantification of SHANK-3 synaptic content in neurons derived from two ASD individuals bearing two different SHANK-3 mutations after treatment with Valproic acid (VPA) or Lithium. Results are presented as fold change variation compared to DMSO-treated cells and represented as mean \pm SD of 3 independent experiments. B. Quantification of spontaneous calcium oscillation frequency, reflecting neuronal network activity, in control cells (lines SA001, PB12 and 1869) and in SHANK3 lines (SHANK3-STOP and SHANK3 frame-shift) with or without treatment with VPA or lithium. C. Representative calcium recordings.

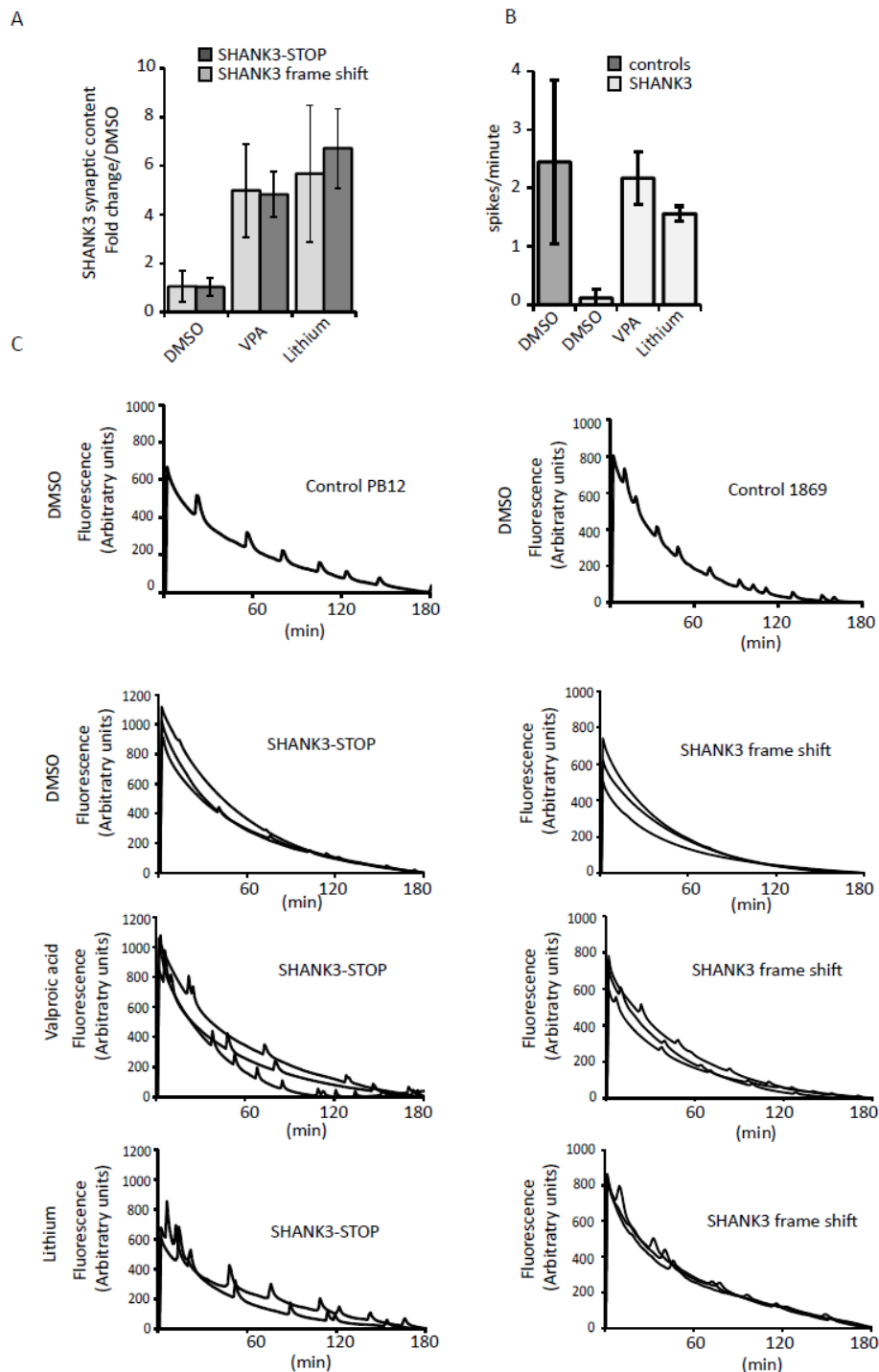
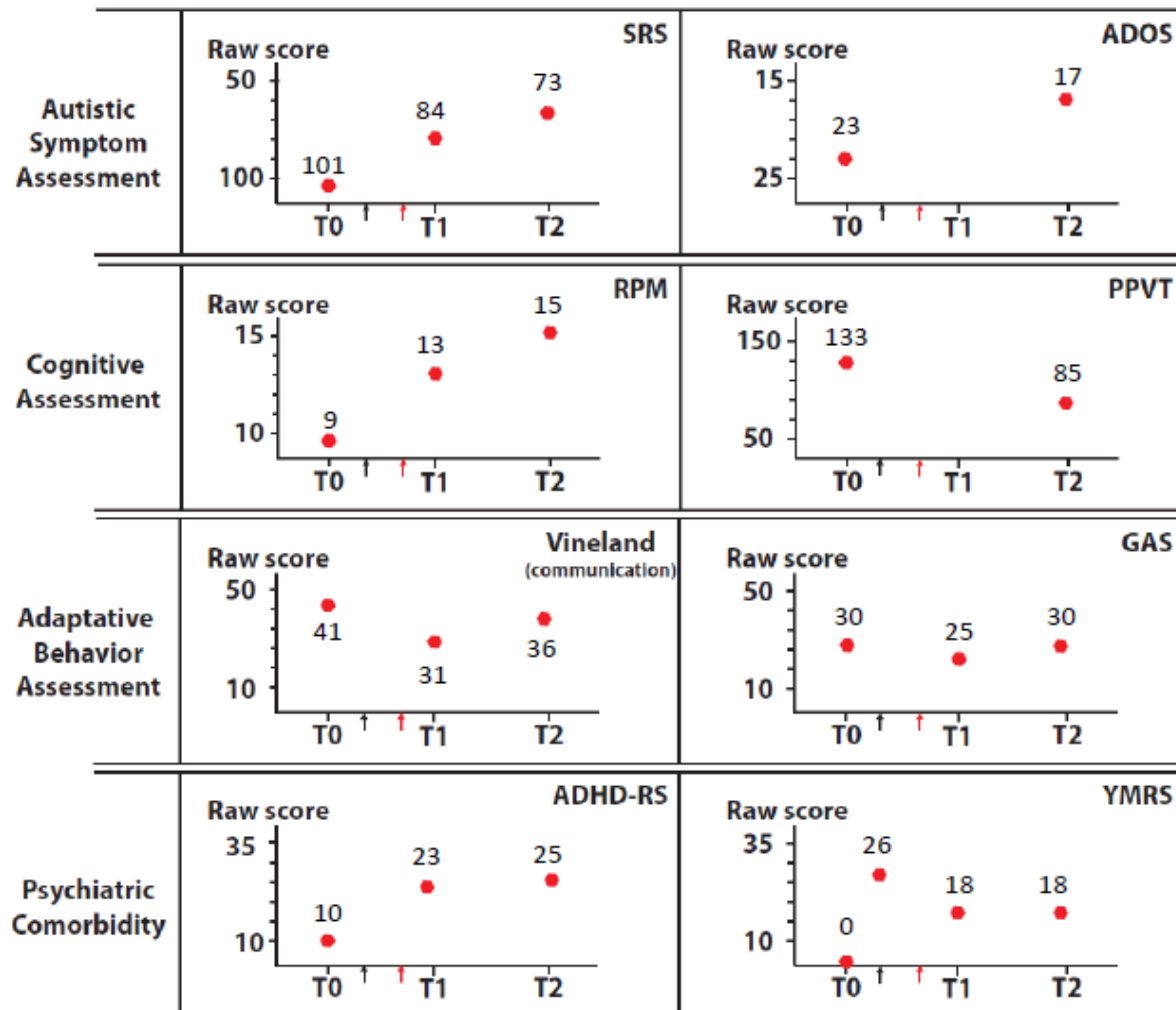


Figure 6: Clinical assessment of patient AUN-003 (SHANK3-STOP)

T0: Patient AUN-003, aged 12 years old was enrolled in the study (2012). Black arrow: she developed symptoms of mood deregulation and regression. Red Arrow: Start of lithium treatment (0.6 mL – 1000 mg/d). T1: 8 months follow-up, T2: one year follow-up. SRS: Social Responsiveness Scale, ADOS: Autism Diagnosis Observational Scale, RPM: Raven’s progressive matrices, PPVT: Peabody Picture Vocabulary Test, GAS: Global Assessment Scale, ADHD-RS: Attention deficit associated to hyperactivity disorder rating Scale, Y-MRS: Young-Mania rating Scale.



3. Etude mécanistique (Cdk5)

En plus de la découverte de molécules thérapeutiques potentielles, ce criblage a mis en évidence, avec l'identification de la roscovitine, une nouvelle voie de régulation possible de SHANK3 qui passerait par l'inhibition de la kinase cycline dépendante 5 (Cdk5). Un début d'étude mécanistique a été initié mais une preuve directe entre Cdk5 et SHANK3 n'a pas pu être établie par manque de temps. Ce travail devra être mené, d'autant plus que la roscovitine n'est pas spécifique de Cdk5, mais inhibe également d'autres kinases cycline-dépendante de la même famille comme Cdk1 et Cdk2.

Des premières études sur d'autres inhibiteurs de Cdk ont été menées en doses réponses, comme NU6102 (Cdk1/2/4), Flavopiridol (Cdk1/2/3/4/5), Purvalanol A (Cdk1/2/5), Aminopurvalanol A (Cdk1/2/5) et Alsterpaullone (Cdk1/2/5) (Figure 36). Ces expériences ont montré que tous les inhibiteurs de Cdk testés augmentaient l'ARNm de SHANK3, sauf NU6102 qui n'agit pas sur Cdk5, appuyant l'hypothèse mécanistique de l'implication de Cdk5. Le lithium également découvert dans ce criblage est connu pour son action inhibitrice sur GSK-3 (Kinase glycogène synthase 3) et Cdk5. Une voie de régulation possible *via* l'inhibition de GSK-3 a pu être écartée grâce à une expérience de dose réponse d'un inhibiteur de GSK-3, CHIR99021, qui ne montre pas d'effet sur la régulation de la transcription de l'ARNm de SHANK3 (Figure 37).

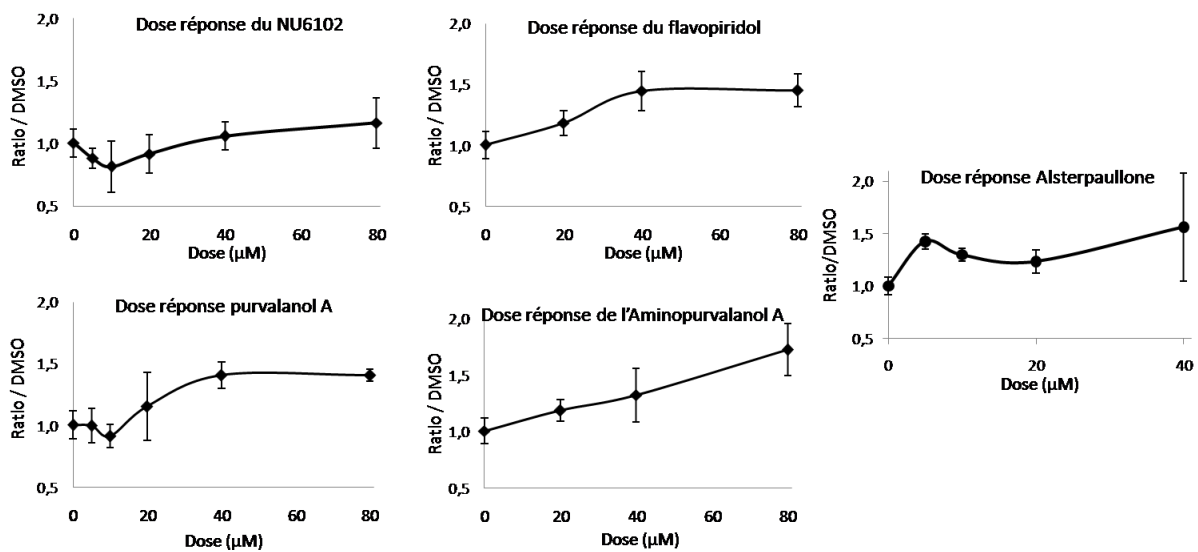


Figure 36 : Doses réponses d'autres composés de la famille des inhibiteurs de Cdk

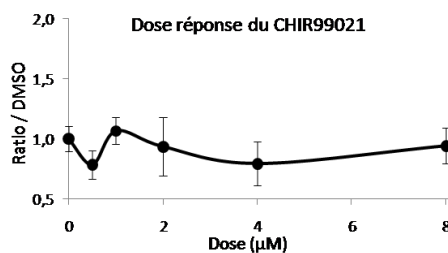


Figure 37 : Dose réponse de l'inhibiteur de GSK-3 CHIR 99021

Une expérience visant à faire le lien direct entre l'inhibition de Cdk5 et SHANK3 a ensuite été entreprise. Des neurones J14 ont été lipofectés avec un SiRNA (SiRNA-9, Qiagen) dirigé contre Cdk5 en utilisant la lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), et l'expression de l'ARNm de SHANK3 a été mesurée 48h après. Malheureusement, malgré de nombreuses optimisations de protocole de lipofection, la transfection reste insuffisamment efficace (30 % de diminution de Cdk5 seulement) et ne montre pas d'effet significatif de l'inhibition de Cdk5 sur l'expression de SHANK3 (Figure 38).

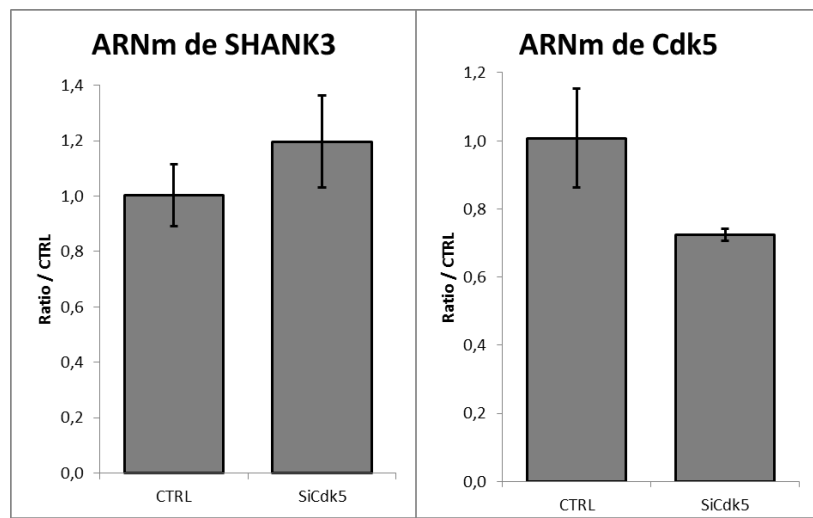


Figure 38 : Expression de l'ARNm de Cdk5 et de SHANK3, 48h après la lipofection de neurones J14 avec un SiRNA dirigé contre Cdk5.

III. Recherche d'un phénotype pathologique

Durant ma thèse, j'ai également travaillé sur la recherche de phénotypes pathologiques présents dans les lignées ASD par rapport aux lignées CTRL, pour évaluer l'efficacité thérapeutique des composés sortis du criblage.

❖ Phénotypes moléculaires et fonctionnels

La recherche d'une différence d'expression de l'ARNm de SHANK3 entre les lignées ASD et CTRL a tout d'abord été étudiée. Aucune différence n'a été observée (Figure 39), mais ce résultat était attendu étant donné que les mutations touchent plutôt la traduction que la transcription.

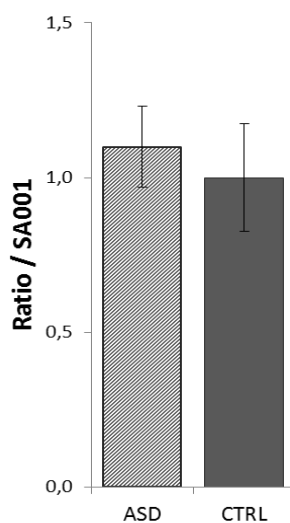


Figure 39 : Comparaison de l'expression de l'ARNm de SHANK3 entre les neurones ASD et CTRL

La recherche de phénotypes s'est ensuite étendue aux niveaux de protéines SHANK3, au nombre de synapses et à l'activité neuronale glutamatergique. Une diminution de ces trois critères avait déjà été observée dans les neurones déficients du gène SHANK3, que ce soit à partir de modèles murins ou des modèles cellulaires dérivés d'iPSC (Partie Modèles pour l'étude des formes d'autisme liées à SHANK3). Cette recherche de phénotypes synaptiques n'a malheureusement pas pu aboutir, à cause de problèmes techniques d'hétérogénéité entre les lignées. En effet, j'ai pu observer des différences de comportement des lignées en culture, en termes de prolifération, de cinétique de différenciation et de maturation, provoquant des hétérogénéités au sein des deux groupes (ASD et CTRL) et masquant les différences phénotypiques existantes. De plus, le protocole développé pour la quantification de synapses par HCS est certes adéquat pour les expériences menées sur une lignée cellulaire donnée, en condition traitée vs non traitée, mais manque de précision et de sensibilité pour la mise en évidence de phénotypes fins comme des diminutions de densités postsynaptiques. Grâce aux expériences de flux calciques, un défaut d'activité neuronale glutamatergique a tout de même pu être décelé entre les neurones ASD et CTRL (Darville et al. submitted).

❖ Phénotypes morphologiques

La recherche de phénotypes morphologiques a également été investiguée. A l'aide de l'imager à haut débit Array Scan (Thermoscientifics) et de sa bioapplication « Neuronal profiling », la longueur neuritique totale et le nombre de branchement ont été quantifiés (Figure 40). Le marquage des corps cellulaires et des neurites avec respectivement un anti-HUC/D et un anti-Tuj-1 ont permis de tracer les neurites partant de chaque corps cellulaire, et de normaliser les valeurs en les rapportant au nombre de neurones présents dans la culture. Ces expériences d'arborisation ont été menées sur des cultures de neurones en cours de différenciation au temps J11 et ont permis de montrer une augmentation de la longueur neuritique totale ainsi que du nombre de branchement dans les lignées neuronales ASD par rapport aux contrôles. Ces défauts morphologiques ont été corrigés avec un traitement au VPA ou au lithium (Figure 40).

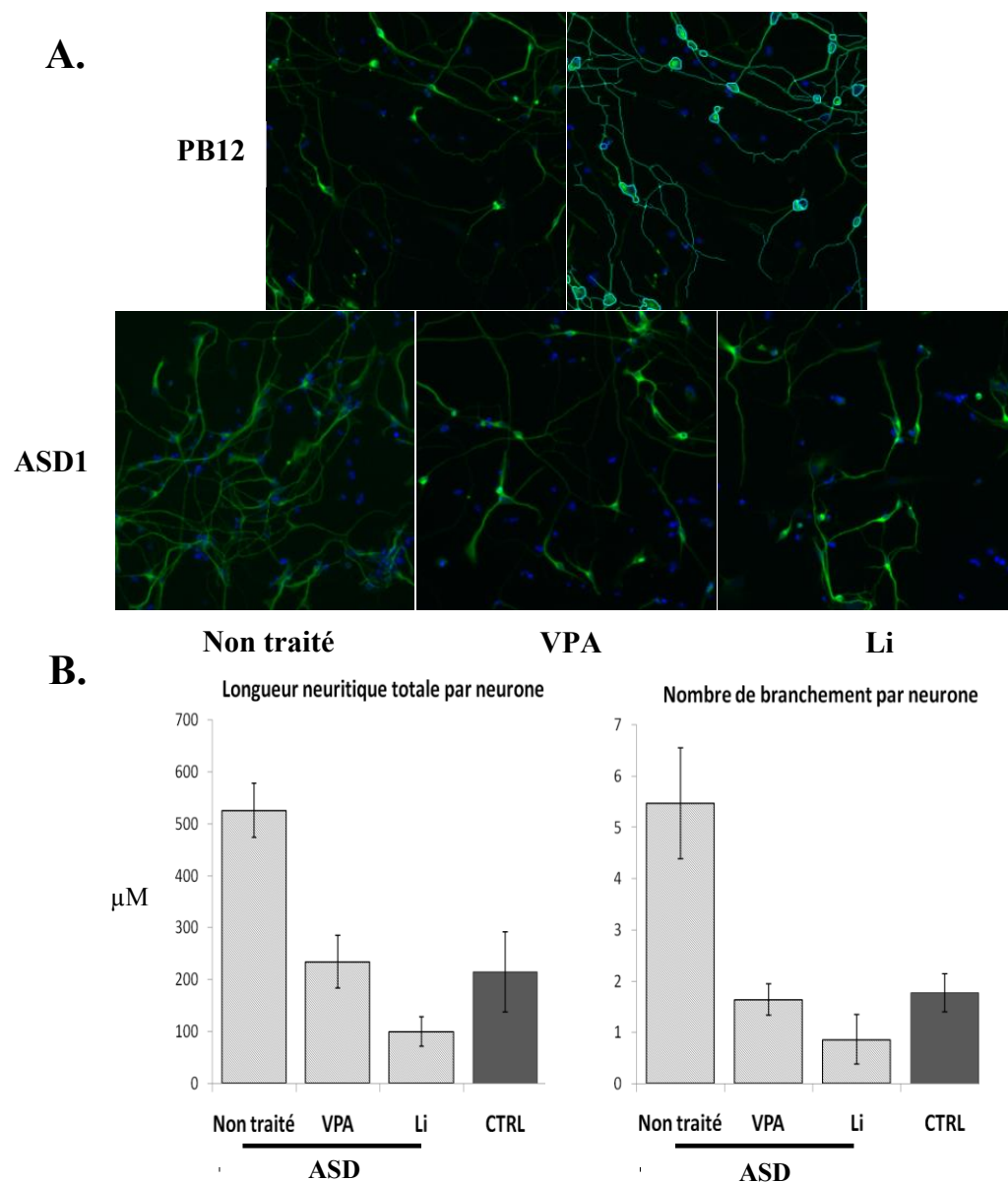


Figure 40 : Différences d'arborisation entre les lignées ASD et CTRL et effet des composés VPA et lithium sur celles-ci. A. Exemple de photos au 10X d'une lignée contrôle (PB12) et de son « masque », et d'une lignée ASD (ASD1) avec ou sans traitement. B. Quantification de la longueur neuritique totale et du nombre de branchement des lignées ASD ± traitées et des lignées CTRL.

Discussion

I. Les cellules souches pluripotentes comme modèle cellulaire

1. Criblage moléculaire thérapeutique

Cette étude a permis de confirmer que les cellules souches pluripotentes étaient un bon modèle cellulaire pour la recherche de nouveaux médicaments par criblage moléculaire. En effet, celles-ci nous ont offert l'opportunité de travailler sur un modèle pertinent (humain et non modifié génétiquement), augmentant les chances d'identifier des composés thérapeutiquement actifs. De plus, les mêmes cellules ont pu être utilisées pour le criblage et les tests secondaires de validation, réduisant le nombre de faux positifs issus du HTS.

Jusqu'à maintenant, les études sur l'autisme à partir d'hPSC s'étaient limitées à la démonstration de l'effet de drogues initialement identifiées dans d'autres modèles (Bozdagi et al., 2013 ; Shcheglovitov et al., 2013) ou à la validation de composés dont le mécanisme d'action était prédictible (Nageshappa et al., 2015). Ce travail basé sur le criblage de composés candidats sans à priori montre que l'on peut utiliser des neurones humains dérivés d'hPSC, pour découvrir de nouvelles approches thérapeutiques pertinentes pour des pathologies complexes telles que les TSA.

La force de ce criblage réside dans son approche spécifique. En effet, nous nous sommes intéressés directement à la cause de la maladie, à savoir la déficience du gène *SHANK3*, et nous avons cherché à apporter une amélioration à ce niveau. Cette approche de correction des phénotypes autistiques par la restauration d'un dosage normal de *SHANK3* avait d'ailleurs déjà été validée dans un modèle neuronal dérivé d'iPSC pour le PMS (Shcheglovitov et al., 2013). Le test HTS choisi est basé sur de la RTqPCR dans le but de révéler des régulateurs de l'expression du gène *SHANK3*, plutôt que des facteurs agissant sur les phénotypes neuronaux non spécifiques associés (comme le nombre de synapses ou la neurotransmission glutamatergique). Ainsi, contrairement à l'approche menée par Shcheglovitov avec l'IGF-1 dont la stratégie ne passe pas du tout par *SHANK-3*, mais plutôt par une correction des conséquences phénotypiques par compensation moléculaire (Shcheglovitov et al., 2013), on s'attend à ce que les composés issus de ce criblage soient plus efficaces pour le traitement de cette forme d'autisme et entraînent moins d'effets secondaires. De plus, l'implication d'un dosage anormal de nombreux gènes, dans les TSA, suggère que cette approche de découverte de médicaments ciblant la régulation de gènes impliqués dans l'autisme est pertinente et devrait être plus largement appliquée (Toro et al., 2010).

Bien que les composés identifiés soient spécifiques de *SHANK-3*, on pourrait quand même espérer qu'ils puissent avoir un effet bénéfique (par des phénomènes compensatoires cette fois) pour d'autres formes d'autisme ayant des phénotypes moléculaires synaptiques similaires, comme par exemple les formes déficientes en *SHANK1* (Hung et al., 2008), *SHANK2* (Won et al., 2012) ou le syndrome de Rett (Marchetto et al., 2010). D'ailleurs le composé pharmacologique IGF-1 a déjà montré des effets bénéfiques à la fois pour le PMS et le syndrome de Rett (Marchetto et al., 2010 ; Shcheglovitov et al., 2013). On pourrait imaginer par exemple que l'augmentation de

SHANK3, par son rôle clé de protéine d'échafaudage au sein de la synapse, puisse agir sur la stabilité de ses partenaires également impliqués dans l'autisme. En tout cas, au vu du rôle de cette protéine dans les processus de recrutement des récepteurs glutamatergiques (Roussignol et al., 2005), et de modulation de la plasticité synaptique et de la neurogénèse (Grabrucker et al., 2011a), il est raisonnable de penser que les régulateurs de l'expression de *SHANK3* pourraient être des bons candidats pour le traitement des formes de TSA associées à une déficience de neurotransmission glutamatergique.

Dans cette étude, on peut noter que l'approche d'un criblage ciblé (avec le choix de drogues agissant sur le système nerveux central et des molécules chimiques avec un mécanisme d'action connu) a été efficace et pertinente. En effet, un faible nombre de composés a été testé et de nombreux hits positifs ont été trouvés, engendrant un très bon taux de découverte de hits (14 %). Cette approche réduisant les coûts et le temps de recherche devrait être privilégiée, au moins comme preuve de concept de validité du test de ciblage, avant de lancer de grandes campagnes.

Le plus grand désavantage de la méthode de criblage, utilisée ici, réside dans son coût qui est encore bien trop important, et ce malgré les modifications de protocole que j'ai pu apporter (diminution par 2 de la quantité de réactifs pour la RT-qPCR). En effet, le coût d'un puits est estimé à environ 3 euros, alors qu'il devrait être d'un euro maximum pour répondre aux besoins de campagnes de criblage plus importantes (Malo et al., 2006). Par manque de temps, les optimisations n'ont pu être menées jusqu'au bout, mais il serait néanmoins possible de réduire encore les coûts. Par exemple, la diminution de moitié de la quantité de réactifs utilisée pour l'étape de purification/extraction semble tout à fait envisageable, puisque le protocole en l'état permet de récupérer 12µL de lysat d'ARN alors que seuls 2µL sont nécessaires pour l'analyse RT-qPCR. Ainsi, une diminution importante des coûts semble tout à fait réalisable. Dans ces conditions, le criblage pourra être considéré rentable et envisageable à plus grande échelle. Comme alternative, un criblage utilisant un gène rapporteur (luciférase par exemple) aurait pu être utilisé, et aurait permis de réduire énormément les coûts et le temps de développement du test (Charbord et al., 2013). L'utilisation de cette technique employant des cellules modifiées, couramment utilisée en HTS, aurait cependant nécessité un temps de développement non négligeable pour la création de la lignée cellulaire. De plus, elle aurait également fait perdre la pertinence physiologique, et l'usage des mêmes cellules pour les tests primaires et secondaires, qui sont deux grandes forces de notre test.

Un tout autre criblage aurait aussi pu être envisagé en substitution, visant plutôt à déterminer l'effet des composés sur l'augmentation de la protéine SHANK3, avec la technique immunocytochimique par HCS utilisée en test secondaire lors de cette thèse. Ce test de criblage, évalué à moins d'un euro/puits aurait été tout à fait envisageable, et aurait eu l'avantage d'éviter la première phase de test secondaire, visant à vérifier l'effet des composés sur la protéine (gain de temps et d'argent), mais aussi à retenir les composés qui augmentent la protéine SHANK3 par d'autres modes d'action que par la modulation de la transcription (stabilisation/dégradation de la protéine, modifications post-traductionnelles...). Ce type de criblage aurait tout de même dû

répondre à des problèmes de temps d'analyses et de gestion des images générées (environ 10 h d'analyse et 50 Gb de données par plaque) avant d'être envisagé (Brodin et al., 2015). Mon laboratoire d'accueil ayant acquis l'imager à haut contenu un an après le début de thèse, et en prenant en compte le temps de prise en main de l'appareil, ce test de criblage n'était pas envisageable avec le peu de temps imparti qu'il restait pour mettre au point la méthode de criblage pour ce travail.

2. Modélisation pathologique

La technologie iPSC offre la chance de pouvoir travailler *in vitro* sur des modèles humains pathologiques à partir de cellules somatiques de patients. Ainsi dans notre étude, elle a permis de confirmer l'effet des composés en contexte pathologique, sur des fonds génétiques différents, et de valider notre stratégie thérapeutique. Cette méthode de validation des composés est très intéressante car elle peut mettre en évidence certaines inefficacités de traitements voire certains dangers, et mieux contrôler l'enrôlement des patients pour les essais cliniques qui suivent. En effet, on peut imaginer que certaines mutations sur le gène *SHANK3* soient délétères en induisant la production de protéines ayant des effets physiologiques négatifs. Une mutation induisant la perte du domaine HOMER a déjà été rapportée pour aggraver les symptômes, en diminuant l'expression de la copie du gène *SHANK3* sauvage (Bangash et al., 2011). Le traitement augmentant la transcription des deux allèles, de façon non préférentielle, entrainerait alors la production de la protéine normale et mutante, annulant les effets bénéfiques du traitement.

Il serait également possible de tirer avantage de la technologie iPSC pour évaluer l'effet de facteurs environnementaux sur une ou des mutation(s) donnée(s). Ainsi, ces études combinatoires de gènes de vulnérabilité avec des facteurs environnementaux offrirait l'opportunité de mieux comprendre des maladies multifactorielles telles que l'autisme. Par exemple, il serait envisageable d'établir des liens de causalités entre des modifications épigénétiques (comme des changements de profils de méthylation avec l'utilisation d'agents méthylants) et la modification d'expression de gènes de susceptibilité impliqués dans l'autisme (tels que *SHANK3*, Zhu et al., 2014). De plus, il serait enfin possible d'étudier les cas d'autisme dus à plusieurs mutations à faible impact qui, en se cumulant, aboutissent à un phénotype autistique (Bourgeron, 2015).

L'autre aspect de la modélisation repose bien-sûr sur la recherche de défauts moléculaires ou cellulaires pour mieux comprendre la pathologie et tester l'efficacité de traitements sur la correction des phénotypes pathologiques visibles. De nombreux modèles d'iPSC pour modéliser différentes formes syndromiques et non syndromiques d'autisme ont déjà été développés à ce jour (Partie Modélisation pathologique de l'autisme). Des phénotypes pertinents ont pu être répliqués *in vitro*, par exemple pour le syndrome de X-Fragile (Doers et al., 2014 ; Liu et al., 2012), le syndrome de Rett (Marchetto et al., 2010), ou le syndrome de Phelan-McDermid (Shecheglovitov et al., 2013). Ces études ont également démontré que des composés thérapeutiques pouvaient corriger les phénotypes neuronaux associés à la maladie. Le travail engagé dans cette thèse a fourni des résultats mitigés quant à cet aspect et a montré quelques

limitations des iPSC. Un phénotype cellulaire morphologique a quand même pu être identifié, au niveau de l'arborisation des neurones. En effet, une augmentation de la longueur neuritique et du nombre de branchements a été observé dans les neurones dérivés d'iPSC de patients autistes par rapport aux neurones contrôles. De plus, un défaut fonctionnel de l'activité synaptique glutamatergique a également été identifié, par l'observation d'une diminution de la fréquence des oscillations calciques synchronisées spontanées dans les neurones dérivés d'iPSC de patients autistes par rapport aux neurones contrôles. Ces observations confirment de précédents résultats obtenus chez les souris SHANK3 (Peça et al., 2011 ; Yang et al., 2012) et le modèle iPSC pour le PMS (Shcheglovitov et al., 2013). L'observation de ces phénotypes connus a permis de valider la pertinence de notre modèle cellulaire iPSC pour les formes d'autisme dues à *SHANK3* ; et nous a ainsi permis de confirmer l'effet thérapeutique de nos composés sur celles-ci. En effet, un traitement au lithium ou au VPA a permis de corriger au moins partiellement les défauts phénotypiques observés, validant notre hypothèse de travail. De la même façon que pour les modèles animaux, la reproductibilité des phénotypes existants est l'étape préliminaire pour évaluer la validité étiologique, la fiabilité et la sensibilité de son modèle d'étude. La découverte de nouveaux phénotypes pour la compréhension physiopathologique peut avoir lieu seulement après cette étape de validation. Sans cela, il est impossible de savoir si ce sont de réels phénotypes ou des artefacts d'expériences.

C'est en essayant de valider d'autres phénotypes, comme la diminution du nombre de synapses que nous avons dû faire face à quelques problèmes. En effet, aucune différence significative n'a été mise en évidence et une grande hétérogénéité a été observée entre les lignées des différents groupes (SHANK3 et contrôles). L'échec de l'étude de phénotypes peut s'expliquer par deux hypothèses : une limite technique par un problème de sensibilité des expériences utilisées ou une limite du modèle cellulaire en lui-même.

Concernant l'hypothèse de la limitation technique, nous avons utilisé des techniques HCS déjà développées pour la validation des composés, dans une optique de gain de temps et d'argent. L'utilisation de tests HCS n'était probablement pas la meilleure technique pour déterminer un phénotype, ayant la particularité d'être simples et rapides, mais peut-être pas suffisamment précis pour des recherches fines telles que celles-ci. Il est d'ailleurs plutôt d'usage d'utiliser des technologies précises pour trouver des phénotypes pointus, et ensuite de les adapter au HCS ou HTS dans un deuxième temps pour évaluer l'effet de multiples drogues sur la correction du phénotype observé. Ainsi l'utilisation de l'imagerie à haute résolution (Chabrol et al., 2015 ; Fua and Knott, 2015) ou de techniques électrophysiologiques (comme employées dans Shcheglovitov et al., 2013) aurait probablement été plus adaptée.

Concernant l'hypothèse de la limite du modèle en lui-même, depuis les premières études menées sur les iPSC, de nombreuses limitations ont été rapportées. L'hétérogénéité entre les lignées est le problème majoritairement observé, et celle-ci peut très bien masquer les phénotypes, en influant notamment sur le rapport signal/bruit des expériences. L'hétérogénéité peut venir des lignées en elles-mêmes (variabilités inter-individuelles), mais aussi des méthodes de culture qui peut résulter en l'apparition de différences entre les clones iPSC (et les lignées neuronales qui en dérivent) générés à partir d'un seul patient (variabilités intra-individuelles) (Lister et al., 2011 ; Pick et al., 2009). La maîtrise des protocoles de culture et un bon choix des lignées saines et malades sont

donc deux aspects indispensables, pour répondre avec précision à la variabilité inhérente intra-patiente et inter-patiente.

La variabilité entre les lignées iPSC et la robustesse du système de reprogrammation est un premier point limitant qui nécessite d'être mieux contrôlé. Bien que les iPSC soient théoriquement dans un état complètement indifférencié, il est connu que les clones iPSC diffèrent dans leur potentiel de différenciation, et que certains clones se différencient mieux que d'autres en un type cellulaire donné (Kim et al., 2010 ; Polo et al., 2010). De plus, la différenciation neuronale à partir de clones iPSC, en plus d'être très variable et imprédictible, est moins efficace que celle issue de lignées d'ESC, reflétant des potentiels développementaux différents entre ces deux types cellulaires (Hu et al., 2010). Bien que la cause d'une telle variabilité intrinsèque pour les iPSC ne soit pas totalement connue, des efforts peuvent être faits pour minimiser les sources de variabilité identifiées, telles que les variations génomiques et épigénétiques (Chin et al., 2009 ; Gore et al., 2011 ; Hussein et al., 2011 ; Urbach et al., 2010) (Partie Introduction-II-c). Cette variabilité pourrait ainsi être combattue par une meilleure prise en main des protocoles de reprogrammation et par la caractérisation complète et la confirmation de l'état pluripotent des iPSC utilisées dans les études, permettant ainsi d'exclure les cellules partiellement reprogrammées. Pour ma thèse, nous avons utilisé un virus non intégratif et les variations génomiques ont bien été examinées par des contrôles qualités de type recherche de SNP et de tétraploïdie, invalidant ainsi l'hypothèse de la variabilité génomique. La variabilité peut résider dans l'efficacité de la reprogrammation, notamment par le nombre de virus ayant infecté les fibroblastes, qui peut être différent d'une lignée à l'autre, et même d'un clone iPSC à l'autre, et qui peut expliquer les différences de potentiel de différenciation. A l'heure actuelle, cette variabilité d'efficacité de reprogrammation n'est pas contrôlable. Néanmoins, la reprogrammation de toutes les lignées de fibroblastes en même temps pourrait permettre de standardiser la méthode (utilisation des mêmes réactifs, du même manipulateur, etc.) et limiterait probablement ces biais. C'est une chose qui n'a pas été faite ici, notamment parce que les biopsies des patients ont été faites à des temps différents (un an d'écart entre les biopsies de l'ASD1 et de l'ASD3). L'autre aspect qui aurait pu être amélioré, dans ce travail, est la caractérisation du profil épigénétique et transcriptionnel de chaque clone iPSC, issus de chaque individu inclus dans l'étude, pour sélectionner des lignées ayant des profils optimaux et similaires. Une étude a d'ailleurs mis en évidence des méthodes génomiques informatives et pratiques, appelées "scorecards", pour évaluer à haut débit la qualité des lignées iPSC et leur potentiel de différenciation vers un lignage particulier (Bock et al., 2011). Cette caractérisation aurait demandé en revanche un investissement assez important en matière de temps et d'argent.

L'autre problème est la variabilité observée entre différentes lignées de neurones différenciées à partir d'un même clone d'iPSC, probablement due à l'hétérogénéité cellulaire dans les cultures neuronales. Dans une certaine mesure, cette variabilité est inévitable, même si elle est actuellement exacerbée par l'hétérogénéité des sous-types cellulaires dans les populations de neurones dérivées d'iPSC. En effet à l'heure actuelle, il n'existe pas de protocole de différenciation neuronale qui soit efficace à 100 % et donc aucun ne mène à une culture pure d'un sous type spécifique neuronal. D'un point de vue expérimental, ceci s'explique par l'absence de

connaissance de marqueurs de surface cellulaires spécifiques de sous-types neuronaux, pouvant être utilisés pour purifier la culture, à la différence du système hématopoïétique par exemple. Bien que notre protocole permette d'avoir une culture relativement bien enrichie en population cellulaire d'intérêt (70 %), ce pourcentage n'est peut-être pas suffisant pour des recherches pointues de phénotypes. Dans ce cas un travail d'optimisation du protocole devra encore avoir lieu. A noter que la pureté peut avoir aussi des conséquences négatives et entraîner un biais physiologique, en empêchant par exemple d'obtenir des neurones fonctionnels si aucune cellule gliale n'est présente dans la culture. Si l'optimisation des protocoles ne permet pas d'atteindre une pureté de 100 %, ces méthodes de différenciation devront en tout cas être mieux appréhendées en termes de reproductibilité de différenciation et de prolifération des cellules présentes dans la culture.

Pour produire des données significatives, chaque expérience devrait idéalement comparer plusieurs différenciations neuronales provenant de plusieurs lignées d'iPSC issues de plusieurs patients. En raison de contraintes de coût et de temps, ces expériences ne peuvent pas encore être réalisées. Par conséquent, les études réalisées à ce jour, portant sur des modèles cellulaires d'iPSC, doivent être utilisées avec parcimonie et comme preuve de concept jusqu'à ce que des méthodes pour comparer des neurones dérivés de centaines ou de milliers de patients et contrôles soient développées.

Le fond génétique des individus doit également être pris en compte. En effet, une variabilité génétique existe entre les patients et reflète l'hétérogénéité des résultats cliniques des individus atteints d'autisme ou de SCZ. Par conséquent, étant donné la petite taille de l'échantillon utilisé lors de ces études (en général 1 à 4 patients), les préoccupations majeures sont de savoir si les individus de l'échantillon partagent des phénotypes communs et si les résultats issus de l'étude sont représentatifs de la majorité des patients. A l'heure actuelle, pour répondre à cette problématique, la majorité des recrutements sont réalisés avec des patients présentant des caractéristiques cliniques et/ou génétiques bien définies. De plus, le problème de la variabilité du fond génétique se pose également pour les personnes saines, d'où la nécessité de contrôles appropriés. Actuellement, les modèles les plus reportés pour la modélisation de l'autisme utilisent des individus non affectés ou des membres de la famille en tant que contrôles. Cela peut être problématique parce que chaque individu contient des mutations uniques et les différences génétiques peuvent potentiellement affecter les phénotypes observés. L'utilisation des parents comme contrôles pourrait ainsi être une meilleure alternative pour diminuer le biais de cette hétérogénéité inter-individuelle. L'expérience contrôle idéale serait entre 2 lignées contenant exactement le même génome, avec comme seule différence la mutation en question. L'utilisation de la technologie d'édition de gènes avec des nucléases ciblées telle que la méthode TALEN ou plus récemment CRISPR/Cas9 pourrait répondre à cette problématique (Jinek et al., 2012 ; Miller et al., 2011). En effet, il est désormais possible de générer des lignées iPSC isogéniques, ne différant que par la mutation responsable, en corrigeant des mutations potentiellement pathogènes dans les iPSC de personnes touchées par la maladie, ou à l'inverse, en concevant des mutations dans des iPSC de personnes saines (Smith et al., 2015 ; Ding et al., 2013). Pour la thèse, l'utilisation de la technologie CRISPR pour créer le contrôle associé de chaque clone ASD aurait

été la meilleure solution, permettant de nous affranchir de la variabilité inter-individuelle et de n'étudier que l'impact du gène *SHANK3* sur les défauts phénotypiques. Elle aurait demandé en revanche énormément de temps de développement.

Jusqu'à maintenant, des expériences contrôles, certes moins élégantes que l'édition de gènes mais plus rapides et faciles à mettre en place, étaient largement utilisées. Elles consistent à utiliser la technologie ARN interférence (SiRNA, ShRNA) pour mimer l'effet de mutations dans des lignées saines, ou à l'inverse à surexprimer l'ADNc d'intérêt dans des lignées malades pour corriger celles-ci, afin d'évaluer le rôle d'un gène spécifique et de valider les phénotypes associés. Cette approche a été utilisée dans le cadre de ma thèse en utilisant des ShRNA dirigés contre *SHANK3* et a permis de valider les phénotypes morphologiques observés.

II. Les composés issus du criblage

Parmi les 15 composés découverts lors du HTS primaire, il est à noter que la trichostatine A (inhibiteur d'HDAC) était déjà connu dans la littérature pour augmenter l'expression de l'ARNm de *SHANK3* (Maunakea et al., 2010), validant la méthode de criblage employée. Les tests secondaires, réalisés dans cette thèse, ont mis en évidence l'effet thérapeutique potentiel des deux composés, le lithium et le VPA, pour le traitement des formes d'autisme impliquant des mutations sur le gène *SHANK3*. La pertinence de ces deux composés pour le traitement de ce trouble seront développés l'un après l'autre.

1. Le lithium comme potentiel traitement

Le lithium est un agent stabilisateur de l'humeur avec une longue histoire dans la psychiatrie, puisqu'il a commencé à être prescrit en 1949 pour le traitement des troubles bipolaires. Il est principalement utilisé chez les adultes souffrant d'épisodes maniaques, pour le traitement aigu et à long terme des TBP et de la dépression résistante (Cipriani et al., 2013). Le mécanisme d'action du lithium reste encore relativement peu connu, mais différentes cibles moléculaires ont déjà été identifiées, comme l'inhibition de l'inositol monophosphatase, de GSK-3 (un régulateur négatif des voies Wnt et de l'insuline) ou encore de Cdk5 (Jordà et al., 2005 ; Salinas and Hall, 1999). Le lithium est connu pour ses nombreux effets neuroprotecteurs et neuromodulateurs. En effet, il protégerait les neurones d'une variété de stimuli pro-apoptotiques, présents en conditions pathologiques telles que dans les maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques, et modifierait la synaptogénèse et les fonctions neuronales en agissant sur le remodelage axonal, la croissance neuritique et la différenciation neuronale (Gurvich and Klein, 2002). Le lithium pourrait donc être un bon moyen thérapeutique pour les patients atteints de TSA ayant des déficits synaptiques, en corrigeant les défauts de circuits neuronaux et de fonctions. Ce travail de thèse a permis de déterminer l'effet positif du lithium sur la formation de nouvelles synapses incluant *SHANK3* et l'amélioration de la transmission synaptique glutamatergique *in vitro* en condition normale et pathologique. Mais des études biologiques et cliniques plus poussées sont nécessaires pour explorer l'hypothèse d'une amélioration du phénotype autistique avec le lithium. La plus grande faiblesse de cette étude réside dans le manque d'études *in vivo* sur modèles animaux pour

justement déterminer l'effet du lithium sur les phénotypes comportementaux autistiques. L'hypothèse d'action des composés étant l'augmentation de la transcription de l'allèle sain du gène *SHANK3*, il est impossible de tester les composés sur des souris *SHANK3* homozygotes. Le choix d'un modèle de souris hétérozygote pour *SHANK3* est donc indispensable, mais malheureusement, les phénotypes autistiques de celles-ci ne sont pas assez marqués pour pouvoir observer une amélioration de leurs comportements avec le lithium (Peça et al., 2011). Une expérience sur ces souris hétérozygotes, ou mêmes sur des souris saines, aurait néanmoins pu être menée, pour vérifier l'efficacité de l'augmentation de *SHANK3* dans un contexte *in vivo*. Cette étude est en cours de réalisation à l'institut Pasteur, par l'équipe du Professeur Thomas Bourgeron, avec qui nous avons collaboré pendant la thèse.

Malgré ce manque d'études *in vivo* sur un modèle animal, une étude récente, publiée en mai 2015, conforte l'effet thérapeutique du lithium pour les cas de TSA liés à une déficience de *SHANK3*. En effet, cette étude de cas a montré l'effet bénéfique du lithium sur la régression et la catatonie de deux patients atteints de TSA portant une mutation *de novo* sur *SHANK3* (Serret et al., 2015). Le patient 1 décrit dans ce papier correspond à l'ASD1 (ou *SHANK3*-STOP) dans ce travail. Elle a été décrite pour la première fois par Leblond et al. (Leblond et al., 2014, Tableau 2, patient AUN-003). Le choix thérapeutique s'est porté sur le lithium car la patiente présentait une forme atypique de désordres bipolaires. Les deux patients dans l'étude partageaient des diagnostics génétiques et psychiatriques similaires aussi bien qu'une évolution clinique semblable. En effet, les deux individus avaient été diagnostiqués d'un syndrome autistique dans l'enfance, avec une sévère déficience intellectuelle. Leur communication verbale était limitée à du vocabulaire simple, avec l'emploi de mots et phrases courtes, et présentait de l'écholalie et des stéréotypies de langages. Au niveau moteur, aucun retard psychomoteur n'avait été observé et les deux patients étaient très attachés à la pratique sportive. Les deux patients ont été diagnostiqués d'une mutation sur le gène *SHANK3*, induisant un codon stop prématuré dans l'exon 21. Autour de l'âge de 13 ans, ces deux patients ont présenté une régression avec des désordres comportementaux (impulsivité, agressivité, gestes imprévisibles et opposition) alternés d'apathie, après un événement stressant durant l'adolescence. Ils ont progressivement perdu leurs initiatives motrices et verbales, arrêté leurs activités favorites et présenté une régression du langage, une perte de compétences autonomes, ainsi que des troubles du sommeil (insomnie). Ils ont également tous les deux développés de la catatonie, un état psychomoteur retrouvé surtout chez les patients schizophrènes, caractérisé par un négativisme, une passivité et une raideur corporelle généralisée associée à des stéréotypies gestuelles et verbales. Différents traitements pharmacologiques (antipsychotiques, benzodiazépine, stabilisateurs d'humeur, antidépresseurs et méthylphénidates) n'avaient pas amélioré les symptômes cliniques et avaient même engendré de multiples effets secondaires. La patiente 1 avait d'ailleurs reçu du VPA comme stabilisateur de l'humeur qui n'avait pas eu d'efficacité clinique et avait induit des problèmes somatiques comme de la cytolyse. Au contraire le lithium (1500 mg / jour) a permis une réversibilité de la régression clinique et de la catatonie au cours des 3 mois qui ont suivis, et a stabilisé les symptômes comportementaux de la patiente, sans effet secondaire notable. En outre, la patiente n'a plus montré d'opposition et a de nouveau participé à différentes activités avec d'autres patients et a

recommencé les pratiques sportives. Après un an de traitement avec le lithium, la patiente a pu intégrer une unité de vie pour adultes et a récupéré un niveau de fonctionnement similaire à celui qu'elle avait avant la phase de régression. Se basant sur les similarités cliniques entre le patient 1 et 2 et l'expérience clinique du patient 1, le patient 2 a été à son tour traité avec du lithium (1000 mg/jour) à l'âge de 16 ans, en association avec de faibles doses de clonazepam pendant les 4 premiers mois (0,2 mg/jour). De la même façon, le patient 2 a vu ses symptômes comportementaux se stabiliser et ses capacités verbales et motrices s'améliorer. Le patient a pu retrouver un sommeil normal et récupérer ses capacités de participation et d'autonomie.

Cette étude de cas, bien que présentant des limites (seuls deux cas traités, depuis seulement un ou deux ans), est une preuve de principe que l'effet bénéfique du lithium observé *in vitro* sur les neurones de patients autistes liés à *SHANK3* est également observé sur leurs symptômes catatoniques et sociaux. Cela ouvre un grand espoir quant à l'utilisation du lithium pour le traitement des personnes atteintes d'autisme portant des mutations sur *SHANK3* ainsi que celles atteintes du PMS. De plus, elle montre un effet positif du lithium, même lorsque le traitement démarre à des âges avancés (19 ans). L'effet bénéfique du lithium devra être néanmoins étudié sur un plus grand nombre de patients atteints. Une demande de projet hospitalier de recherche clinique pour démarrer un essai clinique vient d'ailleurs d'être lancé, afin d'évaluer l'effet du lithium chez d'autres patients atteints de TSA portant une mutation sur *SHANK3*. Il est à noter tout de même que cet article démontre l'effet bénéfique du lithium pour contrecarrer la régression observée chez ces patients mais n'analyse pas les symptômes propres de l'autisme.

Néanmoins, dans le cadre de notre partenariat avec le Pr Richard Delorme, une évaluation concernant les traits autistiques a été effectuée. Ceci a permis de déterminer que le lithium, en plus de contrecarrer la régression, montrait des effets positifs sur les symptômes autistiques de la patiente décrite dans l'étude de cas menée par Serrat et al. (*SHANK3-STOP*, Figure 41). En effet, un traitement de la patiente au lithium a permis de développer ses compétences sociales (tests SRS et ADOS) et d'améliorer ses performances cognitives (test RPM). En revanche, une dégradation dans son habilité à contrôler son impulsivité, associée à des problèmes d'attention ont été rapportés (test ADHD-RS). L'apparition de ces nouveaux symptômes pourrait provenir de l'administration chez la patiente de doses trop élevées de lithium. En effet, une dose thérapeutique trop élevée pourrait induire une expression trop importante de protéine *SHANK3*. Or, il a été rapporté qu'un excès de protéine *SHANK3* peut être tout aussi délétère qu'une haploinsuffisance, et causer chez l'Homme des troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (Partie : Les cas de duplication de *SHANK* ; Durand et al., 2007 ; Failla et al., 2007 ; Moessner et al., 2007). Si cette hypothèse est correcte, un réajustement des doses de lithium pourrait éliminer ces nouveaux symptômes.

Pour conclure, malgré ces résultats très encourageants, l'effet positif du lithium sur les symptômes autistiques n'a été étudié que sur une patiente. Des tests supplémentaires, sur d'autres patients, sont indispensables pour conclure d'un réel effet du lithium sur les comportements autistiques.

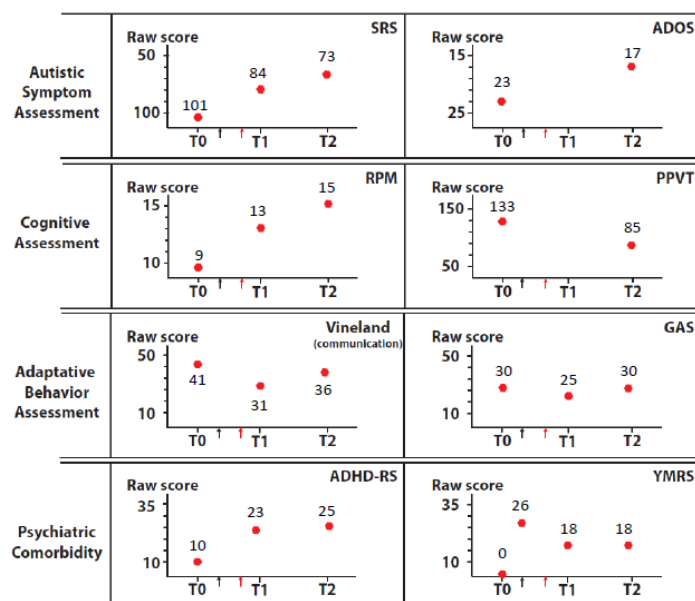


Figure 41 : Evaluation clinique de la patiente AUN-003 (SHANK3 STOP ou ASD1) avant et après un traitement au lithium. Figure S3 Darville et al. submitted.

Une question se pose quant à la spécificité du lithium par rapport à SHANK3. Nous n'avons pas pu déterminer dans notre étude si l'effet bénéfique observé du lithium passait uniquement par l'augmentation de SHANK3 ou par d'autres mécanismes associés. L'expérience faite sur des neurones exprimant des ShRNA dirigés contre SHANK3 ont certes montré que SHANK3 était nécessaire pour observer un effet bénéfique du lithium, mais n'exclue pas que l'effet de ce composé passe par un autre mécanisme d'action. L'expérience de qPCR array montre d'ailleurs que le lithium régule d'autres gènes synaptiques importants pour la plasticité et la neurotransmission GABAergique et glutamatergique, qui peuvent tout à fait participer à l'effet bénéfique de ce composé thérapeutique. Il est tout de même important de garder à l'esprit que la perturbation d'une cible moléculaire unique est peu probable pour expliquer tous les effets de chaque médicament, et que d'ailleurs la modulation d'une cible unique ne serait certainement pas efficace pour le traitement d'une maladie complexe telle que l'autisme. La spécificité de ce composé n'est donc pas un problème tant que son effet sur ses différentes cibles provoque un effet synergique avec peu d'effets secondaires associés. Le fait que le lithium ne soit pas spécifique de SHANK3 offre également la possibilité que celui-ci puisse avoir un effet positif sur d'autres cas d'autisme.

Jusqu'à maintenant le lithium a été très peu étudié pour le traitement des TSA, mais quelques études ont prouvé son efficacité. En 1987, le lithium a été testé sur 4 enfants atteints de TSA. Kerbeshian et al. ont décrit une réponse positive du lithium sur deux enfants de 4 ans atteints d'autisme, avec une sévère hyperactivité, des symptômes cycliques (de type excès de rire, irritabilité et vertiges) ainsi que des symptômes de type TBP (Kerbeshian et al., 1987). La même année, dans une étude séparée, deux autres patients atteints de TSA, de 7 et 20 ans, ont également montré une réponse positive au lithium. Ces patients avaient développé des symptômes de type excès de joie, vertiges, agitation, réduction du besoin de sommeil, ainsi que des comportements d'automutilation et d'agressivité envers les autres. Chez l'enfant de 7 ans, le traitement au lithium

(1,0 mEq / L) avait été couplé à 200 mg par jour de thioridazine, alors que chez le jeune adulte, le traitement au lithium (1,0- 1,2 mEq / L) s'ajoutait à son traitement actuel au chlorpromazine (800 mg par jour) (Steingard and Biederman, 1987). En 1972, Campbell et al. ont réalisé une étude contrôlée avec un traitement au lithium et au chlorpromazine chez 10 enfants de 3 à 6 ans, ayant hyperactivité ou psychose, dont 1 enfant était atteint de TSA. Le traitement au lithium (450-900 mg / jour) avait permis une amélioration des symptômes autistiques de l'enfant atteint de TSA et aucun effet indésirable n'y avait été associé (Campbell et al., 1972). Plus récemment, l'effet du lithium a été évalué sur 30 enfants et adolescents atteints de TSA avec des problèmes d'humeur. 43 % des patients ayant reçu le lithium ont vu leurs impressions cliniques globales s'améliorer, avec pour 71 % d'entre eux, un effet positif sur au moins deux symptômes de désordres de l'humeur (Siegel et al., 2014). Cette étude supporte le fait que le lithium pourrait être une option de traitement utile pour les enfants atteints de TSA avec des symptômes de désordres de l'humeur. Il est quand même à noter que des effets secondaires ont été reportés (vomissements, tremblements, fatigue, irritabilité) et ont concerné presque la moitié des patients (47 %). Une attention particulière est donc requise et des études contrôlées, à plus large échelle, devront être réalisées pour évaluer le réel bénéfice du lithium sur les symptômes autistiques.

Une seule étude préclinique a rapporté des effets prometteurs du lithium sur les comportements autistiques à proprement dit. Elle concerne un modèle de rat qui développe des symptômes autistiques incluant des déficits sociaux, des comportements répétitifs (excès de toilette) ainsi que de l'anxiété et de la dépression, lorsqu'on les soumet à la naissance à 1 h d'isolement par jour (pendant 9 jours). Au niveau moléculaire, ce modèle de TSA présente une altération de la neurogénèse de l'hippocampe adulte et une réduction de la balance E/I due à une augmentation des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés dans les neurones pyramidaux hippocampaux. L'administration chronique de lithium, chez ces rats nouveau-nés, est capable d'empêcher le développement des comportements autistiques, et de restaurer à des niveaux physiologiques la neurogénèse et la transmission inhibitrice (Wu et al., 2014). Cette étude a l'avantage de montrer, pour la première fois, l'effet du lithium sur les principaux symptômes autistiques (déficits sociaux et comportements inadaptés). En revanche la limite principale de cette étude réside dans le fait que le traitement soit commencé dès les premiers jours de vie du modèle animal avant même qu'il ne développe des symptômes autistiques, ne fournissant pas d'indication sur la possible réversibilité des comportements autistiques avec un traitement au lithium.

On peut noter également que le lithium a aussi montré une certaine efficacité dans le traitement du syndrome X fragile, que ce soit chez les souris FXS (Liu et al., 2011) ou chez l'Homme dans une étude clinique pilote. Cette étude, portant sur 15 sujets atteints du FXS âgés de 6 à 23 ans, a montré qu'un traitement au lithium (0,8–1.2 mequiv/L) avait des effets positifs sur leurs compétences comportementales et d'adaptation, après seulement 2 mois de traitement. En effet, des améliorations significatives ont été observées au niveau de leur hyperactivité et agressivité ainsi qu'au niveau de leurs comportements inadaptés (refus de travail, excès de colères et d'émotivité, anxiété) et de leurs stéréotypies. Une amélioration cognitive a également pu être observée. Cette étude supporte ainsi la possibilité que le lithium pourrait être un traitement prometteur pour les patients (enfants et jeunes adultes) atteints de FXS, sans effet secondaire important (à l'exception de polyurie et polydipsie) (Berry-Kravis et al., 2008).

En conclusion, toutes ces études vont dans le même sens que notre travail pour dire que le lithium pourrait être un nouveau traitement potentiel pour l'autisme. Des études cliniques contrôlées sont maintenant nécessaires pour apporter la preuve d'un réel effet positif du lithium sur les symptômes associés ainsi que sur les symptômes autistiques à proprement dit.

2. Le VPA comme potentiel traitement

Le VPA est largement utilisé comme anticonvulsivant et est aussi efficace comme stabilisateur de l'humeur pour le traitement des TBP. Le mécanisme d'action est là encore largement inconnu, bien que des cibles aient déjà été identifiées. Le VPA affecte le neurotransmetteur GABA, notamment en inhibant la GABA transaminase, et peut augmenter l'expression d'un grand nombre de gènes en inhibant les HDAC1-7. En effet, son rôle d'inhibiteur d'HDAC lui permet de lever la répression de la transcription de nombreux gènes (2 % des gènes totaux), dont beaucoup d'entre eux sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation (Van Lint et al., 1996). Ainsi, le VPA touche de nombreuses voies de signalisation, exprimées de manière ubiquitaire, dont des voies communes au lithium (comme GSK-3 ou Cdk5) (Gurvich and Klein, 2002 ; Takahashi et al., 2014), et possède aussi des rôles de neuroprotection et de neuromodulation en augmentant notamment la croissance neuritique (Yuan et al., 2001). Nos résultats issus des expériences de qPCR array ont confirmé l'effet peu spécifique du VPA, à cause de son rôle inhibiteur d'HDAC, ce qui n'en fait probablement pas un candidat de choix pour le traitement des TSA. De plus, le VPA, contrairement au lithium, a également montré un effet positif sur le comportement maniaque d'un modèle de souris surexprimant SHANK3 (Han et al., 2013). Ainsi, il semblerait que le VPA, en ciblant un plus grand nombre de protéines synaptiques et neuronales, dont le système GABAergique, pourrait corriger les comportements maniaques malgré son effet sur l'expression de SHANK3.

Un lien est connu entre l'exposition de VPA *in utero* et l'augmentation du risque de développement de l'autisme, que ce soit chez les rongeurs ou chez l'Homme. En effet, chez l'Homme, une corrélation a été observée entre l'exposition prénatale de VPA pendant la grossesse et l'augmentation de l'incidence des TSA chez la descendance (Bromley et al., 2008). Des études sur animaux ont pu confirmer ce lien, en observant que l'exposition de VPA chez les rates et souris gestantes conduisait à des comportements autistiques chez la progéniture (déficits de communication et de comportements sociaux et développement de comportements répétitifs) (Roullet et al., 2013 ; Schneider and Przewlocki, 2005). Basé sur ce travail, l'exposition de VPA chez les souris et rates gestantes a même été proposée comme source de modèle animal pour étudier l'autisme. Un tel composé pour le traitement de l'autisme serait probablement mal reçu.

En tout cas, malgré leurs spécificités contestables, le lithium et le VPA ont montré un effet certain sur la régulation positive de l'expression de l'ARNm et de la protéine SHANK3 dans ce travail de thèse. L'activité inhibitrice du VPA sur les HDAC étant déjà connue pour réguler SHANK3, il n'est pas étonnant que le VPA ait ce même effet. Un seul article vient contester ce point. Cette étude avait pour but d'examiner l'effet *in vivo* de l'administration chronique de doses thérapeutiques de lithium et de VPA sur l'expression des gènes *HOMER1*, *SHANK* et *IP3R*, dans

le cerveau de rat. Par analyse autoradiographique, De Bartolomeis et al. avaient montré que l'expression de l'ARNm de SHANK était diminué par le VPA et non modulé par le lithium dans le cortex du rat (de Bartolomeis et al., 2012). La divergence de ces résultats réside peut-être dans la différence de modèle utilisé : le gène *SHANK3* étant peut être régi par des mécanismes de régulation différents chez le rat par rapport à l'Homme. Dans ce cas, cela mettrait en avant la pertinence du choix du modèle cellulaire de criblage utilisé dans cette thèse (neurones humains). L'autre divergence provient de la différence de spécificité du gène dosé : à priori dans cet article l'expression de tous les gènes *SHANK* (*SHANK1/2/3*) a été quantifiée, contrairement à ce travail de thèse où seule l'expression spécifique de *SHANK3* a été mesurée. Or des phénomènes de compensation entre *SHANK2* et *SHANK3* ont déjà été rapportés chez la souris expliquant probablement ces différences de résultats (Schmeisser et al., 2012).

III. Les différentes voies possibles de régulation de SHANK3

1. Cdk5 une possible voie de régulation de SHANK3

Le criblage mené dans cette thèse a permis de mettre en évidence une voie possible de régulation de la transcription de *SHANK3* passant par l'inhibition de Cdk5. En effet, la découverte de la roscovitine a tout d'abord fait émerger cette hypothèse, qui a été confirmée par la mise en évidence du rôle d'autres inhibiteurs de Cdk5. Une régulation de l'expression de *SHANK3* passant par Cdk5 est tout à fait envisageable de par leur localisation d'expression commune et leur rôle clé dans la synaptogénèse et la maturation synaptique. De plus, le rôle de Cdk5 dans la régulation de nombreux partenaires directs et indirects de *SHANK3* a déjà été reporté, suggérant sa fonction clé dans la régulation des protéines synaptiques.

a. Pertinence de Cdk5 pour la régulation de SHANK3

❖ Rôle neuronal de Cdk5

Cdk5 est une kinase Sérine/Thréonine neuronale, qui joue un rôle important à la fois pour les neurones en développement et pour les neurones matures (Shah and Lahiri, 2014), en phosphorylant de nombreux substrats protéiques. Contrairement aux autres membres de la famille Cdk, qui sont activés par les cyclines lors du cycle cellulaire des cellules prolifératives, Cdk5 ne participe pas à la prolifération cellulaire. Les cyclines semblent même inhiber l'activité de Cdk5, puisque le complexe Cdk5/cycline est catalytiquement inactif, et empêche la liaison de Cdk5 avec ses activateurs (Odajima et al., 2011). Cdk5 est principalement active dans les neurones post-mitotiques en raison de l'expression restreinte de ses activateurs dans le système nerveux. En effet, Cdk5 devient active lorsqu'il se lie à ses partenaires de régulation, spécifiques des neurones, p35 et p39, ou leur forme tronquée respective, p25 et p29. Le complexe Cdk5-p35/p39 contrôlerait de nombreux aspects de la migration, de la différenciation et de la fonction neuronale et posséderait des qualités neuroprotectrices (Shah and Lahiri, 2014). Une régulation fine de Cdk5 est primordiale, car elle aurait également un rôle inhibiteur sur la formation et la fonction des

synapses. De plus, le complexe Cdk5/p25 en entraînant une hyperactivation de cdk5, jouerait aussi un rôle neurotoxique, impliqué dans diverses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington...) (Patrick et al., 1999 ; Takahashi et al., 2014).

❖ Rôle de régulateur des partenaires de SHANK3

Cdk5 a déjà été reliée à la régulation de plusieurs partenaires de SHANK3, dont GKAP, PSD-95, SPAR ou les récepteurs au NMDA. En effet, dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, Roselli et al. ont montré que l'hyperactivation de Cdk5 entraînait une phosphorylation de GKAP associée à sa dégradation (Roselli et al., 2009). Cette hyperactivation et cette perte de protéines synaptiques aurait un rôle central dans le remodelage du cytosquelette synaptique d'actine, le désassemblage de la PSD et la perte de synapses dans la maladie. Dans ce contexte, on peut noter que SHANK3 est également diminué dans l'AD, lorsque Cdk5 est hyperactivée (Partie SHANK et la maladie d'Alzheimer ; Gong et al., 2009). Cette observation suggère que Cdk5 pourrait également avoir un rôle inhibiteur sur SHANK3, ce qui confirmerait notre hypothèse qu'une inhibition de Cdk5 peut augmenter SHANK3.

Cdk5 a été également impliqué dans la régulation de PSD-95, un autre partenaire direct de SHANK3 (Morabito et al., 2004). Cette étude a montré, *in vitro* et *in vivo*, que la phosphorylation du domaine N-terminal de PSD-95, par le complexe actif Cdk5/p35, était associée à la régulation négative de la multimérisation de PSD-95. Il en est de même pour la protéine SPAR, pour qui sa phosphorylation *via* Cdk5 induit aussi sa dégradation (Seeburg et al., 2008). Il ne serait donc pas étonnant que Cdk5 induise de la même façon une inhibition de SHANK3 par phosphorylation, surtout que la phosphorylation de SHANK3 par Cdk5 a déjà été observé par l'équipe de Tsai (Su, 2013).

En plus de cette inhibition directe des protéines synaptiques, Cdk5 peut également négativement réguler la fonction des récepteurs au NMDA (Chergui et al., 2004). Plus précisément, Cdk5 a été montrée pour réduire l'incorporation à la membrane de ces récepteurs et diminuer leur activité, en inhibant la phosphorylation de la sous-unité NR1.

Ainsi par ses nombreuses actions sur les partenaires synaptiques de SHANK3 ainsi que sur les récepteurs au NMDA, l'inhibition de Cdk5, en plus d'augmenter SHANK3 (si c'est le cas), pourrait augmenter la neurotransmission glutamatergique globale, et avoir un effet d'autant plus thérapeutique pour les cas d'autisme déficient en SHANK3.

b. Lien des composés issus du criblage avec l'inhibition de Cdk5

C'est la roscovitine qui a premièrement soulevé l'hypothèse d'une régulation de l'expression de SHANK3 par l'inhibition de Cdk5. En regardant d'un peu plus près, les effets d'autres composés issus du criblage pourraient également passer par l'inhibition de Cdk5.

C'est le cas par exemple du lithium qui a une activité inhibitrice sur Cdk5 avérée. En effet une étude a montré que les effets anti-apoptotiques et neuroprotecteurs du lithium passeraient par l'inhibition de l'expression de cdk5 et de son activateur p25 (Jordà et al., 2005). Ces mêmes effets protecteurs avaient été d'ailleurs observés pour les inhibiteurs de Cdk5 roscovitine et flavopiridol deux ans auparavant, supportant leur rôle commun sur Cdk5 (Jorda et al., 2003).

VPA est également connu pour inhiber l'activité de Cdk5. A travers son rôle d'inhibiteur d'HDAC, il est capable de diminuer à la fois l'expression de l'ARNm et de la protéine p35 dans les neurones de souris *in vitro* et *in vivo* (Takahashi et al., 2014).

Ainsi il est très probable que l'effet du lithium et du VPA sur l'augmentation de SHANK3 passe par leur rôle inhibiteur de Cdk5. Ce travail ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour le traitement de l'autisme, en mettant en évidence une nouvelle voie possible de régulation des protéines synaptiques. Dans cette optique, il sera en revanche nécessaire de développer des nouveaux inhibiteurs de Cdk5. En effet, les inhibiteurs de Cdk5 existants tels que la roscovitine, l'alsterpaullone et le flavopiridol, ont le gros désavantage de ne pas être spécifiques, et d'inhiber les autres Cdk (Meijer et al., 1997). Ce manque de spécificité est ici un problème, car en inhibant les autres Cdk, ces composés bloquent le cycle cellulaire, et ont des effets apoptotiques. C'est d'ailleurs probablement pour cela, que dans ce travail, le traitement à la roscovitine de neurones *in vitro*, malgré son effet positif sur la protéine SHANK3 et le nombre de synapse, ne montre pas d'amélioration de la transmission glutamatergique (données non montrées). Dans ce sens le lithium, même s'il touche d'autres cibles, est ici une meilleure option thérapeutique pour viser cdk5, car il n'affecte pas les autres Cdk et évite cette toxicité. De plus, l'effet non spécifique sur ses autres cibles a l'air d'avoir un effet combiné bénéfique certain. L'inhibition de GSK-3 dont on connaît l'effet neuroprotecteur et l'action sur les fonctions cognitives (King et al., 2014) est peut-être une autre cible par laquelle le lithium exerce son effet positif sur la formation synaptique et l'activité glutamatergique observées dans ce travail. Une étude plus approfondie des mécanismes d'action de ces composés devra être réalisée pour mettre en évidence les cibles mises en jeu, et confirmer le rôle de Cdk5.

2. 5-Lipoxygénase une possible voie de régulation de SHANK3

L'identification du BWB70C, un inhibiteur de la 5-lipoxygénase (5-LO), a également permis de mettre en évidence une autre piste de voie de régulation possible de SHANK3. Celle-ci a été confirmée avec le zileuton, un autre inhibiteur de la 5-LO qui a également le pouvoir d'augmenter la transcription de SHANK3 (données non montrées).

La 5-LO est une enzyme qui catalyse l'oxydation des acides gras et autres alcènes menant à la biosynthèse de lipides bioactifs comme les leucotriènes (Rådmark et al., 2007). Cette protéine est largement exprimée dans le cerveau, à la fois dans les neurones et les cellules gliales. Son expression et son activité est augmentée avec l'âge (Chinnici et al., 2007) et en contexte pathologique après une lésion cérébrale ischémique ou encore dans l'AD (Ikonovic et al., 2008 ; Zhou et al., 2006). De plus, l'implication de la 5-LO dans le fonctionnement du système nerveux central a été indiquée par plusieurs études chez des souris déficientes en 5-LO pour lesquelles une réduction de leur comportement anxieux (Uz et al., 2002) ou encore une amélioration des phénotypes liés à l'AD (Giannopoulos et al., 2014) ont été montrées. Ainsi, des inhibiteurs de la 5-LO auraient des effets neuroprotecteurs, grâce à leurs propriétés anti-oxydatives, et pourraient être utiles pour le traitement de maladies inflammatoires et les désordres neurodégénératifs, tels que l'AD (Czapski et al., 2012). D'ailleurs les souris AD, traitées avec un inhibiteur de la 5-LO (Zileuton), manifestent une amélioration de leurs symptômes (intégrité synaptique, augmentation

de la LTP) (Giannopoulos et al., 2014). Cette étude récente a ainsi permis de mettre en évidence un nouveau rôle de la 5-LO au niveau de la synapse, en modulant la fonction et la plasticité synaptique aussi bien que la mémoire. La 5-LO pourrait ainsi tout à fait moduler la synapse par l'intermédiaire de la régulation de protéines synaptiques comme SHANK3. D'ailleurs des études ont déjà permis de montrer *in vitro* et *in vivo* que la 5-LO pouvait réguler les récepteurs à l'AMPA. En effet une modulation de l'activité glutamatergique a été observée à la suite d'une inhibition de cette enzyme, par l'intermédiaire de l'augmentation de la phosphorylation de la sous unité GluR1 des récepteurs à l'AMPA (Imbesi et al., 2007 ; Ménard et al., 2005).

Même s'il existe à ce jour moins de preuves d'un lien entre la 5-lipoxygénase et la régulation de SHANK3, cela ouvre à nouveau un espoir sur la découverte d'une nouvelle cible potentielle pour le traitement de formes de TSA associées à une déficience de SHANK3. L'avantage est que l'inhibiteur de la 5-LO Zileuton (ou Ziflo®) est un médicament pour le traitement de l'asthme avec peu d'effets secondaires et serait donc facilement repositionnable pour le traitement de l'autisme.

IV. Conclusions

Ce travail de thèse est une preuve de principe que l'utilisation d'un modèle neuronal à partir d'hPSC est adéquate pour l'étude de la régulation de protéines synaptiques, telles que SHANK3, et de leur rôle sur la formation et la plasticité synaptique. Ces études sont très importantes pour mieux comprendre la physiopathologie des synaptopathies et la découverte de nouveaux composés thérapeutiques ciblés. En effet, avec ce travail de thèse, des potentiels médicaments et de nouvelles voies ont été découverts pour le traitement de formes rares d'autisme liées à *SHANK3*. Il serait tout à fait possible d'étendre ce travail à d'autres formes rares d'autisme, et même à d'autres maladies neuro-développementales.

Le succès de la modélisation avec des iPSC est tout de même à nuancer, car ce travail a mis en évidence de nombreuses limites quant à l'utilisation de ces cellules pour la modélisation pathologique et le criblage, en montrant l'impact des problèmes inhérents à ces cellules (mémoire épigénétique) et les problèmes liés à une maîtrise encore incertaine des protocoles de reprogrammation et de culture. De nombreuses études comparatives des ESC et iPSC devraient permettre une meilleure compréhension des différences entre ces dernières (et de les éliminer). De plus, l'identification de contrôles isogéniques adéquats, et l'amélioration des protocoles de culture devraient pallier un grand nombre de ces problèmes.

Ainsi, l'automatisation récente de la génération des iPSC (Paull et al., 2015), couplée avec les optimisations en cours, ouvrent de nombreux espoirs quant à la réalisation de ce type d'approches à grande échelle et en routine. Il sera enfin possible de travailler sur un grand nombre d'iPSC à partir d'un grand nombre de patients, permettant ainsi de découvrir des phénotypes robustes ou encore de déterminer l'effet d'un médicament sur un large panel de patients. Il serait par exemple possible alors, de faire de la médecine personnalisée et de tester *in vitro* l'effet de médicaments individuellement pour chaque patient afin de déterminer l'option thérapeutique optimale. Cette

technologie pourra permettre une future classification génétique des TSA et une sous classification regroupant phénotypes génétiques et moléculaires, permettant une meilleure prise en charge clinique des patients et la découverte de nouveaux médicaments spécifiques par criblage à haut débit. Cela ouvrira ainsi la voie à de multiples révolutions dans le champ de la recherche sur l'autisme, et même en aval en matière de diagnostic. Cette technologie pourrait faciliter la découverte de marqueurs diagnostiques, comme des défauts génomiques (expression de gènes, micro-ARN) ou des phénotypes morphologiques, moléculaires ou fonctionnels, permettant une meilleure détection et une meilleure prise en charge des patients atteints de TSA.

Bibliographie

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Acab, A., and Muotri, A.R. (2015). The Use of Induced Pluripotent Stem Cell Technology to Advance Autism Research and Treatment. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *12*, 534–545.
- Adam, G., and Matus, A. (1996). Role of actin in the organisation of brain postsynaptic densities. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *43*, 246–250.
- Adams, G.B., and Scadden, D.T. (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nat. Immunol.* *7*, 333–337.
- Alcamí Pertejo, M., Peral Guerra, M., and Gilaberte, I. (2000). [Open study of fluoxetine in children with autism]. *Actas Esp. Psiquiatr.* *28*, 353–356.
- Aman, M.G., Arnold, L.E., McDougle, C.J., Vitiello, B., Scahill, L., Davies, M., McCracken, J.T., Tierney, E., Nash, P.L., Posey, D.J., et al. (2005). Acute and long-term safety and tolerability of risperidone in children with autism. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *15*, 869–884.
- American Psychiatric Association (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR*. (Washington, DC: American Psychiatric Publishing).
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (American Psychiatric Publishing).
- Andari, E., Duhamel, J.-R., Zalla, T., Herbrecht, E., Leboyer, M., and Sirigu, A. (2010). Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4389–4394.
- Andersen, S.L., Laurberg, P., Wu, C.S., and Olsen, J. (2014). Attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder in children born to mothers with thyroid dysfunction: a Danish nationwide cohort study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* *121*, 1365–1374.
- Arking, D.E., Cutler, D.J., Brune, C.W., Teslovich, T.M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E.H., et al. (2008). A Common Genetic Variant in the Neurexin Superfamily Member CNTNAP2 Increases Familial Risk of Autism. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 160–164.
- Ashburn, T.T., and Thor, K.B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 673–683.
- Asperger, H. (1944). Die “Autistischen Psychopathen” im Kindesalter. *Arch. Für Psychiatr. Nervenkrankh.* *76*–136.
- Autism Speaks press release (2009). Autism Speaks Announces Results Reported for the Study of Fluoxetine in Autism (SOFIA).
- Avitzour, M., Mor-Shaked, H., Yanovsky-Dagan, S., Aharoni, S., Altarescu, G., Renbaum, P., Eldar-Geva, T., Schonberger, O., Levy-Lahad, E., Epsztejn-Litman, S., et al. (2014). FMR1 Epigenetic Silencing Commonly Occurs in Undifferentiated Fragile X-Affected Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Rep.* *3*, 699–706.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., and Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.* *25*, 63–77.
- Baker, D.E.C., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* *25*, 207–215.
- Bangash, M.A., Park, J.M., Melnikova, T., Wang, D., Jeon, S.K., Lee, D., Syeda, S., Kim, J., Kouser, M., Schwartz, J., et al. (2011). Enhanced Polyubiquitination of Shank3 and NMDA receptor in a mouse model of Autism. *Cell* *145*, 758–772.
- Banko, J.L., Poulin, F., Hou, L., DeMaria, C.T., Sonenberg, N., and Klann, E. (2005). The Translation Repressor 4E-BP2 Is Critical for eIF4F Complex Formation, Synaptic Plasticity, and Memory in the Hippocampus. *J. Neurosci.* *25*, 9581–9590.
- Baron, M.K., Boeckers, T.M., Vaida, B., Faham, S., Gingery, M., Sawaya, M.R., Salyer, D., Gundelfinger, E.D., and Bowie, J.U. (2006). An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* *311*, 531–535.
- Baron-Cohen, S. (2002). The extreme male brain theory of autism. *Trends Cogn. Sci.* *6*, 248–254.
- Baron-Cohen, S., Lombardo, M.V., Auyeung, B., Ashwin, E., Chakrabarti, B., and Knickmeyer, R. (2011). Why are autism spectrum conditions more prevalent in males? *PLoS Biol.* *9*, e1001081.

- De Bartolomeis, A., Tomasetti, C., Cicale, M., Yuan, P.-X., and Manji, H.K. (2012). Chronic treatment with lithium or valproate modulates the expression of Homer1b/c and its related genes Shank and Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* *22*, 527–535.
- Bateup, H.S., Takasaki, K.T., Saulnier, J.L., Denefrio, C.L., and Sabatini, B.L. (2011). Loss of Tsc1 In Vivo Impairs Hippocampal mGluR-LTD and Increases Excitatory Synaptic Function. *J. Neurosci.* *31*, 8862–8869.
- Baudouin, S.J., Gaudias, J., Gerharz, S., Hatstatt, L., Zhou, K., Punnakkal, P., Tanaka, K.F., Spooren, W., Hen, R., Zeeuw, C.I.D., et al. (2012). Shared Synaptic Pathophysiology in Syndromic and Nonsyndromic Rodent Models of Autism. *Science* *338*, 128–132.
- Belmonte, M.K., and Bourgeron, T. (2006). Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nat. Neurosci.* *9*, 1221–1225.
- Belsito, K.M., Law, P.A., Kirk, K.S., Landa, R.J., and Zimmerman, A.W. (2001). Lamotrigine therapy for autistic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Autism Dev. Disord.* *31*, 175–181.
- Beri, S., Tonna, N., Menozzi, G., Bonaglia, M.C., Sala, C., and Giorda, R. (2007). DNA methylation regulates tissue-specific expression of Shank3. *J. Neurochem.* *101*, 1380–1391.
- Berkel, S., Marshall, C.R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., Endris, V., Roberts, W., Szatmari, P., Pinto, D., et al. (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat. Genet.* *42*, 489–491.
- Berkel, S., Tang, W., Treviño, M., Vogt, M., Obenhaus, H.A., Gass, P., Scherer, S.W., Sprengel, R., Schrott, G., and Rappold, G.A. (2012). Inherited and de novo SHANK2 variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 344–357.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 11–21.
- Berry-Kravis, E., Sumis, A., Hervey, C., Nelson, M., Porges, S.W., Weng, N., Weiler, I.J., and Greenough, W.T. (2008). Open-label treatment trial of lithium to target the underlying defect in fragile X syndrome. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* *29*, 293–302.
- Berry-Kravis, E.M., Hessel, D., Rathmell, B., Zarevics, P., Cherubini, M., Walton-Bowen, K., Mu, Y., Nguyen, D.V., Gonzalez-Heydrich, J., Wang, P.P., et al. (2012). Effects of STX209 (arbaclofen) on neurobehavioral function in children and adults with fragile X syndrome: a randomized, controlled, phase 2 trial. *Sci. Transl. Med.* *4*, 152ra127.
- Betancur, C. (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.* *1380*, 42–77.
- Beveridge, N.J., Gardiner, E., Carroll, A.P., Tooney, P.A., and Cairns, M.J. (2010). Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol. Psychiatry* *15*, 1176–1189.
- Bishop, D.V.M., Jacobs, P.A., Lachlan, K., Wellesley, D., Barnicoat, A., Boyd, P.A., Fryer, A., Middlemiss, P., Smithson, S., Metcalfe, K., et al. (2011). Autism, language and communication in children with sex chromosome trisomies. *Arch. Dis. Child.* *96*, 954–959.
- Bittker, J.A. (2012). High-Throughput RT-PCR for small-molecule screening assays. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* *4*, 49–63.
- Bjorklund, G. (2013). The role of zinc and copper in autism spectrum disorders. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* *73*, 225–236.
- Blackshaw, L.A., Page, A.J., and Young, R.L. (2011). Metabotropic Glutamate Receptors as Novel Therapeutic Targets on Visceral Sensory Pathways. *Front. Neurosci.* *5*.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2006). Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 339–373.
- Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., and Ramalho-Santos, M. (2007). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Drug Selection. *Cell Stem Cell* *1*, 245–247.
- Bleuler, E. (1911). *Dementia praecox, oder Gruppe der Schizophrenien.* (Leipzig: Deuticke).
- Blundell, J., Blaiss, C.A., Etherton, M.R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., Bolliger, M.F., Südhof, T.C., and Powell, C.M. (2010). Neuroligin 1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 2115–2129.
- Boccuto, L., Lauri, M., Sarasua, S.M., Skinner, C.D., Buccella, D., Dwivedi, A., Orteschi, D., Collins, J.S., Zollino, M., Visconti, P., et al. (2013). Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *21*, 310–316.

- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., et al. (2011). Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell* *144*, 439–452.
- Böckers, T.M., Mameza, M.G., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Weise, C., Buck, F., Richter, D., Gundelfinger, E.D., and Kreienkamp, H.-J. (2001). Synaptic Scaffolding Proteins in Rat Brain ANKYRIN REPEATS OF THE MULTIDOMAIN Shank PROTEIN FAMILY INTERACT WITH THE CYTOSKELETAL PROTEIN α -FODRIN. *J. Biol. Chem.* *276*, 40104–40112.
- Böckers, T.M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E.D., Kreutz, M.R., Richter, D., Kindler, S., and Kreienkamp, H.-J. (2004). Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.* *26*, 182–190.
- Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., and Böckers, T.M. (2002). ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J. Neurochem.* *83*, 1013–1017.
- Boeckers, T.M., Winter, C., Smalla, K.H., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C.C., and Gundelfinger, E.D. (1999). Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *264*, 247–252.
- Boeckers, T.M., Bockmann, J., Kreutz, M.R., and Gundelfinger, E.D. (2002). ProSAP/Shank proteins – a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J. Neurochem.* *81*, 903–910.
- Boeckers, T.M., Liedtke, T., Spilker, C., Dresbach, T., Bockmann, J., Kreutz, M.R., and Gundelfinger, E.D. (2005). C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3. *J. Neurochem.* *92*, 519–524.
- Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., Delorme, R., Bourgeron, T., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl. Psychiatry* *3*, e294.
- Bonaglia, M.C., Giorda, R., Borgatti, R., Felisari, G., Gagliardi, C., Selicorni, A., and Zuffardi, O. (2001). Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *69*, 261–268.
- Bonaglia, M.C., Giorda, R., Mani, E., Aceti, G., Anderlid, B.-M., Baroncini, A., Pramparo, T., and Zuffardi, O. (2006). Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J. Med. Genet.* *43*, 822–828.
- Bondy, A., and Frost, L. (2001). The Picture Exchange Communication System. *Behav. Modif.* *25*, 725–744.
- Bourgeron, T. (2009). A synaptic trek to autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* *19*, 231–234.
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 551–563.
- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D.L., Takahashi, N., Kajiwara, Y., Yang, M., Katz, A.M., Scattoni, M.L., et al. (2010). Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol. Autism* *1*, 15.
- Bozdagi, O., Tavassoli, T., and Buxbaum, J.D. (2013). Insulin-like growth factor-1 rescues synaptic and motor deficits in a mouse model of autism and developmental delay. *Mol. Autism* *4*, 9.
- Brennan, K., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhardt, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., et al. (2011). Modeling schizophrenia using hiPSC neurons. *Nature* *473*, 221–225.
- Brennan, K., Simone, A., Tran, N., and Gage, F. (2012). Modeling psychiatric disorders at the cellular and network levels. *Mol. Psychiatry* *17*, 1239–1253.
- Brodin, P., DelNery, E., and Soleilhac, E. (2015). [High content screening in chemical biology: overview and main challenges]. *Médecine Sci. MS* *31*, 187–196.
- Bromley, R.L., Mawer, G., Clayton-Smith, J., and Baker, G.A. (2008). Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology* *71*, 1923–1924.
- Brugha, T.S., McManus, S., Bankart, J., Scott, F., Purdon, S., Smith, J., Bebbington, P., Jenkins, R., and Meltzer, H. (2011). Epidemiology of autism spectrum disorders in adults in the community in England. *Arch. Gen. Psychiatry* *68*, 459–465.
- Campbell, J.M., and Dommestrup, A.K. (2010). Peabody Picture Vocabulary Test. In *The Corsini Encyclopedia of Psychology*, (John Wiley & Sons, Inc.).

- Campbell, M., and Overall, J.E. (1989). Diagnostic criteria and behavior patterns in infantile autism. *Psychopharmacol. Bull.* *25*, 194–197.
- Campbell, M., Fish, B., Korein, J., Shapiro, T., Collins, P., and Koh, C. (1972). Lithium and chlorpromazine: a controlled crossover study of hyperactive severely disturbed young children. *J. Autism Child. Schizophr.* *2*, 234–263.
- Campbell, M., Armenteros, J.L., Malone, R.P., Adams, P.B., Eisenberg, Z.W., and Overall, J.E. (1997). Neuroleptic-related dyskinesias in autistic children: a prospective, longitudinal study. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *36*, 835–843.
- Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C.-P., and Rao, M.S. (2001). Enrichment of Neurons and Neural Precursors from Human Embryonic Stem Cells. *Exp. Neurol.* *172*, 383–397.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ.* *63*, 1–21.
- Chabrol, F.P., Arenz, A., Wiechert, M.T., Margrie, T.W., and DiGregorio, D.A. (2015). Synaptic diversity enables temporal coding of coincident multisensory inputs in single neurons. *Nat. Neurosci.* *18*, 718–727.
- Chamberlain, S.J., Chen, P.-F., Ng, K.Y., Bourgois-Rocha, F., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E.S., and Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17668–17673.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* *27*, 275–280.
- Chao, H.-T., Chen, H., Samaco, R.C., Xue, M., Chahrour, M., Yoo, J., Neul, J.L., Gong, S., Lu, H.-C., Heintz, N., et al. (2010). GABAergic dysfunction mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* *468*, 263–269.
- Charbord, J., Poydenot, P., Bonnefond, C., Feyeux, M., Casagrande, F., Brinon, B., Francelle, L., Aurégan, G., Guillermier, M., Caillaer, M., et al. (2013). High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 1816–1828.
- Cheng, M.-C., Lu, C.-L., Luu, S.-U., Tsai, H.-M., Hsu, S.-H., Chen, T.-T., and Chen, C.-H. (2010). Genetic and Functional Analysis of the DLG4 Gene Encoding the Post-Synaptic Density Protein 95 in Schizophrenia. *PLoS ONE* *5*.
- Chergui, K., Svenningsson, P., and Greengard, P. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2191–2196.
- Chess, S. (1971). Autism in children with congenital rubella. *J. Autism Child. Schizophr.* *1*, 33–47.
- Chess, S., Fernandez, P., and Korn, S. (1978). Behavioral consequences of congenital rubella. *J. Pediatr.* *93*, 699–703.
- Cheung, A.Y.L., Horvath, L.M., Grafodatskaya, D., Pasceri, P., Weksberg, R., Hotta, A., Carrel, L., and Ellis, J. (2011). Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 2103–2115.
- Chilian, B., Abdollahpour, H., Bierhals, T., Haltrich, I., Fekete, G., Nagel, I., Rosenberger, G., and Kutsche, K. (2013). Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. *Clin. Genet.* *84*, 560–565.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell* *5*, 111–123.
- Ching, H., and Pringsheim, T. (2012). Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst. Rev.* *5*, CD009043.
- Ching, M.S., Shen, Y., Tan, W.-H., Jeste, S.S., Morrow, E.M., Chen, X., Mukaddes, N.M., Yoo, S.-Y., Hanson, E., Hundley, R., et al. (2010). Deletions of NRXN1 (Neurexin-1) Predispose to a Wide Spectrum of Developmental Disorders. *Am. J. Med. Genet.* *153B*, 937–947.
- Ching, T.-T., Maunakea, A.K., Jun, P., Hong, C., Zardo, G., Pinkel, D., Albertson, D.G., Fridlyand, J., Mao, J.-H., Shchors, K., et al. (2005). Epigenome analyses using BAC microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3. *Nat. Genet.* *37*, 645–651.

- Chinnici, C., Yao, Y., and Praticò, D. (2007). The 5-lipoxygenase enzymatic pathway in the mouse brain: young versus old. *Neurobiol Aging*.
- Chiu, S., Wegelin, J.A., Blank, J., Jenkins, M., Day, J., Hessel, D., Tassone, F., and Hagerman, R. (2007). Early Acceleration of Head Circumference in Children with Fragile X Syndrome and Autism: *J. Dev. Behav. Pediatr.* *28*, 31–35.
- Christensen, J., Grønberg, T.K., Sørensen, M.J., Schendel, D., Parner, E.T., Pedersen, L.H., and Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* *309*, 1696–1703.
- Chugani, D.C., Muzik, O., Behen, M., Rothermel, R., Janisse, J.J., Lee, J., and Chugani, H.T. (1999). Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann. Neurol.* *45*, 287–295.
- Cipriani, A., Girlanda, F., Agrimi, E., Barichello, A., Beneduce, R., Bighelli, I., Bisoffi, G., Bisogno, A., Bortolaso, P., Boso, M., et al. (2013). Effectiveness of lithium in subjects with treatment-resistant depression and suicide risk: a protocol for a randomised, independent, pragmatic, multicentre, parallel-group, superiority clinical trial. *BMC Psychiatry* *13*, 212.
- Clementi, M., Milani, S., Mammi, I., Boni, S., Monciotti, C., and Tenconi, R. (1999). Neurofibromatosis type 1 growth charts. *Am. J. Med. Genet.* *87*, 317–323.
- Collins, A.L., Ma, D., Whitehead, P.L., Martin, E.R., Wright, H.H., Abramson, R.K., Hussman, J.P., Haines, J.L., Cuccaro, M.L., Gilbert, J.R., et al. (2006). Investigation of autism and GABA receptor subunit genes in multiple ethnic groups. *Neurogenetics* *7*, 167–174.
- Condra, J.A., Neibergs, H., Wei, W., and Brennan, M.D. (2007). Evidence for two schizophrenia susceptibility genes on chromosome 22q13: *Psychiatr. Genet.* *17*, 292–298.
- Constantino, J.N., Davis, S.A., Todd, R.D., Schindler, M.K., Gross, M.M., Brophy, S.L., Metzger, L.M., Shoushtari, C.S., Splinter, R., and Reich, W. (2003). Validation of a brief quantitative measure of autistic traits: comparison of the social responsiveness scale with the autism diagnostic interview-revised. *J. Autism Dev. Disord.* *33*, 427–433.
- Constantino, J.N., Todorov, A., Hilton, C., Law, P., Zhang, Y., Molloy, E., Fitzgerald, R., and Geschwind, D. (2013). Autism recurrence in half siblings: strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Mol. Psychiatry* *18*, 137–138.
- Cornew, L., Roberts, T.P.L., Blaskey, L., and Edgar, J.C. (2012). Resting-State Oscillatory Activity in Autism Spectrum Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* *42*, 1884–1894.
- Cortesi, F., Giannotti, F., Sebastiani, T., Panunzi, S., and Valente, D. (2012). Controlled-release melatonin, singly and combined with cognitive behavioural therapy, for persistent insomnia in children with autism spectrum disorders: a randomized placebo-controlled trial. *J. Sleep Res.* *21*, 700–709.
- Corti, S., Faravelli, I., Cardano, M., and Conti, L. (2015). Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* *10*, 615–629.
- Costa, R.M., and Silva, A.J. (2003). Mouse models of neurofibromatosis type I: bridging the GAP. *Trends Mol. Med.* *9*, 19–23.
- Courchesne E, Carper R, and Akshoomoff N (2003). Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *JAMA* *290*, 337–344.
- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* *309*, 1369–1373.
- Crawford, J.M., and Curtis, D.R. (1964). The excitation and depression of mammalian cortical neurones by amino acids. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* *23*, 313–329.
- Crider, A., Thakkar, R., Ahmed, A.O., and Pillai, A. (2014). Dysregulation of estrogen receptor beta (ER β), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects. *Mol. Autism* *5*.
- Czapski, G.A., Czubowicz, K., and Strosznajder, R.P. (2012). Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep. PR* *64*, 1179–1188.
- Dadds, M.R., MacDonald, E., Cauchi, A., Williams, K., Levy, F., and Brennan, J. (2014). Nasal oxytocin for social deficits in childhood autism: a randomized controlled trial. *J. Autism Dev. Disord.* *44*, 521–531.

- Delahaye, A., Toutain, A., Aboura, A., Dupont, C., Tabet, A.C., Benzacken, B., Elion, J., Verloes, A., Pipiras, E., and Drunat, S. (2009). Chromosome 22q13.3 deletion syndrome with a de novo interstitial 22q13.3 cryptic deletion disrupting SHANK3. *Eur. J. Med. Genet.* *52*, 328–332.
- DeLong, G.R., Ritch, C.R., and Burch, S. (2002). Fluoxetine response in children with autistic spectrum disorders: correlation with familial major affective disorder and intellectual achievement. *Dev. Med. Child Neurol.* *44*, 652–659.
- Delorme, R., Ey, E., Toro, R., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T. (2013). Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat. Med.* *19*, 685–694.
- Dementieva, Y.A., Vance, D.D., Donnelly, S.L., Elston, L.A., Wolpert, C.M., Ravan, S.A., DeLong, G.R., Abramson, R.K., Wright, H.H., and Cuccaro, M.L. (2005). Accelerated head growth in early development of individuals with autism. *Pediatr. Neurol.* *32*, 102–108.
- Denayer, A., Van Esch, H., de Ravel, T., Frijns, J.-P., Van Buggenhout, G., Vogels, A., Devriendt, K., Geutjens, J., Thiry, P., and Swillen, A. (2012). Neuropsychopathology in 7 Patients with the 22q13 Deletion Syndrome: Presence of Bipolar Disorder and Progressive Loss of Skills. *Mol. Syndromol.* *3*, 14–20.
- Dhar, S.U., del Gaudio, D., German, J.R., Peters, S.U., Ou, Z., Bader, P.I., Berg, J.S., Blazo, M., Brown, C.W., Graham, B.H., et al. (2010). 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *Am. J. Med. Genet. A.* *152A*, 573–581.
- Dhawan, J., and Rando, T.A. (2005). Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* *15*, 666–673.
- Ding, Q., Lee, Y.-K., Schaefer, E.A.K., Peters, D.T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D.L., Meissner, T.B., Hendriks, W.T., et al. (2013). A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* *12*, 238–251.
- Djuric, U., Cheung, A.Y.L., Zhang, W., Mok, R.S., Lai, W., Piekna, A., Hendry, J.A., Ross, P.J., Pasceri, P., Kim, D.-S., et al. (2015). MECP2e1 isoform mutation affects the form and function of neurons derived from Rett syndrome patient iPSC cells. *Neurobiol. Dis.* *76*, 37–45.
- Doers, M.E., Musser, M.T., Nichol, R., Berndt, E.R., Baker, M., Gomez, T.M., Zhang, S.-C., Abbeduto, L., and Bhattacharyya, A. (2014). iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem Cells Dev.* *23*, 1777–1787.
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 543–550.
- Dravid, S.M., and Murray, T.F. (2004). Spontaneous synchronized calcium oscillations in neocortical neurons in the presence of physiological [Mg²⁺]: involvement of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors. *Brain Res.* *1006*, 8–17.
- DuPaul, G.J., Power, T.J., Anastopoulos, A.D., and Reid, R. (1998). ADHD Rating Scale-IV. Checklists, Norms, and Clinical interpretation. *J. Psychoeduc. Assess.*
- Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I.C., Anckarsäter, H., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* *39*, 25–27.
- Durand, C.M., Perroy, J., Loll, F., Perrais, D., Fagni, L., Bourgeron, T., Montcouquiol, M., and Sans, N. (2012). SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry* *17*, 71–84.
- Ehlers, M.D. (1999). Synapse structure: Glutamate receptors connected by the shanks. *Curr. Biol.* *9*, R848–R850.
- Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Neurosci.* *6*, 231–242.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., et al. (2007). Developmental Study of Fragile X Syndrome Using Human Embryonic Stem Cells Derived from Preimplantation Genetically Diagnosed Embryos. *Cell Stem Cell* *1*, 568–577.
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* *3*, 519–532.
- Abu-Elneel, K., Liu, T., Gazzaniga, F.S., Nishimura, Y., Wall, D.P., Geschwind, D.H., Lao, K., and Kosik, K.S. (2008). Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics* *9*, 153–161.
- Endicott, J., Spitzer, R.L., Fleiss, J.L., and Cohen, J. (1976). The global assessment scale. A procedure for measuring overall severity of psychiatric disturbance. *Arch. Gen. Psychiatry* *33*, 766–771.

- Erickson, C.A., Posey, D.J., Stigler, K.A., Mullett, J., Katschke, A.R., and McDougle, C.J. (2007). A retrospective study of memantine in children and adolescents with pervasive developmental disorders. *Psychopharmacology (Berl.)* *191*, 141–147.
- Eroglu, C., and Barres, B.A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* *468*, 223–231.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154–156.
- Failla, P., Romano, C., Alberti, A., Vasta, A., Buono, S., Castiglia, L., Luciano, D., Di Benedetto, D., Fichera, M., and Galesi, O. (2007). Schizophrenia in a patient with subtelomeric duplication of chromosome 22q. *Clin. Genet.* *71*, 599–601.
- Fankhauser, M.P., Karumanchi, V.C., German, M.L., Yates, A., and Karumanchi, S.D. (1992). A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of transdermal clonidine in autism. *J. Clin. Psychiatry* *53*, 77–82.
- Farmer, C.A., and Aman, M.G. (2011). Aripiprazole for the treatment of irritability associated with autism. *Expert Opin. Pharmacother.* *12*, 635–640.
- Fatemi, S.H., Realmuto, G.M., Khan, L., and Thuras, P. (1998). Fluoxetine in treatment of adolescent patients with autism: a longitudinal open trial. *J. Autism Dev. Disord.* *28*, 303–307.
- Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., Cook Jr., E.H., Skinner, C., Schwartz, C.E., and Sommer, S.S. (2006). High frequency of neurexin 1 β signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci. Lett.* *409*, 10–13.
- Féron, F., Perry, C., Girard, S.D., and Mackay-Sim, A. (2013). Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1059*, 107–114.
- Feyder, M., Karlsson, R.-M., Mathur, P., Lyman, M., Bock, R., Momenan, R., Munasinghe, J., Scattoni, M.L., Ihne, J., Camp, M., et al. (2010). Association of Mouse Dlg4 (PSD-95) Gene Deletion and Human DLG4 Gene Variation With Phenotypes Relevant to Autism Spectrum Disorders and Williams' Syndrome. *Am. J. Psychiatry* *167*, 1508–1517.
- Findling, R.L., Mankoski, R., Timko, K., Lears, K., McCartney, T., McQuade, R.D., Eudicone, J.M., Amatniek, J., Marcus, R.N., and Sheehan, J.J. (2014). A randomized controlled trial investigating the safety and efficacy of aripiprazole in the long-term maintenance treatment of pediatric patients with irritability associated with autistic disorder. *J. Clin. Psychiatry* *75*, 22–30.
- Fombonne, E. (2002). Epidemiological trends in rates of autism. *Mol. Psychiatry* *7 Suppl 2*, S4–S6.
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr. Res.* *65*, 591–598.
- Fournier, K.A., Hass, C.J., Naik, S.K., Lodha, N., and Cauraugh, J.H. (2010). Motor coordination in autism spectrum disorders: a synthesis and meta-analysis. *J. Autism Dev. Disord.* *40*, 1227–1240.
- Fua, P., and Knott, G.W. (2015). Modeling brain circuitry over a wide range of scales. *Front. Neuroanat.*
- Fukuda, T., Sugie, H., Ito, M., and Sugie, Y. (2001). [Clinical evaluation of treatment with fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor in children with autistic disorder]. *No Hattatsu Brain Dev.* *33*, 314–318.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* *85*, 348–362.
- Gauthier, J., Spiegelman, D., Piton, A., Lafrenière, R.G., Laurent, S., St-Onge, J., Lapointe, L., Hamdan, F.F., Cossette, P., Motttron, L., et al. (2009). Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* *150B*, 421–424.
- Gauthier, J., Champagne, N., Lafrenière, R.G., Xiong, L., Spiegelman, D., Brustein, E., Lapointe, M., Peng, H., Côté, M., Noreau, A., et al., S2D Team (2010). De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 7863–7868.
- Geier, D.A., Kern, J.K., King, P.G., Sykes, L.K., and Geier, M.R. (2012). An evaluation of the role and treatment of elevated male hormones in autism spectrum disorders. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* *72*, 1–17.
- Ghaleiha, A., Asadabadi, M., Mohammadi, M.-R., Shahei, M., Tabrizi, M., Hajiaghah, R., Hassanzadeh, E., and Akhondzadeh, S. (2013a). Memantine as adjunctive treatment to risperidone in children with autistic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* *16*, 783–789.
- Ghaleiha, A., Mohammadi, E., Mohammadi, M.-R., Farokhnia, M., Modabbernia, A., Yekehtaz, H., Ashrafi, M., Hassanzadeh, E., and Akhondzadeh, S. (2013b). Riluzole as an adjunctive therapy to risperidone for the treatment of irritability in children with autistic disorder: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Paediatr. Drugs* *15*, 505–514.

- Ghaleiha, A., Ghyasvand, M., Mohammadi, M.-R., Farokhnia, M., Yadegari, N., Tabrizi, M., Hajiaghvae, R., Yekehtaz, H., and Akhondzadeh, S. (2013c). Galantamine efficacy and tolerability as an augmentative therapy in autistic children: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* *28*, 677–685.
- Ghanizadeh, A., and Moghimi-Sarani, E. (2013). A randomized double blind placebo controlled clinical trial of N-Acetylcysteine added to risperidone for treating autistic disorders. *BMC Psychiatry* *13*, 196.
- Ghosh, A., Michalon, A., Lindemann, L., Fontoura, P., and Santarelli, L. (2013). Drug discovery for autism spectrum disorder: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 777–790.
- Giannopoulos, P.F., Chu, J., Joshi, Y.B., Sperow, M., Li, J.-G., Kirby, L.G., and Praticò, D. (2014). Gene knockout of 5-lipoxygenase rescues synaptic dysfunction and improves memory in the triple-transgenic model of Alzheimer’s disease. *Mol. Psychiatry* *19*, 511–518.
- Gillberg, C., Cederlund, M., Lamberg, K., and Zeijlon, L. (2006). Brief report: “the autism epidemic”. The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J. Autism Dev. Disord.* *36*, 429–435.
- Gillott, A., Furniss, F., and Walter, A. (2001). Anxiety in high-functioning children with autism. *Autism Int. J. Res. Pract.* *5*, 277–286.
- Gilman, S.R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., and Vitkup, D. (2011). Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron* *70*, 898–907.
- Ginzinger, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *30*, 503–512.
- Giza, J., Urbanski, M.J., Prestori, F., Bandyopadhyay, B., Yam, A., Friedrich, V., Kelley, K., D’Angelo, E., and Goldfarb, M. (2010). Behavioral and cerebellar transmission deficits in mice lacking the autism-linked gene *islet brain-2*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 14805–14816.
- Gkogkas, C.G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D.B., Vasuta, C., Yee, S., Truitt, M., Dallaire, P., et al. (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* *493*, 371–377.
- Glessner, J.T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C.E., Wood, S., Zhang, H., Estes, A., Brune, C.W., Bradfield, J.P., et al. (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* *459*, 569–573.
- Goizet, C., Excoffier, E., Taine, L., Taupiac, E., El Moneim, A.A., Arveiler, B., Bouvard, M., and Lacombe, D. (2000). Case with autistic syndrome and chromosome 22q13.3 deletion detected by FISH. *Am. J. Med. Genet.* *96*, 839–844.
- Goldstein, S., and Schwabach, A.J. (2004). The comorbidity of Pervasive Developmental Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: results of a retrospective chart review. *J. Autism Dev. Disord.* *34*, 329–339.
- Gong, Y., Lippa, C.F., Zhu, J., Lin, Q., and Rosso, A.L. (2009). Disruption of glutamate receptors at Shank-postsynaptic platform in Alzheimer’s disease. *Brain Res.* *1292*, 191–198.
- González, F., Boué, S., and Belmonte, J.C.I. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 231–242.
- Gordon, I., Vander Wyk, B.C., Bennett, R.H., Cordeaux, C., Lucas, M.V., Eilbott, J.A., Zagoory-Sharon, O., Leckman, J.F., Feldman, R., and Pelphrey, K.A. (2013). Oxytocin enhances brain function in children with autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20953–20958.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M., Kiskinis, E., et al. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* *471*, 63–67.
- Govek, E.-E., Newey, S.E., Akerman, C.J., Cross, J.R., Van der Veken, L., and Van Aelst, L. (2004). The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat. Neurosci.* *7*, 364–372.
- Grabrucker, A.M., Knight, M.J., Proepper, C., Bockmann, J., Joubert, M., Rowan, M., Nienhaus, G.U., Garner, C.C., Bowie, J.U., Kreutz, M.R., et al. (2011a). Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *EMBO J.* *30*, 569–581.
- Grabrucker, A.M., Schmeisser, M.J., Schoen, M., and Boeckers, T.M. (2011b). Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends Cell Biol.* *21*, 594–603.

- Grabrucker, S., Proepper, C., Mangus, K., Eckert, M., Chhabra, R., Schmeisser, M.J., Boeckers, T.M., and Grabrucker, A.M. (2014). The PSD protein ProSAP2/Shank3 displays synapto-nuclear shuttling which is deregulated in a schizophrenia-associated mutation. *Exp. Neurol.* *253*, 126–137.
- Greger, I.H., and Esteban, J.A. (2007). AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 289–297.
- Griesi-Oliveira, K., Acab, A., Gupta, A.R., Sunaga, D.Y., Chailangkarn, T., Nicol, X., Nunez, Y., Walker, M.F., Murdoch, J.D., Sanders, S.J., et al. (2014). Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol. Psychiatry.*
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., and Daley, G.Q. (2011). Induced pluripotent stem cells — opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 915–929.
- Guastella, A.J., Einfeld, S.L., Gray, K.M., Rinehart, N.J., Tonge, B.J., Lambert, T.J., and Hickie, I.B. (2010). Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. *Biol. Psychiatry* *67*, 692–694.
- Guastella, A.J., Gray, K.M., Rinehart, N.J., Alvares, G.A., Tonge, B.J., Hickie, I.B., Keating, C.M., Cacciotti-Saija, C., and Einfeld, S.L. (2015). The effects of a course of intranasal oxytocin on social behaviors in youth diagnosed with autism spectrum disorders: a randomized controlled trial. *J. Child Psychol. Psychiatry* *56*, 444–452.
- Guilmatre, A., Huguet, G., Delorme, R., and Bourgeron, T. (2014). The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Dev. Neurobiol.* *74*, 113–122.
- Guinchat, V., Thorsen, P., Laurent, C., Cans, C., Bodeau, N., and Cohen, D. (2012). Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* *91*, 287–300.
- Gundelfinger, E.D., Boeckers, T.M., Baron, M.K., and Bowie, J.U. (2006). A role for zinc in postsynaptic density asSAMbly and plasticity? *Trends Biochem. Sci.* *31*, 366–373.
- Gurvich, N., and Klein, P.S. (2002). Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts. *Pharmacol. Ther.* *96*, 45–66.
- Haeckel, A., Ahuja, R., Gundelfinger, E.D., Qualmann, B., and Kessels, M.M. (2008). The Actin-Binding Protein Abp1 Controls Dendritic Spine Morphology and Is Important for Spine Head and Synapse Formation. *J. Neurosci.* *28*, 10031–10044.
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., et al. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch. Gen. Psychiatry* *68*, 1095–1102.
- Han, K., Holder, J.L., Schaaf, C.P., Lu, H., Chen, H., Kang, H., Tang, J., Wu, Z., Hao, S., Cheung, S.W., et al. (2013). SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* *503*, 72–77.
- Handen, B.L., Johnson, C.R., and Lubetsky, M. (2000). Efficacy of methylphenidate among children with autism and symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Autism Dev. Disord.* *30*, 245–255.
- Hardan, A.Y., Fung, L.K., Libove, R.A., Obukhanych, T.V., Nair, S., Herzenberg, L.A., Frazier, T.W., and Tirouvanziam, R. (2012). A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. *Biol. Psychiatry* *71*, 956–961.
- Harfterkamp, M., van de Loo-Neus, G., Minderaa, R.B., van der Gaag, R.-J., Escobar, R., Schacht, A., Pamulapati, S., Buitelaar, J.K., and Hoekstra, P.J. (2012). A randomized double-blind study of atomoxetine versus placebo for attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in children with autism spectrum disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *51*, 733–741.
- Harfterkamp, M., Buitelaar, J.K., Minderaa, R.B., van de Loo-Neus, G., van der Gaag, R.-J., and Hoekstra, P.J. (2013). Long-term treatment with atomoxetine for attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in children and adolescents with autism spectrum disorder: an open-label extension study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *23*, 194–199.
- Harrison, P.J., and Weinberger, D.R. (2004). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* *10*, 40–68.
- Hartley, S.L., and Sikora, D.M. (2010). Detecting Autism Spectrum Disorder in Children With Intellectual Disability: Which DSM-IV-TR Criteria Are Most Useful? *Focus Autism Dev. Disabil.* *25*, 85–97.
- Hayashi, M.K., Tang, C., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M.H., Xu, R.-M., Li, H., Sala, C., and Hayashi, Y. (2009). The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell* *137*, 159–171.

- Hellings, J.A., Weckbaugh, M., Nickel, E.J., Cain, S.E., Zarcone, J.R., Reese, R.M., Hall, S., Ermer, D.J., Tsai, L.Y., Schroeder, S.R., et al. (2005). A double-blind, placebo-controlled study of valproate for aggression in youth with pervasive developmental disorders. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *15*, 682–692.
- Hensch, T.K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 877–888.
- Hering, H., and Sheng, M. (2003). Activity-Dependent Redistribution and Essential Role of Cortactin in Dendritic Spine Morphogenesis. *J. Neurosci.* *23*, 11759–11769.
- Herman, G.E., Greenberg, F., and Ledbetter, D.H. (1988). Multiple congenital anomaly/mental retardation (MCA/MR) syndrome with Goldenhar complex due to a terminal del(22q). *Am. J. Med. Genet.* *29*, 909–915.
- Hoeffler, C.A., and Klann, E. (2010). mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci.* *33*, 67–75.
- Hoeffler, C.A., Sanchez, E., Hagerman, R.J., Mu, Y., Nguyen, D.V., Wong, H., Whelan, A.M., Zukin, R.S., Klann, E., and Tassone, F. (2012). Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* *11*, 332–341.
- Hollander, E., Phillips, A., Chaplin, W., Zagursky, K., Novotny, S., Wasserman, S., and Iyengar, R. (2005). A placebo controlled crossover trial of liquid fluoxetine on repetitive behaviors in childhood and adolescent autism. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *30*, 582–589.
- Hollander, E., Wasserman, S., Swanson, E.N., Chaplin, W., Schapiro, M.L., Zagursky, K., and Novotny, S. (2006a). A double-blind placebo-controlled pilot study of olanzapine in childhood/adolescent pervasive developmental disorder. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *16*, 541–548.
- Hollander, E., Soorya, L., Wasserman, S., Esposito, K., Chaplin, W., and Anagnostou, E. (2006b). Divalproex sodium vs. placebo in the treatment of repetitive behaviours in autism spectrum disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* *9*, 209–213.
- Hollander, E., Chaplin, W., Soorya, L., Wasserman, S., Novotny, S., Rusoff, J., Feisen, N., Pepa, L., and Anagnostou, E. (2010). Divalproex sodium vs placebo for the treatment of irritability in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *35*, 990–998.
- Hollander, E., Soorya, L., Chaplin, W., Anagnostou, E., Taylor, B.P., Ferretti, C.J., Wasserman, S., Swanson, E., and Settiani, C. (2012). A double-blind placebo-controlled trial of fluoxetine for repetitive behaviors and global severity in adult autism spectrum disorders. *Am. J. Psychiatry* *169*, 292–299.
- Horev, G., Ellegood, J., Lerch, J.P., Son, Y.-E.E., Muthuswamy, L., Vogel, H., Krieger, A.M., Buja, A., Henkelman, R.M., Wigler, M., et al. (2011). Dosage-dependent phenotypes in models of 16p11.2 lesions found in autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17076–17081.
- Hu, B.-Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J.A., and Zhang, S.-C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4335–4340.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* *26*, 795–797.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1269–1275.
- Huguet, G., Ey, E., and Bourgeron, T. (2013). The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *14*, 191–213.
- Hung, A.Y., Futai, K., Sala, C., Valtschanoff, J.G., Ryu, J., Woodworth, M.A., Kidd, F.L., Sung, C.C., Miyakawa, T., Bear, M.F., et al. (2008). Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 1697–1708.
- Hüser, J., Lohrmann, E., Kalthof, B., Burkhardt, N., Brüggemeier, U., and Bechem, M. (2006). High-throughput Screening for Targeted Lead Discovery. In *High-Throughput Screening in Drug Discovery*, J. Hüser, ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 15–36.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Närvä, E., Ng, S., Sourour, M., Hämläinen, R., Olsson, C., et al. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* *471*, 58–62.
- Huttenlocher, P.R., and Dabholkar, A.S. (1997). Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* *387*, 167–178.

- Ikonomovic, M.D., Abrahamson, E.E., Uz, T., Manev, H., and DeKosky, S.T. (2008). Increased 5-Lipoxygenase Immunoreactivity in the Hippocampus of Patients With Alzheimer's Disease. *J. Histochem. Cytochem.* *56*, 1065–1073.
- Im, Y.J., Lee, J.H., Park, S.H., Park, S.J., Rho, S.-H., Kang, G.B., Kim, E., and Eom, S.H. (2003). Crystal Structure of the Shank PDZ-Ligand Complex Reveals a Class I PDZ Interaction and a Novel PDZ-PDZ Dimerization. *J. Biol. Chem.* *278*, 48099–48104.
- Imbesi, M., Zavoreo, I., Uz, T., Sharma, R.P., Dimitrijevic, N., Manev, H., and Manev, R. (2007). 5-Lipoxygenase inhibitor MK-886 increases GluR1 phosphorylation in neuronal cultures in vitro and in the mouse cortex in vivo. *Brain Res.* *1147*, 148–153.
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.-H., Narzisi, G., Leotta, A., et al. (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* *74*, 285–299.
- Ivar, O. (1987). Behavioral treatment and normal educational and intellectual functioning in young autistic children. *J. Consult. Clin. Psychol.* *55*, 3–9.
- Jacquemont, S., Coe, B.P., Hersch, M., Duyzend, M.H., Krumm, N., Bergmann, S., Beckmann, J.S., Rosenfeld, J.A., and Eichler, E.E. (2014). A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 415–425.
- Jahromi, L.B., Kasari, C.L., McCracken, J.T., Lee, L.S.-Y., Aman, M.G., McDougle, C.J., Scahill, L., Tierney, E., Arnold, L.E., Vitiello, B., et al. (2009). Positive effects of methylphenidate on social communication and self-regulation in children with pervasive developmental disorders and hyperactivity. *J. Autism Dev. Disord.* *39*, 395–404.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., et al., Paris Autism Research International Sibpair Study (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* *34*, 27–29.
- Jiang, Y.-H., and Ehlers, M.D. (2013). Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron* *78*, 8–27.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* *337*, 816–821.
- Johnson, M.A., Weick, J.P., Pearce, R.A., and Zhang, S.-C. (2007). Functional Neural Development from Human Embryonic Stem Cells: Accelerated Synaptic Activity via Astrocyte Coculture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 3069–3077.
- Jorda, E.G., Verdaguer, E., Canudas, A.M., Jiménez, A., Bruna, A., Caelles, C., Bravo, R., Escubedo, E., Pubill, D., Camarasa, J., et al. (2003). Neuroprotective action of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in colchicine-induced apoptosis. *Neuropharmacology* *45*, 672–683.
- Jordà, E.G., Verdaguer, E., Canudas, A.M., Jiménez, A., De Arriba, S.G., Allgaier, C., Pallàs, M., and Camins, A. (2005). Implication of cyclin-dependent kinase 5 in the neuroprotective properties of lithium. *Neuroscience* *134*, 1001–1011.
- Jorgensen, T. h., Børglum, A. d., Mors, O., Wang, A. g., Pinaud, M., Flint, T. j., Dahl, H. a., Vang, M., Kruse, T. a., and Ewald, H. (2002). Search for common haplotypes on chromosome 22q in patients with schizophrenia or bipolar disorder from the Faroe Islands. *Am. J. Med. Genet.* *114*, 245–252.
- Just, M.A., Cherkassky, V.L., Keller, T.A., Kana, R.K., and Minshew, N.J. (2007). Functional and anatomical cortical underconnectivity in autism: evidence from an fMRI study of an executive function task and corpus callosum morphometry. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *17*, 951–961.
- Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., Soen, M., Ando, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2013). Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20284–20289.
- Kandel, E.R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* *294*, 1030–1038.
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nerv. Child* *2*, 217–250.
- Kelleher III, R.J., and Bear, M.F. (2008). The Autistic Neuron: Troubled Translation? *Cell* *135*, 401–406.
- Kerbeshian, J., Burd, L., and Fisher, W. (1987). Lithium carbonate in the treatment of two patients with infantile autism and atypical bipolar symptomatology. *J. Clin. Psychopharmacol.* *7*, 401–405.
- Khelifaoui, M., Denis, C., Galen, E. van, Bock, F. de, Schmitt, A., Houbron, C., Morice, E., Giros, B., Ramakers, G., Fagni, L., et al. (2007). Loss of X-Linked Mental Retardation Gene Oligophrenin1 in Mice Impairs Spatial Memory and Leads to Ventricular Enlargement and Dendritic Spine Immaturity. *J. Neurosci.* *27*, 9439–9450.

- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, D.-S., Lee, J.S., Leem, J.W., Huh, Y.J., Kim, J.Y., Kim, H.-S., Park, I.-H., Daley, G.Q., Hwang, D.-Y., and Kim, D.-W. (2010a). Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev.* 6, 270–281.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M., Ji, H., Ehrlich, L., et al. (2010b). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290.
- Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Hongguang, H., Loh, Y.-H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011a). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1117–1119.
- Kim, K.-Y., Hysolli, E., and Park, I.-H. (2011b). Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14169–14174.
- Kim, S.-M., Choi, K.Y., Cho, I.H., Rhy, J.H., Kim, S.H., Park, C.-S., Kim, E., and Song, W.K. (2009b). Regulation of dendritic spine morphology by SPIN90, a novel Shank binding partner. *J. Neurochem.* 109, 1106–1117.
- King, M., and Bearman, P. (2009). Diagnostic change and the increased prevalence of autism. *Int. J. Epidemiol.* 38, 1224–1234.
- King, B.H., Wright, D.M., Handen, B.L., Sikich, L., Zimmerman, A.W., McMahon, W., Cantwell, E., Davanzo, P.A., Dourish, C.T., Dykens, E.M., et al. (2001). Double-blind, placebo-controlled study of amantadine hydrochloride in the treatment of children with autistic disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 40, 658–665.
- King, B.H., Hollander, E., Sikich, L., McCracken, J.T., Scahill, L., Bregman, J.D., Donnelly, C.L., Anagnostou, E., Dukes, K., Sullivan, L., et al. (2009). Lack of efficacy of citalopram in children with autism spectrum disorders and high levels of repetitive behavior: citalopram ineffective in children with autism. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 583–590.
- King, M., Pardo, M., Cheng, Y., Downey, K., Jope, R., and Beurel, E. (2014). Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments. *Pharmacol. Ther.* 141, 1–12.
- Kirshenbaum, G., Chmura, M., and Rhone, D.P. (1988). Long arm deletion of chromosome 22. *J. Med. Genet.* 25, 780.
- Klemm, U., Müller-Esterl, W., and Engel, W. (1991). Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum. Genet.* 87, 635–641.
- Kolevzon, A., Bush, L., Wang, A.T., Halpern, D., Frank, Y., Grodberg, D., Rapaport, R., Tavassoli, T., Chaplin, W., Soorya, L., et al. (2014). A pilot controlled trial of insulin-like growth factor-1 in children with Phelan-McDermid syndrome. *Mol. Autism* 5.
- Kong, A., Frigge, M.L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., et al. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471–475.
- Kotagal, S., and Broomall, E. (2012). Sleep in children with autism spectrum disorder. *Pediatr. Neurol.* 47, 242–251.
- Kouser, M., Speed, H.E., Dewey, C.M., Reimers, J.M., Widman, A.J., Gupta, N., Liu, S., Jaramillo, T.C., Bangash, M., Xiao, B., et al. (2013). Loss of Predominant Shank3 Isoforms Results in Hippocampus-Dependent Impairments in Behavior and Synaptic Transmission. *J. Neurosci.* 33, 18448–18468.
- Kramer, M., Backhaus, O., Rosenstiel, P., Horn, D., Klopocki, E., Birkenmeier, G., Schreiber, S., Platzer, M., Hampe, J., and Huse, K. (2010). Analysis of relative gene dosage and expression differences of the paralogs RABL2A and RABL2B by Pyrosequencing. *Gene* 455, 1–7.
- Krecic, A.M., and Swanson, M.S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 363–371.
- Kuriu, T., Inoue, A., Bito, H., Sobue, K., and Okabe, S. (2006). Differential Control of Postsynaptic Density Scaffolds via Actin-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Neurosci.* 26, 7693–7706.
- Kwon, C.-H., Luikart, B.W., Powell, C.M., Zhou, J., Matheny, S.A., Zhang, W., Li, Y., Baker, S.J., and Parada, L.F. (2006). Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* 50, 377–388.

- Kwon, H.-B., Kozorovitskiy, Y., Oh, W.-J., Peixoto, R.T., Akhtar, N., Saulnier, J.L., Gu, C., and Sabatini, B.L. (2012). Neuroligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat. Neurosci.* *15*, 1667–1674.
- Lainhart, J.E., Bigler, E.D., Bocian, M., Coon, H., Dinh, E., Dawson, G., Deutsch, C.K., Dunn, M., Estes, A., Tager-Flusberg, H., et al. (2006). Head circumference and height in autism: a study by the Collaborative Program of Excellence in Autism. *Am. J. Med. Genet. A.* *140*, 2257–2274.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* *501*.
- Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M.-P., Raynaud, M., Ronce, N., Lecomte, E., Calvas, P., et al. (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am. J. Hum. Genet.* *74*, 552–557.
- Leblond, C.S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., Huguet, G., Konyukh, M., Chaste, P., Ey, E., Rastam, M., et al. (2012). Genetic and Functional Analyses of SHANK2 Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genet.* *8*.
- Leblond, C.S., Nava, C., Polge, A., Gauthier, J., Huguet, G., Lumbroso, S., Giuliano, F., Stordeur, C., Depienne, C., Mouzat, K., et al. (2014). Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments. *PLoS Genet.* *10*.
- Leboyer, M., Philippe, A., Bouvard, M., Guilloud-Bataille, M., Bondoux, D., Tabuteau, F., Feingold, J., Mouren-Simeoni, M.C., and Launay, J.M. (1999). Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biol. Psychiatry* *45*, 158–163.
- Lee, H., Shamy, G.A., Elkabetz, Y., Schofield, C.M., Harrision, N.L., Panagiotakos, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 1931–1939.
- Lee, J., Chung, C., Ha, S., Lee, D., Kim, D.-Y., Kim, H., and Kim, E. (2015). Shank3-mutant mice lacking exon 9 show altered excitation/inhibition balance, enhanced rearing, and spatial memory deficit. *Front. Cell. Neurosci.* *9*.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1364–1366.
- Lecomte, E., Degrez, C., Phelep, M., Tyzio, R., Josse, F., Grandgeorge, M., Hadjikhani, N., and Ben-Ari, Y. (2012). A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. *Transl. Psychiatry* *2*, e202.
- Lennertz, L., Wagner, M., Wölwer, W., Schuhmacher, A., Frommann, I., Berning, J., Schulze-Rauschenbach, S., Landsberg, M.W., Steinbrecher, A., Alexander, M., et al. (2012). A promoter variant of SHANK1 affects auditory working memory in schizophrenia patients and in subjects clinically at risk for psychosis. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* *262*, 117–124.
- Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 481–495.
- Levinson, J.N., and El-Husseini, A. (2005). Building Excitatory and Inhibitory Synapses: Balancing Neuroligin Partnerships. *Neuron* *48*, 171–174.
- Levy, D., Ronemus, M., Yamrom, B., Lee, Y., Leotta, A., Kendall, J., Marks, S., Lakshmi, B., Pai, D., Ye, K., et al. (2011). Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron* *70*, 886–897.
- Leyfer, O.T., Folstein, S.E., Bacalman, S., Davis, N.O., Dinh, E., Morgan, J., Tager-Flusberg, H., and Lainhart, J.E. (2006). Comorbid psychiatric disorders in children with autism: interview development and rates of disorders. *J. Autism Dev. Disord.* *36*, 849–861.
- Li, Y., Wang, H., Muffat, J., Cheng, A.W., Orlando, D.A., Lovén, J., Kwok, S., Feldman, D.A., Bateup, H.S., Gao, Q., et al. (2013). Global transcriptional and translational repression in human embryonic stem cells-derived Rett Syndrome neurons. *Cell Stem Cell* *13*, 446–458.
- Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J.I., Suh, P.G., Sheng, M., and Kim, E. (1999). Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J. Biol. Chem.* *274*, 29510–29518.
- Lim, S., Sala, C., Yoon, J., Park, S., Kuroda, S., Sheng, M., and Kim, E. (2001). Sharnin, a Novel Postsynaptic Density Protein That Directly Interacts with the Shank Family of Proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* *17*, 385–397.

- Van Lint, C., Emiliani, S., and Verdin, E. (1996). The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* *5*, 245–253.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y., Hawkins, R., Nery, J., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* *471*, 68–73.
- Liu, J., Kościelska, K.A., Cao, Z., Hulsizer, S., Grace, N., Mitchell, G., Nacey, C., Githinji, J., McGee, J., Garcia-Arocena, D., et al. (2012). Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 3795–3805.
- Liu, Z.-H., Chuang, D.-M., and Smith, C.B. (2011). Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* *14*, 618–630.
- Lord, C., Rutter, M., Goode, S., Heemsbergen, J., Jordan, H., Mawhood, L., and Schopler, E. (1989). Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J. Autism Dev. Disord.* *19*, 185–212.
- Lord, C., Rutter, M., and Le Couteur, A. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* *24*, 659–685.
- Lotter, V. (1966). Epidemiology of autistic conditions in young children. *Soc. Psychiatry* *1*, 124–135.
- Lu, J., Helton, T.D., Blanpied, T.A., Rácz, B., Newpher, T.M., Weinberg, R.J., and Ehlers, M.D. (2007). Postsynaptic Positioning of Endocytic Zones and AMPA Receptor Cycling by Physical Coupling of Dynamin-3 to Homer. *Neuron* *55*, 874–889.
- Luciani, J., de Mas, P., Depetris, D., Mignon-Ravix, C., Bottani, A., Prieur, M., Jonveaux, P., Philippe, A., Bourrouillou, G., de Martinville, B., et al. (2003). Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. *J. Med. Genet.* *40*, 690–696.
- Luikart, B.W., Schnell, E., Washburn, E.K., Bensen, A.L., Tovar, K.R., and Westbrook, G.L. (2011). Pten Knockdown In Vivo Increases Excitatory Drive onto Dentate Granule Cells. *J. Neurosci.* *31*, 4345–4354.
- Lüscher, C., and Malenka, R.C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.
- Ma, W., Tavakoli, T., Derby, E., Serebryakova, Y., Rao, M.S., and Mattson, M.P. (2008). Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Dev. Biol.* *8*, 90.
- Malo, N., Hanley, J.A., Cerquozzi, S., Pelletier, J., and Nadon, R. (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat. Biotechnol.* *24*, 167–175.
- Malone, R.P., Delaney, M.A., Hyman, S.B., and Cater, J.R. (2007). Ziprasidone in adolescents with autism: an open-label pilot study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *17*, 779–790.
- Malow, B., Adkins, K.W., McGrew, S.G., Wang, L., Goldman, S.E., Fawkes, D., and Burnette, C. (2012). Melatonin for sleep in children with autism: a controlled trial examining dose, tolerability, and outcomes. *J. Autism Dev. Disord.* *42*, 1729–1737; author reply 1738.
- Man, H.-Y., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M., and Wang, Y.T. (2000). Regulation of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission by Clathrin-Dependent Receptor Internalization. *Neuron* *25*, 649–662.
- Marchetto, M.C.N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett Syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* *143*, 527–539.
- Marcus, R.N., Owen, R., Kamen, L., Manos, G., McQuade, R.D., Carson, W.H., and Aman, M.G. (2009). A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescents with irritability associated with autistic disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *48*, 1110–1119.
- Marcus, R.N., Owen, R., Manos, G., Mankoski, R., Kamen, L., McQuade, R.D., Carson, W.H., Corey-Lisle, P.K., and Aman, M.G. (2011a). Aripiprazole in the treatment of irritability in pediatric patients (aged 6-17 years) with autistic disorder: results from a 52-week, open-label study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *21*, 229–236.
- Marcus, R.N., Owen, R., Manos, G., Mankoski, R., Kamen, L., McQuade, R.D., Carson, W.H., and Findling, R.L. (2011b). Safety and tolerability of aripiprazole for irritability in pediatric patients with autistic disorder: a 52-week, open-label, multicenter study. *J. Clin. Psychiatry* *72*, 1270–1276.

- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 7634–7638.
- Di Martino, A., Melis, G., Cianchetti, C., and Zuddas, A. (2004). Methylphenidate for pervasive developmental disorders: safety and efficacy of acute single dose test and ongoing therapy: an open-pilot study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *14*, 207–218.
- Matson, J.L., and Neal, D. (2010). Differentiating communication disorders and autism in children. *Res. Autism Spectr. Disord.* *4*, 626–632.
- Maunakea, A.K., Nagarajan, R.P., Bilenky, M., Ballinger, T.J., D'Souza, C., Fouse, S.D., Johnson, B.E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., et al. (2010). Conserved Role of Intragenic DNA Methylation in Regulating Alternative Promoters. *Nature* *466*, 253–257.
- McCracken, J.T., McGough, J., Shah, B., Cronin, P., Hong, D., Aman, M.G., Arnold, L.E., Lindsay, R., Nash, P., Hollway, J., et al., Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network (2002). Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. *N. Engl. J. Med.* *347*, 314–321.
- McDougle, C.J., Naylor, S.T., Cohen, D.J., Volkmar, F.R., Heninger, G.R., and Price, L.H. (1996). A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* *53*, 1001–1008.
- McDougle, C.J., Scahill, L., Aman, M.G., McCracken, J.T., Tierney, E., Davies, M., Arnold, L.E., Posey, D.J., Martin, A., Ghuman, J.K., et al. (2005). Risperidone for the core symptom domains of autism: results from the study by the autism network of the research units on pediatric psychopharmacology. *Am. J. Psychiatry* *162*, 1142–1148.
- McNeish, J., Roach, M., Hambor, J., Mather, R.J., Weibley, L., Lazzaro, J., Gazard, J., Schwarz, J., Volkman, R., Machacek, D., et al. (2010). High-throughput screening in embryonic stem cell-derived neurons identifies potentiators of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate-type glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* *285*, 17209–17217.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G., and Moulinoux, J.P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem. FEBS* *243*, 527–536.
- Melke, J., Goubran Botros, H., Chaste, P., Betancur, C., Nygren, G., Anckarsäter, H., Rastam, M., Ståhlberg, O., Gillberg, I.C., Delorme, R., et al. (2008). Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry* *13*, 90–98.
- Ménard, C., Valastro, B., Martel, M.-A., Chartier, E., Marineau, A., Baudry, M., and Massicotte, G. (2005). AMPA receptor phosphorylation is selectively regulated by constitutive phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase activities. *Hippocampus* *15*, 370–380.
- Mesibov, G.B., and Shea, V. (2010). The TEACCH program in the era of evidence-based practice. *J. Autism Dev. Disord.* *40*, 570–579.
- Meyer, G., Varoqueaux, F., Neeb, A., Oschlies, M., and Brose, N. (2004). The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology* *47*, 724–733.
- Michalon, A., Sidorov, M., Ballard, T.M., Ozmen, L., Spooren, W., Wettstein, J.G., Jaeschke, G., Bear, M.F., and Lindemann, L. (2012). Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron* *74*, 49–56.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* *454*, 49–55.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., et al. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* *29*, 143–148.
- Misceo, D., Rødningen, O.K., Barøy, T., Sorte, H., Mellembakken, J.R., Strømme, P., Fannemel, M., and Frengen, E. (2011). A translocation between Xq21.33 and 22q13.33 causes an intragenic SHANK3 deletion in a woman with Phelan-McDermid syndrome and hypergonadotropic hypogonadism. *Am. J. Med. Genet. A.* *155A*, 403–408.
- Missler, M., Südhof, T.C., and Biederer, T. (2012). Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a005694.
- Moessner, R., Marshall, C.R., Sutcliffe, J.S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B., Roberts, W., Szatmari, P., et al. (2007). Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 1289–1297.

- Mohammadi, M.-R., Yadegari, N., Hassanzadeh, E., Farokhnia, M., Yekehtaz, H., Mirshafiee, O., and Akhondzadeh, S. (2013). Double-blind, placebo-controlled trial of risperidone plus amantadine in children with autism: a 10-week randomized study. *Clin. Neuropharmacol.* *36*, 179–184.
- Morabito, M.A., Sheng, M., and Tsai, L.-H. (2004). Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylates the N-Terminal Domain of the Postsynaptic Density Protein PSD-95 in Neurons. *J. Neurosci.* *24*, 865–876.
- Mouridsen, S.E., Rich, B., and Isager, T. (1999). Epilepsy in disintegrative psychosis and infantile autism: a long-term validation study. *Dev. Med. Child Neurol.* *41*, 110–114.
- Mouridsen, S.E., Rich, B., and Isager, T. (2011). A longitudinal study of epilepsy and other central nervous system diseases in individuals with and without a history of infantile autism. *Brain Dev.* *33*, 361–366.
- Muddashetty, R.S., Kelić, S., Gross, C., Xu, M., and Bassell, G.J. (2007). Dysregulated Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Translation of AMPA Receptor and Postsynaptic Density-95 mRNAs at Synapses in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *J. Neurosci.* *27*, 5338–5348.
- Myers, S.M., and Johnson, C.P. (2007). Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* *120*, 1162–1182.
- Nageshappa, S., Carromeu, C., Trujillo, C.A., Mesci, P., Espuny-Camacho, I., Pasciuto, E., Vanderhaeghen, P., Verfaillie, C.M., Raitano, S., Kumar, A., et al. (2015). Altered neuronal network and rescue in a human MECP2 duplication model. *Mol. Psychiatry*.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtchanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F., and Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* *23*, 569–582.
- Namerow, L.B., Thomas, P., Bostic, J.Q., Prince, J., and Monuteaux, M.C. (2003). Use of citalopram in pervasive developmental disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* *24*, 104–108.
- Napoli, I., Mercaldo, V., Boyd, P.P., Eleuteri, B., Zalfa, F., De Rubeis, S., Di Marino, D., Mohr, E., Massimi, M., Falconi, M., et al. (2008). The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell* *134*, 1042–1054.
- Narahara, K., Takahashi, Y., Murakami, M., Tsuji, K., Yokoyama, Y., Murakami, R., Ninomiya, S., and Seino, Y. (1992). Terminal 22q deletion associated with a partial deficiency of arylsulphatase A. *J. Med. Genet.* *29*, 432–433.
- Neale, B.M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K.E., Sabo, A., Lin, C.-F., Stevens, C., Wang, L.-S., Makarov, V., et al. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* *485*, 242–245.
- Nesslinger, N.J., Gorski, J.L., Kurczynski, T.W., Shapira, S.K., Siegel-Bartelt, J., Dumanski, J.P., Cullen, R.F., French, B.N., and McDermid, H.E. (1994). Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of seven patients with deletions of chromosome 22q13.3. *Am. J. Hum. Genet.* *54*, 464–472.
- Neves-Pereira, M., Müller, B., Massie, D., Williams, J.H.G., O'Brien, P.C.M., Hughes, A., Shen, S.-B., Clair, D.S., and Miedzybrodzka, Z. (2009). Deregulation of EIF4E: a novel mechanism for autism. *J. Med. Genet.* *46*, 759–765.
- Newpher, T.M., and Ehlers, M.D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol.* *19*, 218–227.
- Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1999). Expression Mechanisms Underlying NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *868*, 515–525.
- Niederhofer, H., Staffen, W., and Mair, A. (2002). Galantamine may be effective in treating autistic disorder. *BMJ* *325*, 1422.
- Nowicki, S.T., Tassone, F., Ono, M.Y., Ferranti, J., Croquette, M.F., Goodlin-Jones, B., and Hagerman, R.J. (2007). The Prader-Willi phenotype of fragile X syndrome. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* *28*, 133–138.
- Odajima, J., Wills, Z.P., Ndassa, Y.M., Terunuma, M., Kretschmannova, K., Deeb, T.Z., Geng, Y., Gawrzak, S., Quadros, I.M., Newman, J., et al. (2011). Cyclin E Constrains Cdk5 Activity to Regulate Synaptic Plasticity and Memory Formation. *Dev. Cell* *21*, 655–668.
- Okamoto, P.M., Gamby, C., Wells, D., Fallon, J., and Vallee, R.B. (2001). Dynamin isoform-specific interaction with the Shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313–317.

- O’Roak, B.J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J.D., Stanaway, I.B., Phelps, I.G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., et al. (2012). Multiplex Targeted Sequencing Identifies Recurrently Mutated Genes in Autism Spectrum Disorders. *Science* *338*, 1619–1622.
- Owen, R., Sikich, L., Marcus, R.N., Corey-Lisle, P., Manos, G., McQuade, R.D., Carson, W.H., and Findling, R.L. (2009). Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescents with autistic disorder. *Pediatrics* *124*, 1533–1540.
- Ozonoff, S., Young, G.S., Carter, A., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Carver, L.J., Constantino, J.N., Dobkins, K., et al. (2011). Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics* *128*, e488–e495.
- Pappadopulos, E., Macintyre Ii, J.C., Crismon, M.L., Findling, R.L., Malone, R.P., Derivan, A., Schooler, N., Sikich, L., Greenhill, L., Schur, S.B., et al. (2003). Treatment recommendations for the use of antipsychotics for aggressive youth (TRAAAY). Part II. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *42*, 145–161.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., and Lechleiter, J.D. (2008). Chemical Calcium Indicators. *Methods San Diego Calif* *46*, 143–151.
- Parikhshak, N.N., Luo, R., Zhang, A., Won, H., Lowe, J.K., Chandran, V., Horvath, S., and Geschwind, D.H. (2013). Integrative Functional Genomic Analyses Implicate Specific Molecular Pathways and Circuits in Autism. *Cell* *155*, 1008–1021.
- Paşca, S.P., Portmann, T., Voineagu, I., Yazawa, M., Shcheglovitov, O., Paşca, A.M., Cord, B., Palmer, T.D., Chikahisa, S., Seiji, N., et al. (2011). Using iPSC cell-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy Syndrome. *Nat. Med.* *17*, 1657–1662.
- Pasini, A., D’Agati, E., Casarelli, L., and Curatolo, P. (2010). Dose-dependent effect of risperidone treatment in a case of 22q13.3 deletion syndrome. *Brain Dev.* *32*, 425–427.
- Patani, R., Compston, A., Puddifoot, C.A., Wyllie, D.J.A., Hardingham, G.E., Allen, N.D., and Chandran, S. (2009). Activin/Nodal Inhibition Alone Accelerates Highly Efficient Neural Conversion from Human Embryonic Stem Cells and Imposes a Caudal Positional Identity. *PLoS ONE* *4*, e7327.
- Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., and Tsai, L.-H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* *402*, 615–622.
- Paull, D., Sevilla, A., Zhou, H., Hahn, A.K., Kim, H., Napolitano, C., Tsankov, A., Shang, L., Krumholz, K., Jagadeesan, P., et al. (2015). Automated, high-throughput derivation, characterization and differentiation of induced pluripotent stem cells. *Nat. Methods* *12*, 885–892.
- Pearson, D.A., Santos, C.W., Aman, M.G., Arnold, L.E., Casat, C.D., Mansour, R., Lane, D.M., Loveland, K.A., Bukstein, O.G., Jerger, S.W., et al. (2013). Effects of extended release methylphenidate treatment on ratings of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and associated behavior in children with autism spectrum disorders and ADHD symptoms. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *23*, 337–351.
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J.T., Wang, W., Wells, M.F., Venkatraman, T.N., Lascola, C.D., Fu, Z., and Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* *472*, 437–442.
- Pera, M.F., Andrade, J., Houssami, S., Reubinoff, B., Trounson, A., Stanley, E.G., Oostwaard, D.W., and Mummery, C. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J. Cell Sci.* *117*, 1269–1280.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12543–12548.
- Peykov, S., Berkel, S., Schoen, M., Weiss, K., Degenhardt, F., Strohmaier, J., Weiss, B., Proepper, C., Schrat, G., Nöthen, M.M., et al. (2015). Identification and functional characterization of rare SHANK2 variants in schizophrenia. *Mol. Psychiatry*.
- Pham, E., Crews, L., Ubhi, K., Hansen, L., Adame, A., Cartier, A., Salmon, D., Galasko, D., Michael, S., Savas, J.N., et al. (2010). Progressive accumulation of amyloid- β oligomers in Alzheimer’s disease and APP transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* *277*, 3051–3067.
- Phelan, K., and McDermid, H.E. (2012). The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol. Syndromol.* *2*, 186–201.
- Phelan, M.C., Thomas, G.R., Saul, R.A., Rogers, R.C., Taylor, H.A., Wenger, D.A., and McDermid, H.E. (1992). Cytogenetic, biochemical, and molecular analyses of a 22q13 deletion. *Am. J. Med. Genet.* *43*, 872–876.
- Phelan, M.C., Rogers, R.C., Saul, R.A., Stapleton, G.A., Sweet, K., McDermid, H., Shaw, S.R., Claytor, J., Willis, J., and Kelly, D.P. (2001). 22q13 deletion syndrome. *Am. J. Med. Genet.* *101*, 91–99.

- Pick, M., Stelzer, Y., Bar-Nur, O., Mayshar, Y., Eden, A., and Benvenisty, N. (2009). Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2686–2690.
- Pinto, D., Pagnamenta, A.T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C., Abrahams, B.S., et al. (2010). Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder. *Nature* 466, 368–372.
- Pinyol, R., Haeckel, A., Ritter, A., Qualmann, B., and Kessels, M.M. (2007). Regulation of N-WASP and the Arp2/3 Complex by Abp1 Controls Neuronal Morphology. *PLoS ONE* 2.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 848–855.
- Posey, D.J., Kem, D.L., Swiezy, N.B., Sweeten, T.L., Wiegand, R.E., and McDougle, C.J. (2004). A pilot study of D-cycloserine in subjects with autistic disorder. *Am. J. Psychiatry* 161, 2115–2117.
- Prakash, A., Bharti, K., and Majeed, A.B.A. (2015). Zinc: indications in brain disorders. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 29, 131–149.
- Prange, O., Wong, T.P., Gerrow, K., Wang, Y.T., and El-Husseini, A. (2004). A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13915–13920.
- Prè, D., Nestor, M.W., Sproul, A.A., Jacob, S., Koppensteiner, P., Chinchalongporn, V., Zimmer, M., Yamamoto, A., Noggle, S.A., and Arancio, O. (2014). A Time Course Analysis of the Electrophysiological Properties of Neurons Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *PLoS ONE* 9.
- Proepper, C., Johannsen, S., Liebau, S., Dahl, J., Vaida, B., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., and Boeckers, T.M. (2007). Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *EMBO J.* 26, 1397–1409.
- Qualmann, B., Boeckers, T.M., Jeromin, M., Gundelfinger, E.D., and Kessels, M.M. (2004). Linkage of the Actin Cytoskeleton to the Postsynaptic Density via Direct Interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank Family. *J. Neurosci.* 24, 2481–2495.
- Quintana, H., Birmaher, B., Stedje, D., Lennon, S., Freed, J., Bridge, J., and Greenhill, L. (1995). Use of methylphenidate in the treatment of children with autistic disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 25, 283–294.
- Quitsch, A., Berhörster, K., Liew, C.W., Richter, D., and Kreienkamp, H.-J. (2005). Postsynaptic shank antagonizes dendrite branching induced by the leucine-rich repeat protein Densin-180. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 479–487.
- Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2007). 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem. Sci.* 32, 332–341.
- Ramoz, N., Reichert, J.G., Smith, C.J., Silverman, J.M., Bespalova, I.N., Davis, K.L., and Buxbaum, J.D. (2004). Linkage and association of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene with autism. *Am. J. Psychiatry* 161, 662–669.
- Raven, J., and Court, J. (1998). Raven manual: Section 3. The standard progressive matrices (Harcourt Assessment, Inc., San Antonio, TX).
- Raynaud, F., Janossy, A., Dahl, J., Bertaso, F., Perroy, J., Varrault, A., Vidal, M., Worley, P.F., Boeckers, T.M., Bockaert, J., et al. (2013). Shank3-Rich2 Interaction Regulates AMPA Receptor Recycling and Synaptic Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 33, 9699–9715.
- Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network (2005a). Risperidone treatment of autistic disorder: longer-term benefits and blinded discontinuation after 6 months. *Am. J. Psychiatry* 162, 1361–1369.
- Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network (2005b). Randomized, controlled, crossover trial of methylphenidate in pervasive developmental disorders with hyperactivity. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 1266–1274.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399–404.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Rezaei, V., Mohammadi, M.-R., Ghanizadeh, A., Sahraian, A., Tabrizi, M., Rezazadeh, S.-A., and Akhondzadeh, S. (2010). Double-blind, placebo-controlled trial of risperidone plus topiramate in children with autistic disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 1269–1272.

- Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* *16*, 522–529.
- Van Rijn, S., Swaab, H., Aleman, A., and Kahn, R.S. (2008). Social behavior and autism traits in a sex chromosomal disorder: Klinefelter (47XXY) syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* *38*, 1634–1641.
- Rivet, T., and Matson, J. (2011). Review of gender differences in core symptomatology in autism spectrum disorders. *Res. Autism Spectr. Disord.* *5*, 957–976.
- Robinson, E.B., Lichtenstein, P., Anckarsäter, H., Happé, F., and Ronald, A. (2013). Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5258–5262.
- Romain, D.R., Goldsmith, J., Cairney, H., Columbano-Green, L.M., Smythe, R.H., and Parfitt, R.G. (1990). Partial monosomy for chromosome 22 in a patient with del(22)(pter----q13.1::q13.33----qter). *J. Med. Genet.* *27*, 588–589.
- Romorini, S., Piccoli, G., Jiang, M., Grossano, P., Tonna, N., Passafaro, M., Zhang, M., and Sala, C. (2004). A Functional Role of Postsynaptic Density-95-Guanylate Kinase-Associated Protein Complex in Regulating Shank Assembly and Stability to Synapses. *J. Neurosci.* *24*, 9391–9404.
- Roselli, F., Hutzler, P., Wegerich, Y., Livrea, P., and Almeida, O.F.X. (2009). Disassembly of Shank and Homer Synaptic Clusters Is Driven by Soluble β -Amyloid1-40 through Divergent NMDAR-Dependent Signalling Pathways. *PLoS ONE* *4*.
- Ross, J.L., Roeltgen, D.P., Kushner, H., Zinn, A.R., Reiss, A., Bardsley, M.Z., McCauley, E., and Tartaglia, N. (2012). Behavioral and social phenotypes in boys with 47,XXY syndrome or 47,XXY Klinefelter syndrome. *Pediatrics* *129*, 769–778.
- Roulet, F.I., Lai, J.K.Y., and Foster, J.A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. Teratol.* *36*, 47–56.
- Roussignol, G., Ango, F., Romorini, S., Tu, J.C., Sala, C., Worley, P.F., Bockaert, J., and Fagni, L. (2005). Shank Expression Is Sufficient to Induce Functional Dendritic Spine Synapses in Aspiny Neurons. *J. Neurosci.* *25*, 3560–3570.
- Roy, M., Dillo, W., Emrich, H.M., and Ohlmeier, M.D. (2009). Asperger's syndrome in adulthood. *Dtsch. Ärztebl. Int.* *106*, 59–64.
- Rubenstein, J.L.R., and Merzenich, M.M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* *2*, 255–267.
- Ryan, S.D., Dolatabadi, N., Chan, S.F., Zhang, X., Akhtar, M.W., Parker, J., Soldner, F., Sunico, C.R., Nagar, S., Talantova, M., et al. (2013). Isogenic Human iPSC Parkinson's Model Shows Nitrosative Stress-Induced Dysfunction in MEF2-PGC1 α Transcription. *Cell* *155*, 1351–1364.
- Sacco, R., Militeri, R., Frolli, A., Bravaccio, C., Gritti, A., Elia, M., Curatolo, P., Manzi, B., Trillo, S., Lenti, C., et al. (2007). Clinical, morphological, and biochemical correlates of head circumference in autism. *Biol. Psychiatry* *62*, 1038–1047.
- Sala, C., Pièch, V., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G., and Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* *31*, 115–130.
- Sala, C., Roussignol, G., Meldolesi, J., and Fagni, L. (2005). Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca²⁺ homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 4587–4592.
- Salinas, P.C., and Hall, A.C. (1999). Lithium and synaptic plasticity. *Bipolar Disord.* *1*, 87–90.
- Sanders, S.J., Murtha, M.T., Gupta, A.R., Murdoch, J.D., Raubeson, M.J., Willsey, A.J., Ercan-Sencicek, A.G., DiLullo, N.M., Parikshak, N.N., Stein, J.L., et al. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* *485*, 237–241.
- Sansal, I., and Sellers, W.R. (2004). The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. *J. Clin. Oncol.* *22*, 2954–2963.
- Sato, D., Lionel, A.C., Leblond, C.S., Prasad, A., Pinto, D., Walker, S., O'Connor, I., Russell, C., Drmic, I.E., Hamdan, F.F., et al. (2012). SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 879–887.
- Sawicka, K., and Zukin, R.S. (2012). Dysregulation of mTOR Signaling in Neuropsychiatric Disorders: Therapeutic Implications. *Neuropsychopharmacology* *37*, 305–306.
- Schluth-Bolard, C., Labalme, A., Cordier, M.-P., Till, M., Nadeau, G., Tevissen, H., Lesca, G., Boutry-Kryza, N., Roussignol, S., Rocas, D., et al. (2013). Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative

- gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. *J. Med. Genet.* *50*, 144–150.
- Schmeisser, M.J., Grabrucker, A.M., Bockmann, J., and Boeckers, T.M. (2009). Synaptic Cross-talk between N-Methyl-d-aspartate Receptors and LAPSER1- β -Catenin at Excitatory Synapses. *J. Biol. Chem.* *284*, 29146–29157.
- Schmeisser, M.J., Ey, E., Wegener, S., Bockmann, J., Stempel, A.V., Kuebler, A., Janssen, A.-L., Udvardi, P.T., Shiban, E., Spilker, C., et al. (2012). Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature* *486*, 256–260.
- Schmidt, H., Kern, W., Giese, R., Hallschmid, M., and Enders, A. (2009). Intranasal insulin to improve developmental delay in children with 22q13 deletion syndrome: an exploratory clinical trial. *J. Med. Genet.* *46*, 217–222.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* *3*, 1101–1108.
- Schneider, T., and Przewlocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* *80*–89.
- Schoepp, D.D. (2001). Unveiling the Functions of Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptors in the Central Nervous System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *299*, 12–20.
- Seeburg, D.P., Feliu-Mojer, M., Gaiottino, J., Pak, D.T.S., and Sheng, M. (2008). Critical role of CDK5 and Polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity. *Neuron* *58*, 571–583.
- Serret, S., Thümmler, S., Dor, E., Vesperini, S., Santos, A., and Askenazy, F. (2015). Lithium as a rescue therapy for regression and catatonia features in two SHANK3 patients with autism spectrum disorder: case reports. *BMC Psychiatry* *15*, 107.
- Shah, K., and Lahiri, D.K. (2014). Cdk5 activity in the brain – multiple paths of regulation. *J. Cell Sci.* *127*, 2391–2400.
- Sharma, A., Hoeffler, C.A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S.M., Klann, E., and Zukin, R.S. (2010). Dysregulation of mTOR Signaling in Fragile X Syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 694–702.
- Shattuck, P.T. (2006). The contribution of diagnostic substitution to the growing administrative prevalence of autism in US special education. *Pediatrics* *117*, 1028–1037.
- Shcheglovitov, A., Shcheglovitova, O., Yazawa, M., Portmann, T., Shu, R., Sebastiano, V., Krawisz, A., Froehlich, W., Bernstein, J.A., Hallmayer, J.F., et al. (2013). SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* *503*, 267–271.
- Shea, S., Turgay, A., Carroll, A., Schulz, M., Orlik, H., Smith, I., and Dunbar, F. (2004). Risperidone in the treatment of disruptive behavioral symptoms in children with autistic and other pervasive developmental disorders. *Pediatrics* *114*, e634–e641.
- Sheng, M., and Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Shi, Y., Tae Do, J., Despons, C., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008). A Combined Chemical and Genetic Approach for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *2*, 525–528.
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P.C., and Livesey, F.J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* *15*.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., et al. (1997). Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* *17*, 7503–7522.
- Shiraishi-Yamaguchi, Y., Sato, Y., Sakai, R., Mizutani, A., Knöpfel, T., Mori, N., Mikoshiba, K., and Furuichi, T. (2009). Interaction of Cupidin/Homer2 with two actin cytoskeletal regulators, Cdc42 small GTPase and Drebrin, in dendritic spines. *BMC Neurosci.* *10*, 25.
- Siegel, M., Beresford, C.A., Bunker, M., Verdi, M., Vishnevetsky, D., Karlsson, C., Teer, O., Stedman, A., and Smith, K.A. (2014). Preliminary Investigation of Lithium for Mood Disorder Symptoms in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *24*, 399–402.
- Simeone, T.A., Sanchez, R.M., and Rho, J.M. (2004). Molecular Biology and Ontogeny of Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System. *J. Child Neurol.* *19*, 343–360.
- Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., and Baird, G. (2008). Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *47*, 921–929.

- Smith, C., Abalde-Atristain, L., He, C., Brodsky, B.R., Braunstein, E.M., Chaudhari, P., Jang, Y.-Y., Cheng, L., and Ye, Z. (2015). Efficient and Allele-Specific Genome Editing of Disease Loci in Human iPSCs. *Mol. Ther.* *23*, 570–577.
- Soltau, M., Richter, D., and Kreienkamp, H.-J. (2002). The Insulin Receptor Substrate IRSp53 Links Postsynaptic shank1 to the Small G-Protein cdc42. *Mol. Cell. Neurosci.* *21*, 575–583.
- Song, M., Mohamad, O., Chen, D., and Yu, S.P. (2013). Coordinated Development of Voltage-Gated Na⁺ and K⁺ Currents Regulates Functional Maturation of Forebrain Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* *22*, 1551–1563.
- Sovner, R., Stone, A., and Fox, C. (1996). Ring chromosome 22 and mood disorders. *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR* *40 (Pt 1)*, 82–86.
- Sparrow, S., Balla, D., and Achetti, D. (1984). Vineland Adaptive Behaviour Scales. *Am. Guid. Serv.*
- Speed, H.E., Kouser, M., Xuan, Z., Reimers, J.M., Ochoa, C.F., Gupta, N., Liu, S., and Powell, C.M. (2015). Autism-Associated Insertion Mutation (InsG) of Shank3 Exon 21 Causes Impaired Synaptic Transmission and Behavioral Deficits. *J. Neurosci.* *35*, 9648–9665.
- Spooren, W., Lindemann, L., Ghosh, A., and Santarelli, L. (2012). Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* *33*, 669–684.
- Van Spronsen, M., and Hoogenraad, C.C. (2010). Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *10*, 207–214.
- Starink, T.M., van der Veen, J.P., Arwert, F., de Waal, L.P., de Lange, G.G., Gille, J.J., and Eriksson, A.W. (1986). The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin. Genet.* *29*, 222–233.
- State, M.W., and Levitt, P. (2011). The Conundrums of Understanding Genetic Risks for Autism Spectrum Disorders. *Nat. Neurosci.* *14*, 1499–1506.
- Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietiläinen, O.P.H., Ingason, A., Steinberg, S., Fossdal, R., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Buizer-Voskamp, J.E., et al. (2008). Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* *455*, 232–236.
- Steingard, R., and Biederman, J. (1987). Lithium responsive manic-like symptoms in two individuals with autism and mental retardation. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *26*, 932–935.
- Stevens, S.A., Nash, K., Koren, G., and Rovet, J. (2013). Autism characteristics in children with fetal alcohol spectrum disorders. *Child Neuropsychol. J. Norm. Abnorm. Dev. Child. Adolesc.* *19*, 579–587.
- Stigler, K.A., Mullett, J.E., Erickson, C.A., Posey, D.J., and McDougle, C.J. (2012). Paliperidone for irritability in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychopharmacology (Berl.)* *223*, 237–245.
- Su, S.C.-C. (2013). Regulation of synaptic function and plasticity by cyclin-dependent kinase 5. Thesis. Massachusetts Institute of Technology.
- Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K., and Okabe, S. (2005). Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nat. Methods* *2*, 677–684.
- Sweeten, T.L., Posey, D.J., and McDougle, C.J. (2004). Brief report: autistic disorder in three children with cytomegalovirus infection. *J. Autism Dev. Disord.* *34*, 583–586.
- Szatmari, P., Paterson, A.D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.-Q., Vincent, J.B., Skaug, J.L., Thompson, A.P., Senman, L., et al. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.* *39*, 319–328.
- Szatmari, P., Georgiades, S., Duku, E., Zwaigenbaum, L., Goldberg, J., and Bennett, T. (2008). Alexithymia in parents of children with autism spectrum disorder. *J. Autism Dev. Disord.* *38*, 1859–1865.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *29*, 313–314.
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M.R., Hammer, R.E., Liu, X., Powell, C.M., and Südhof, T.C. (2007). A Neuroligin-3 Mutation Implicated in Autism Increases Inhibitory Synaptic Transmission in Mice. *Science* *318*, 71–76.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol. CB* *11*, 1553–1558.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi, M., Ishida, M., Saito, T., Ohshima, T., and Hisanaga, S.-I. (2014). Valproic acid downregulates Cdk5 activity via the transcription of the p35 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 678–682.
- Tang, X., Zhou, L., Wagner, A.M., Marchetto, M.C.N., Muotri, A.R., Gage, F.H., and Chen, G. (2013). Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 11, 743–757.
- Tao-Cheng, J.-H., Yang, Y., Bayer, K.U., Reese, T.S., and Dosemeci, A. (2014). NMDA-induced accumulation of Shank at the postsynaptic density is mediated by CaMKII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 808–811.
- Tavazoie, S.F., Alvarez, V.A., Ridenour, D.A., Kwiatkowski, D.J., and Sabatini, B.L. (2005). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat. Neurosci.* 8, 1727–1734.
- Telias, M., Segal, M., and Ben-Yosef, D. (2013). Neural differentiation of fragile X human embryonic stem cells reveals abnormal patterns of development despite successful neurogenesis. *Dev. Biol.* 374, 32–45.
- The United States National Institute of Health. (2015). ClinicalTrials.gov.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K. (2011). SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* 471, 633–636.
- Toni, N., Buchs, P.-A., Nikonenko, I., Bron, C.R., and Muller, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421–425.
- Toro, C., and Deakin, J.F.W. (2005). NMDA receptor subunit NRI and postsynaptic protein PSD-95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder. *Schizophr. Res.* 80, 323–330.
- Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T. (2010). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet.* 26, 363–372.
- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., et al. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23, 583–592.
- Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D.C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., et al. (2014). Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science* 343, 675–679.
- Uchino, S., and Waga, C. (2013). SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain Dev.* 35, 106–110.
- Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M., Suzuki, E., Hirasawa, T., and Kohsaka, S. (2006). Direct interaction of post-synaptic density-95/Dlg/ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. *J. Neurochem.* 97, 1203–1214.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., and Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 407–411.
- Urbano, M., Okwara, L., Manser, P., Hartmann, K., Herndon, A., and Deutsch, S.I. (2014). A Trial of D-Cycloserine to Treat Stereotypies in Older Adolescents and Young Adults With Autism Spectrum Disorder. *Clin. Neuropharmacol.* 37, 69–72.
- Urbano, M., Okwara, L., Manser, P., Hartmann, K., and Deutsch, S.I. (2015). A trial of d-cycloserine to treat the social deficit in older adolescents and young adults with autism spectrum disorders. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 27, 133–138.
- Uz, T., Dimitrijevic, N., Tueting, P., and Manev, H. (2002). 5-lipoxygenase (5LOX)-deficient mice express reduced anxiety-like behavior. *Restor. Neurol. Neurosci.* 20, 15–20.
- Verhoeven, W.M., Egger, J.I., Willemsen, M.H., de Leijer, G.J., and Kleefstra, T. (2012). Phelan-McDermid syndrome in two adult brothers: atypical bipolar disorder as its psychopathological phenotype? *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 8, 175–179.
- Verhoeven, W.M.A., Egger, J.I.M., Cohen-Snuijff, R., Kant, S.G., and de Leeuw, N. (2013). Phelan–McDermid syndrome: Clinical report of a 70-year-old woman. *Am. J. Med. Genet. A.* 161, 158–161.

- Verma, R., Mukerji, M., Grover, D., B-Rao, C., Das, S.K., Kubendran, S., Jain, S., and Brahmachari, S.K. (2005). MLC1 Gene Is Associated with Schizophrenia and Bipolar Disorder in Southern India. *Biol. Psychiatry* 58, 16–22.
- Verpelli, C., Dvoretzkova, E., Vicidomini, C., Rossi, F., Chiappalone, M., Schoen, M., Di Stefano, B., Mantegazza, R., Broccoli, V., Böckers, T.M., et al. (2011). Importance of Shank3 Protein in Regulating Metabotropic Glutamate Receptor 5 (mGluR5) Expression and Signaling at Synapses. *J. Biol. Chem.* 286, 34839–34850.
- Vorstman, J. a. S., Staal, W.G., van Daalen, E., van Engeland, H., Hochstenbach, P.F.R., and Franke, L. (2006). Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol. Psychiatry* 11, 1, 18–28.
- Vucurovic, K., Landais, E., Delahaigue, C., Eutrope, J., Schneider, A., Leroy, C., Kabbaj, H., Motte, J., Gaillard, D., Rolland, A.-C., et al. (2012). Bipolar affective disorder and early dementia onset in a male patient with SHANK3 deletion. *Eur. J. Med. Genet.* 55, 625–629.
- Waga, C., Okamoto, N., Ondo, Y., Fukumura-Kato, R., Goto, Y.-I., Kohsaka, S., and Uchino, S. (2011). Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr. Genet.* 21, 208–211.
- Wang, X., McCoy, P.A., Rodriguiz, R.M., Pan, Y., Je, H.S., Roberts, A.C., Kim, C.J., Berrios, J., Colvin, J.S., Bousquet-Moore, D., et al. (2011). Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3093–3108.
- Wang, X., Xu, Q., Bey, A.L., Lee, Y., and Jiang, Y.-H. (2014). Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice. *Mol. Autism* 5, 30.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Warren, Z., Veenstra-VanderWeele, J., Stone, W., Bruzek, J.L., Nahmias, A.S., Foss-Feig, J.H., Jerome, R.N., Krishnaswami, S., Sathé, N.A., Glasser, A.M., et al. (2011). *Therapies for Children With Autism Spectrum Disorders* (Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US)).
- Wasserman, S., Iyengar, R., Chaplin, W.F., Watner, D., Waldoks, S.E., Anagnostou, E., Soorya, L., and Hollander, E. (2006). Levetiracetam versus placebo in childhood and adolescent autism: a double-blind placebo-controlled study. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 21, 363–367.
- Watt, J.L., Olson, I.A., Johnston, A.W., Ross, H.S., Couzin, D.A., and Stephen, G.S. (1985). A familial pericentric inversion of chromosome 22 with a recombinant subject illustrating a “pure” partial monosomy syndrome. *J. Med. Genet.* 22, 283–287.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., Ma, S.Y., Chauhan, A., Chauhan, V., Bobrowicz, T.W., et al. (2010). The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 755–770.
- Wendholt, D., Spilker, C., Schmitt, A., Dolnik, A., Smalla, K.-H., Proepper, C., Bockmann, J., Sobue, K., Gundelfinger, E.D., Kreutz, M.R., et al. (2006). ProSAP-interacting Protein 1 (ProSAPiP1), a Novel Protein of the Postsynaptic Density That Links the Spine-associated Rap-Gap (SPAR) to the Scaffolding Protein ProSAP2/Shank3. *J. Biol. Chem.* 281, 13805–13816.
- Werling, D.M., and Geschwind, D.H. (2013). Understanding sex bias in autism spectrum disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4868–4869.
- Wiggins, L.D., Robins, D.L., Bakeman, R., and Adamson, L.B. (2009). Brief report: sensory abnormalities as distinguishing symptoms of autism spectrum disorders in young children. *J. Autism Dev. Disord.* 39, 1087–1091.
- Williams, C.A., Dagli, A., and Battaglia, A. (2008). Genetic disorders associated with macrocephaly. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 2023–2037.
- Williams, E.C., Zhong, X., Mohamed, A., Li, R., Liu, Y., Dong, Q., Ananiev, G.E., Mok, J.C.C., Lin, B.R., Lu, J., et al. (2014). Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2968–2980.
- Williams, J.G., Higgins, J.P.T., and Brayne, C.E.G. (2006). Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Arch. Dis. Child.* 91, 8–15.

- Willsey, A.J., Sanders, S.J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A.T., Muhle, R.A., Reilly, S.K., Lin, L., Fertuzinhos, S., Miller, J.A., et al. (2013). Coexpression Networks Implicate Human Midfetal Deep Cortical Projection Neurons in the Pathogenesis of Autism. *Cell* 155, 997–1007.
- Wilmot, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.
- Wilson, H., Wong, A., Shaw, S., Tse, W., Stapleton, G., Phelan, M., Hu, S., Marshall, J., and McDermid, H. (2003). Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J. Med. Genet.* 40, 575–584.
- Wilson, H.L., Crolla, J.A., Walker, D., Artifoni, L., Dallapiccola, B., Takano, T., Vasudevan, P., Huang, S., Maloney, V., Yobb, T., et al. (2008). Interstitial 22q13 deletions: genes other than SHANK3 have major effects on cognitive and language development. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 16, 1301–1310.
- Wing, L. (1981). Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol. Med.* 11, 115–129.
- Wing, L., and Gould, J. (1979). Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *J. Autism Dev. Disord.* 9, 11–29.
- Won, H., Lee, H.-R., Gee, H.Y., Mah, W., Kim, J.-I., Lee, J., Ha, S., Chung, C., Jung, E.S., Cho, Y.S., et al. (2012). Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature* 486, 261–265.
- Wong, A.C., Shkolny, D., Dorman, A., Willingham, D., Roe, B.A., and McDermid, H.E. (1999). Two novel human RAB genes with near identical sequence each map to a telomere-associated region: the subtelomeric region of 22q13.3 and the ancestral telomere band 2q13. *Genomics* 59, 326–334.
- Wong, C.C.Y., Meaburn, E.L., Ronald, A., Price, T.S., Jeffries, A.R., Schalkwyk, L.C., Plomin, R., and Mill, J. (2014). Methylopic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol. Psychiatry* 19, 495–503.
- World Health Organization (1992). The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. *Int Classif* 1–267.
- Wu, X., Bai, Y., Tan, T., Li, H., Xia, S., Chang, X., Zhou, Z., Zhou, W., Li, T., Wang, Y.T., et al. (2014). Lithium ameliorates autistic-like behaviors induced by neonatal isolation in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 234.
- Xu, B., Roos, J.L., Levy, S., van Rensburg, E.J., Gogos, J.A., and Karayiorgou, M. (2008). Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat. Genet.* 40, 880–885.
- Yamashita, Y., Fujimoto, C., Nakajima, E., Isagai, T., and Matsuishi, T. (2003). Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 33, 455–459.
- Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, W., Schroer, R., Skinner, C., Zeng, W., Schwartz, C.E., and Sommer, S.S. (2008). Neurexin 1 α structural variants associated with autism. *Neurosci. Lett.* 438, 368–370.
- Yang, M., Bozdagi, O., Scattoni, M.L., Wöhr, M., Rouillet, F.I., Katz, A.M., Abrams, D.N., Kalikhman, D., Simon, H., Woldeyohannes, L., et al. (2012). Reduced excitatory neurotransmission and mild autism-relevant phenotypes in adolescent Shank3 null mutant mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6525–6541.
- Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., et al. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171–178.
- Yong, Y.P., Knight, L.A., Yong, M.H., Lam, S., and Ho, L.Y. (1997). Partial monosomy for chromosome 22 in a girl with mental retardation. *Singapore Med. J.* 38, 85–86.
- Yoo, J., Bakes, J., Bradley, C., Collingridge, G.L., and Kaang, B.-K. (2014). Shank mutant mice as an animal model of autism. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369.
- Young, N.J., and Findling, R.L. (2015). An update on pharmacotherapy for autism spectrum disorder in children and adolescents. *Curr. Opin. Psychiatry* 28, 91–101.
- Young, R.C., Biggs, J.T., Ziegler, V.E., and Meyer, D.A. (1978). A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 133, 429–435.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.
- Yu, J., Chau, K.F., Vodyanik, M.A., Jiang, J., and Jiang, Y. (2011). Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PLoS One* 6, e17557.

- Yuan, P.X., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Gutkind, J.S., Manji, H.K., and Chen, G. (2001). The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J. Biol. Chem.* *276*, 31674–31683.
- Zhang, J., Sun, X., and Zhang, L. (2015). MicroRNA-7/Shank3 axis involved in schizophrenia pathogenesis. *J. Clin. Neurosci.*
- Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y., and Oldenburg, K.R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* *4*, 67–73.
- Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brüstle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1129–1133.
- Zhou, J., Blundell, J., Ogawa, S., Kwon, C.-H., Zhang, W., Sinton, C., Powell, C.M., and Parada, L.F. (2009). Pharmacological Inhibition of mTORC1 Suppresses Anatomical, Cellular, and Behavioral Abnormalities in Neural-Specific Pten Knock-Out Mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 1773–1783.
- Zhou, Y., Wei, E.-Q., Fang, S.-H., Chu, L.-S., Wang, M.-L., Zhang, W.-P., Yu, G.-L., Ye, Y.-L., Lin, S.-C., and Chen, Z. (2006). Spatio-temporal properties of 5-lipoxygenase expression and activation in the brain after focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* *79*, 1645–1656.
- Zhu, L., Wang, X., Li, X.-L., Towers, A., Cao, X., Wang, P., Bowman, R., Yang, H., Goldstein, J., Li, Y.-J., et al. (2014). Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 1563–1578.
- Ziff, E.B. (1997). Enlightening the Postsynaptic Density. *Neuron* *19*, 1163–1174.
- Zitzer, H., Hönck, H.-H., Bächner, D., Richter, D., and Kreienkamp, H.-J. (1999). Somatostatin Receptor Interacting Protein Defines a Novel Family of Multidomain Proteins Present in Human and Rodent Brain. *J. Biol. Chem.* *274*, 32997–33001.
- Zoghbi, H.Y. (2003). Postnatal Neurodevelopmental Disorders: Meeting at the Synapse? *Science* *302*, 826–830.
- Zoghbi, H.Y., and Bear, M.F. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.
- ICD - ICD-10-CM - International Classification of Diseases, Tenth Revision, Clinical Modification.

Annexes

Figure S1: SHANK3 screening assay development.

A. Quantification of SHANK3 mRNA in hESC-derived differentiating neurons using manual mRNA extraction and SYBR green detection techniques. B. Expression of SHANK3 protein in day 14 neurons. C. Mean Ct values and standard deviations of SHANK3 and PPIA detection using Duplex Taqman method evaluated in 66 technical replicates of DMSO treated neurons. Δ Ct corresponds to Ct PPIA-Ct SHANK3. D. Comparison of the sensitivity of the manual RNA extraction following by simplex SYBR green detection method with the automated RNA extraction combined with TaqMan duplex detection method using neurons transfected with control or SHANK3 specific shRNAs. Results represent mean +/- SD of 4 independent biological replicates. * p<0.001 Dunnet’s test. E. Determination of SHANK3 mRNA turn over using the mRNA synthesis inhibitor 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB). Results represent mean +/- SD of 3 independent biological replicates. * p<0.001 Dunnet’s test. Darville et al. submitted.

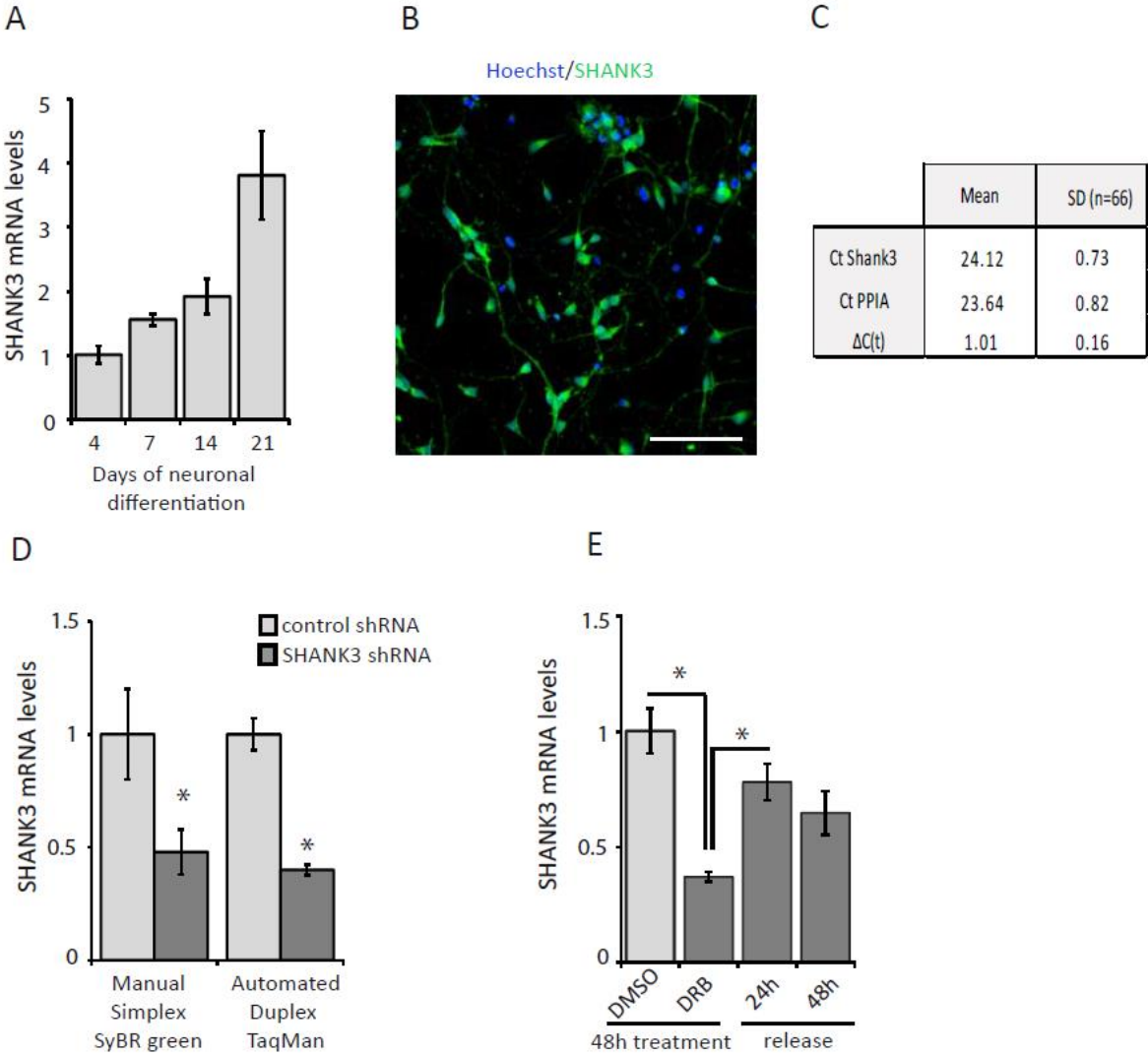


Figure S2: Concentration-response curves of the 6 chosen compounds.

Results are expressed as Fold-change compared to DMSO-treated cells and presented as mean +/- SD of 3 independent replicates. Darville et al. submitted.

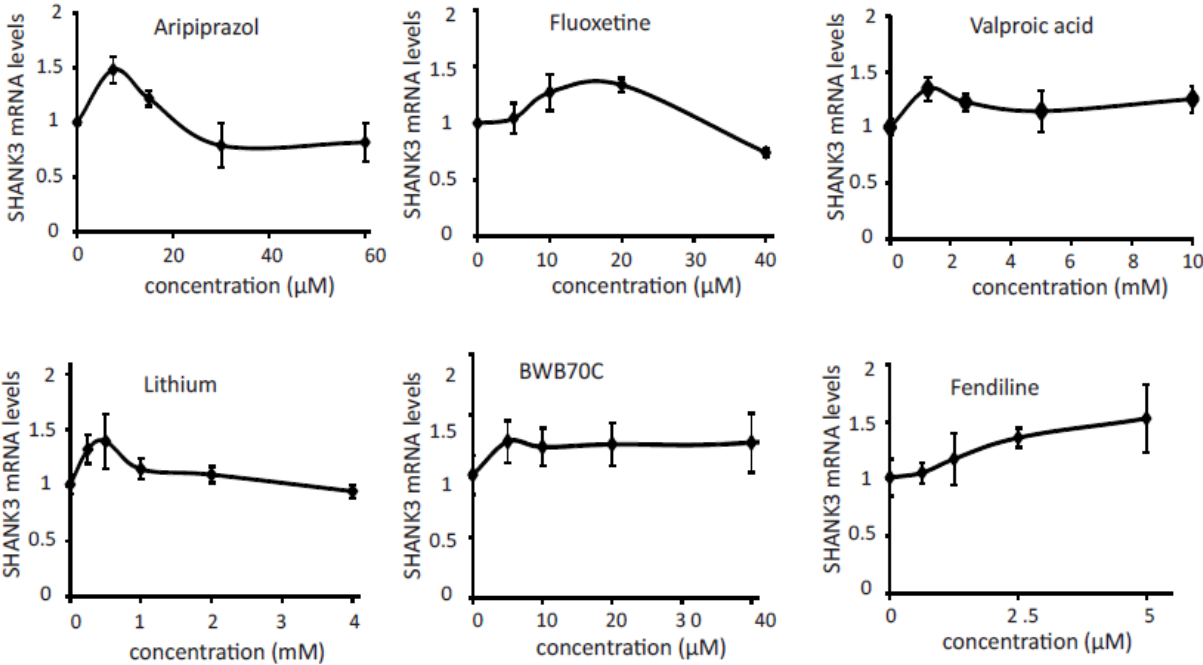


Figure S3: Expression of SHANK3 in hESC derived neurons.

Representative images of SHANK3 colocalisation with the neuritic marker Tuj-1 and the post-synaptic protein PSD-95. Scale bar = 50 μ M. Darville et al. submitted.

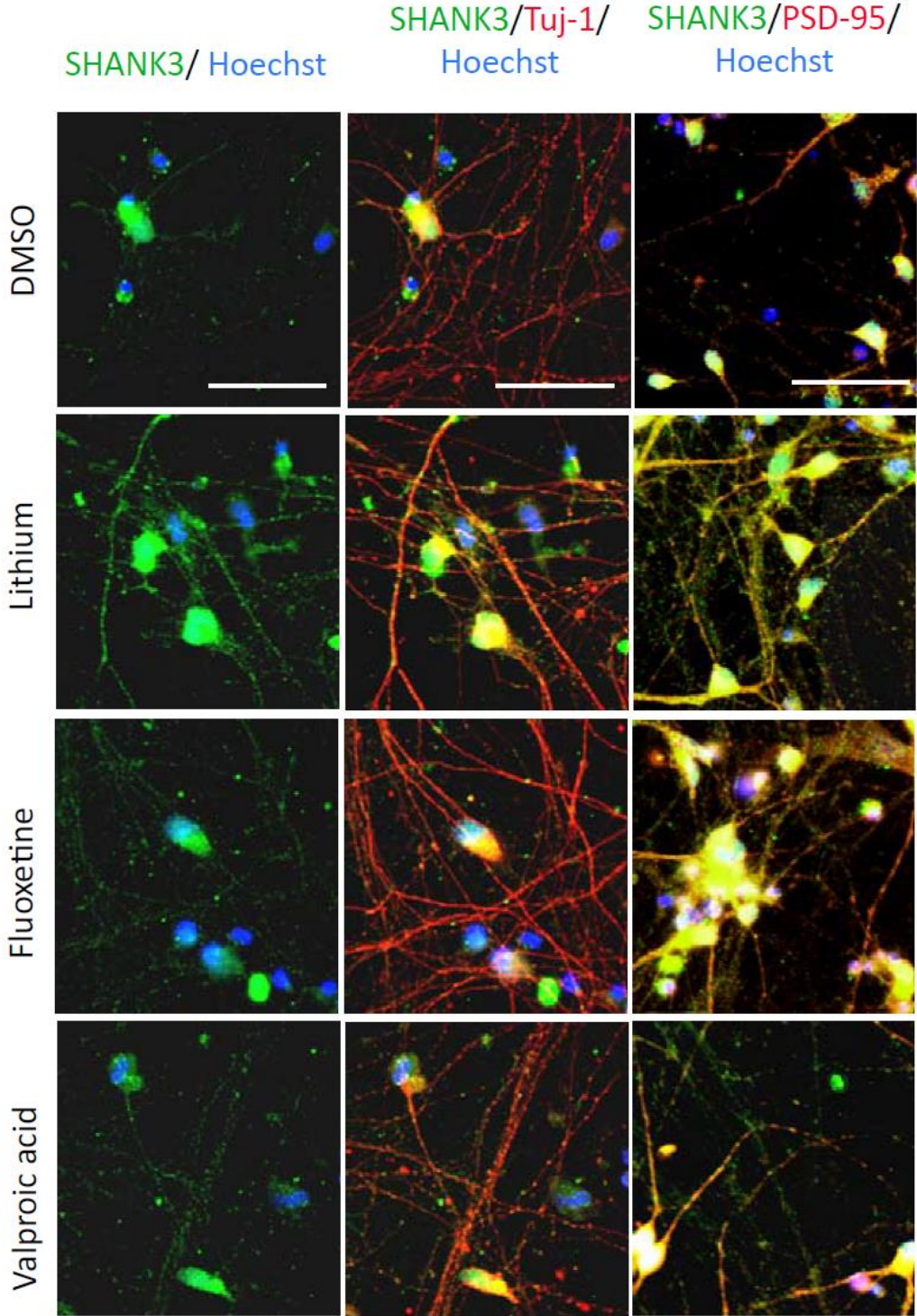
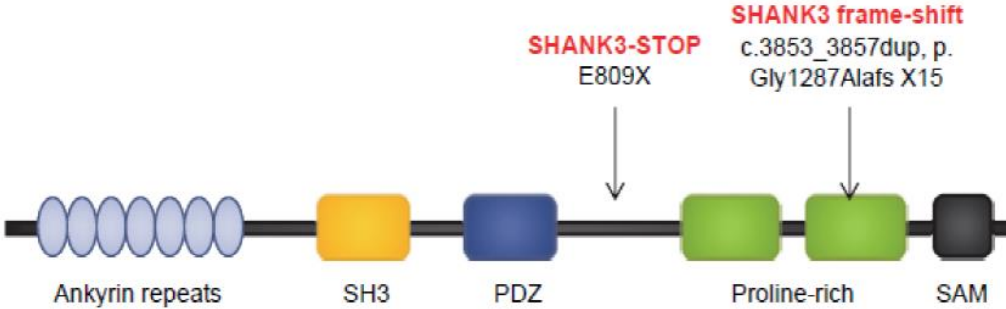


Figure S4: Modification of SHANK3 synaptic content in neurons differentiated from SHANK3 ASD individuals.

A. Schematic representation of SHANK3 protein domains and description of the two SHANK3 mutations identified in the ASD children from whom iPSC were derived. B. Immuno-fluorescence analyses indicated that both compounds significantly increased SHANK3 containing synapses number in both ASD genetic backgrounds. Darville et al. submitted.

A



B

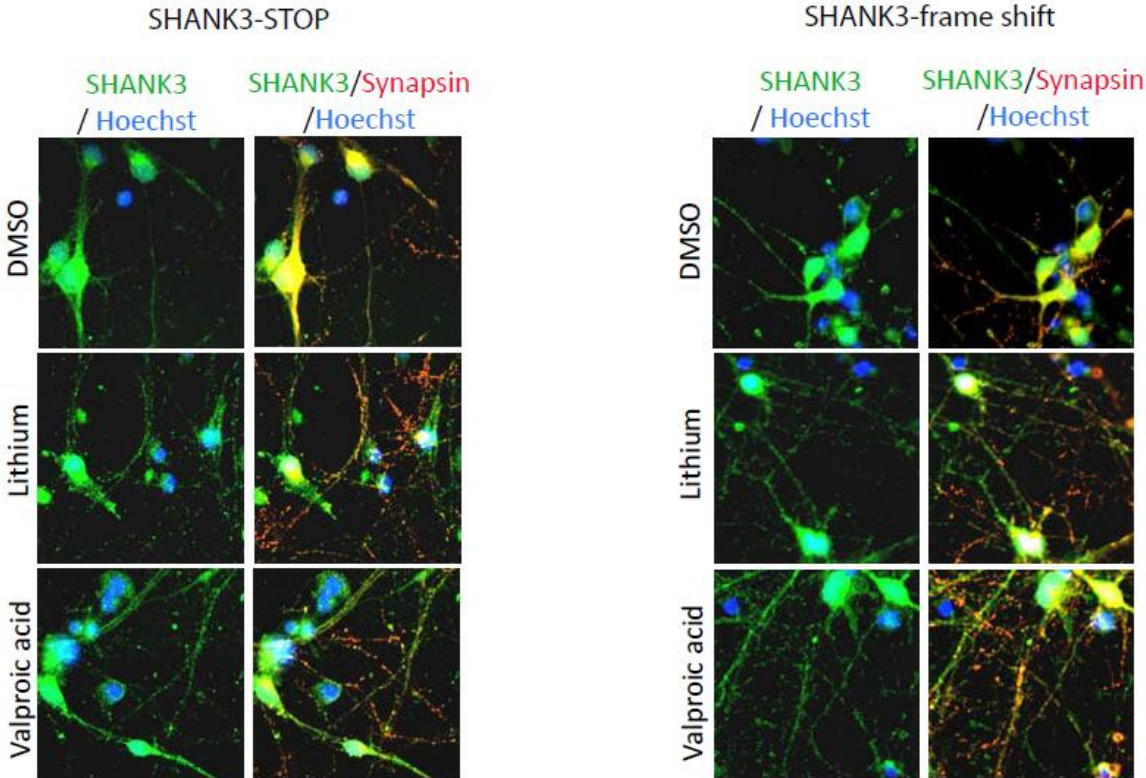


Table S1: Primary screening results

List of tested compounds and their concentration used in the primary screening as well as SHANK3 fold changes compared to DMSO treated cells. Results are provided as mean +/- SD of 4 replicates (independently treated wells). Darville et al. submitted.

Compounds	Ratio	
(+)-Bromocriptine methanesulfonate (40µM)	0,98	0,15
(+)-phenserine (2mM)	0,96	0,36
(R)-baclofen (400µM)	0,98	0,20
2,2',3,3',4,4'-HEXAHYDROXY-1,1'-BIPHENYL-6,6'-DIMETHANOL DIMETHYL ETHER (40µM)	0,82	0,14
2,4-Pyridinedicarboxylic Acid (40µM)	1,10	0,21
2-AMINOPURINE (40µM)	1,06	0,40
2-HYDROXY-5-(2,5-DIHYDROXYBENZYLAMINO)BENZOIC ACID (40µM)	1,06	0,23
5,6-DICHLORO-1-beta-D-RIBOFURANOSYLBENZIMIDAZOLE (40µM)	0,99	0,32
5-Aza-2'déoxycytidine (40µM)	1,02	0,15
5-carboxamidotryptamine (40µM)	1,31	0,13
AG-126 (40µM)	0,76	0,06
AG-1296 (40µM)	0,94	0,40
AG-370 (40µM)	1,06	0,33
AG-490 (40µM)	1,17	0,22
AG-494 (40µM)	1,07	0,08
AG-825 (40µM)	1,61	0,18
AG-879 (40µM)	0,71	0,07
AGK2 (40µM)	0,96	0,11
Allopregnanolone (2,5µM)	1,14	0,23
Aminoresveratrol sulfate (40µM)	0,80	0,06
Amitryptine (40µM)	1,02	0,22
AMPA (40 µM)	1,03	0,13
Anarcadic acid (40µM)	0,87	0,15
Apicin (40µM)	1,10	0,03
Apigenin (40µM)	1,18	0,52
Aripiprazole (40µM)	1,36	0,48
Asenapine (40µM)	1,13	0,10
Azakenpauillone (50µM)	1,06	0,17
Azasetron (Y25130) (500µM)	1,05	0,24
B2 (40µM)	0,99	0,16
Benzamil hydrochloride (40µM)	1,19	0,29
BIX-01294 (40µM)	0,87	0,11
BML-210 (40µM)	0,93	0,03
BML-257 (40µM)	1,07	0,14
BML-259 (40µM)	1,45	0,35
BML-265 (40µM)	1,62	0,19
BML-266 (40µM)	0,78	0,06
BML-278 (40µM)	1,20	0,24
BML-281 (40µM)	1,03	0,06
Bupropion (40µM)	0,83	0,10
Buspirone (2,5 mM)	1,00	0,22
Butyrolactone 3 (40µM)	1,12	0,18
BW 723C85 (40µM)	1,07	0,26
BW-B 70C (40µM)	1,37	0,19

Captopril (40mM)	1,01	0,14
Chlorpromazine (40µM)	1,35	0,20
CHPG (40 µM)	0,88	0,10
Citalopram (40µM)	1,13	0,10
CI-994 (40µM)	1,30	0,18
Clozapine (40µM)	1,07	0,07
Compound W (4mM)	1,02	0,08
CTPB (40µM)	1,15	0,30
Cyclopamine (80µM)	0,94	0,24
CyPPA (40µM)	1,07	0,13
Daidzein (40µM)	0,77	0,08
DAPT (2,5µM)	1,03	0,25
DHPG (40 µM)	1,03	0,14
Dorsomorphin (400µM)	1,49	0,38
Enalapril (4mM)	0,95	0,10
Enoximone (50µM)	1,03	0,21
Erbstatin analog (40µM)	1,69	0,54
EX-527 (40µM)	0,96	0,18
Fendiline hydrochloride (10µM)	1,81	0,75
Ferulic acid (400µg/mL)	1,06	0,09
Ferulic acid (500µg/mL)	1,36	0,40
Fluro-SAHA (40µM)	1,43	0,51
Fluoxetine (40µM)	1,34	0,29
Garcinol (40µM)	1,13	0,27
Genistein (40µM)	1,05	0,22
GF 109203X (40µM)	1,11	0,10
GW 5074 (40µM)	0,93	0,18
H-7 (40µM)	1,21	0,14
H-8 (40µM)	0,94	0,21
H-9 (40µM)	0,98	0,34
HA-1004 (40µM)	1,07	0,32
HA-1077 (40µM)	0,92	0,17
Haloperidol (240µM)	1,07	0,03
Haloperidol (40µM)	1,27	0,28
Hydroxy-2-naphthalenylmethylphosphonic acid (40µM)	1,56	0,24
Hypericin (40µM)	1,07	0,32
IGF1 (20 ng/µL)	1,00	0,15
Imipramine (40µM)	0,97	0,17
Indirubin-3'-monooxime (40µM)	1,17	0,25
Isonicotinamide (40µM)	1,08	0,11
Iso-olomoucine (40µM)	1,17	0,38
ITSA-1 (40µM)	0,87	0,11
JK 184 (80µM)	0,83	0,19
Kenpauillone (40µM)	0,82	0,13
L685 (5 µM)	0,93	0,16
Lavendustin A (40µM)	0,82	0,08
LFM-A13 (40µM)	1,30	0,09
LIF (ESGRO)	0,96	0,17
Lisinopril (2mM)	1,07	0,09
Lithium (2mM)	1,38	0,19

Lovastatin (40µM)	1,11	0,11
Loxapine (40µM)	0,88	0,13
l-quisqualic (40 µM)	1,01	0,12
LY 294002 (40µM)	1,02	0,17
LY-310,762 hydrochloride (40µM)	1,13	0,16
M-344 (40µM)	0,95	0,12
MC-1293 (40µM)	1,03	0,30
MDL 100907 (40µM)	1,02	0,17
melatonin (25 nM)	1,18	0,32
ML-7 (40µM)	1,28	0,57
ML-9 (40µM)	1,11	0,44
Moclobemide (40µM)	1,11	0,25
Mosapride (500 nM)	0,90	0,16
N9-ISOPROPYL-OLMOUCINE (40µM)	0,91	0,27
N-acetylcysteine (40mM)	1,00	0,09
NCH-51 (40µM)	0,95	0,15
N-desmethylozapine (40µM)	1,24	0,03
Neurodazine (100µM)	1,26	0,09
Neuropathiazol (400µM)	0,92	0,16
Nicotinamide (40µM)	1,07	0,23
NSC-3852 (40µM)	0,64	0,03
Nullscript (40µM)	1,00	0,03
Olanzapine (40µM)	1,19	0,31
Olomoucine (40µM)	1,53	0,63
O-phospho-DL-serine (200µg/mL)	1,10	0,08
Oxamflatin (40µM)	1,37	0,15
Palmitoyl-DL-carnitine (40µM)	1,07	0,30
PD 166865 dihydrochloride (10µM)	1,38	0,29
PD-98059 (40µM)	1,31	0,05
Phenylbutyrate.Na (40µM)	1,21	0,18
Piceatannol (40µM)	1,54	0,25
Piceatannol (40µM)	0,99	0,13
Pinacidil (5mM)	1,09	0,09
Piracetam (4mM)	0,91	0,19
PP1 (40µM)	1,15	0,30
PP2 (40µM)	1,23	0,18
Protocatechuic acid (4mM)	1,16	0,10
Provastatin (40µM)	0,88	0,14
Quercetin (40µM)	1,43	0,35
Quetiapine (40µM)	1,10	0,20
Quipazine,6-nitro,maleate (40µM)	1,02	0,16
Raclopride (40µM)	1,00	0,10
Reboxetine (40µM)	1,14	0,07
Resveratrol (40µM)	0,94	0,24
Retinoic acid (5µM)	0,98	0,11
RG-14620 (40µM)	1,21	0,27
Risperidone (40µM)	1,11	0,31
Rolipram (80µM)	0,96	0,27
Roscovitine (40µM)	1,51	0,11
Rosiglitazone (250µM)	1,15	0,14

Rottlerin (40µM)	1,23	0,21
S-33138 (40µM)	1,18	0,26
SB 258585 (40µM)	0,90	0,05
SB 399885 (40µM)	1,25	0,50
SB-202190 (40µM)	0,90	0,20
SB-203580 (40µM)	0,91	0,12
SC-514 (40µM)	0,93	0,29
Scriptaid (40µM)	1,11	0,23
Simvastatin (800µM)	1,55	0,71
Sirtinol (40µM)	1,16	0,29
SP 600125 (40µM)	0,92	0,18
Sphingosine (40µM)	0,83	0,06
Splitomicin (40µM)	1,03	0,19
SU 4312 (40µM)	1,09	0,38
SU1498 (40µM)	1,31	0,15
Suberoyl bis-hydroxamic acid (40µM)	1,11	0,19
Sumatriptan (500nM)	1,05	0,23
Suramin.6Na (40µM)	0,97	0,10
T0070907 (5nM)	0,79	0,09
Tranylcypromine hemisulfate (40µM)	1,03	0,10
Triacetylresveratrol (40µM)	0,79	0,06
Trichostatin A (40µM)	1,56	0,22
Triciribine (40µM)	1,41	0,32
Tryptamine (40µM)	1,27	0,37
TWS119 (50µM)	1,16	0,16
Tyrphostin 1 (40µM)	0,89	0,17
Tyrphostin 23 (40µM)	1,24	0,17
Tyrphostin 25 (40µM)	1,24	0,40
Tyrphostin 46 (40µM)	1,64	0,20
Tyrphostin 47 (40µM)	1,12	0,18
Tyrphostin 51 (40µM)	0,94	0,07
Tyrphostin 9 (40µM)	1,23	0,13
Tyrphostin AG 1288 (40µM)	0,91	0,11
Tyrphostin AG 1295 (40µM)	1,38	0,26
Tyrphostin AG 1478 (40µM)	1,23	0,37
U-0126 (40µM)	1,18	0,35
Valproate (80µM)	0,95	0,10
Valproic acid (2mM)	1,34	0,06
Vaproic acid hydroxamate (40µM)	0,99	0,11
Vorinostat (SAHA) (40µM)	1,78	1,01
WAY-208466 (40µM)	1,39	0,42
Wortmannin (40µM)	1,04	0,27
Xav 939 (50µM)	0,82	0,19
Y-27632 (40µM)	1,22	0,18
Zebularine (40µM)	1,33	0,26
ZM 336372 (40µM)	0,89	0,17
ZM 449829 (40µM)	0,97	0,20
α-Pinene	0,89	0,09

Table S2: List of antibodies used in this study. Darville et al. submitted.

Antibody	Host	Reference	Provider	Dilution
SHANK3	Mouse	ab93607	Abcam	1/250
PSD95	Rabbit	ab18258	Abcam	1/500
Synapsin	Rabbit	ab1543	Millipore	1/2000
Tuj1	Chicken	ab9354	Millipore	1/250

Table S3: mRNA profiling following lithium and VPA treatment

Results of fold change expression of treated cells vs DMSO for all the genes present in the two mRNA profiling assays, namely the “synaptic protein” and the “GABA Glutamate” arrays. Results are provided as mean +/- SD of 3 replicates (independently treated wells). Darville et al. submitted.

Gene Symbol	Synaptic plasticity			
	DMSO		VPA	
	Mean	SD	Mean	SD
PPP1R14A	1	1.00	10.38	4.83
PRKCG	1	0.18	9.33	1.37
MMP9	1	0.04	7.88	1.03
NTF3	1	0.20	7.21	1.82
GABRA5	1	0.04	6.62	0.70
SYNPO	1	0.10	5.25	0.34
EGR2	1	0.12	4.65	0.23
EGR1	1	0.09	4.65	0.81
NTF4	1	0.13	4.32	0.96
BDNF	1	0.05	4.12	0.07
GRM1	1	0.10	4.04	0.31
NGFR	1	0.10	3.64	0.18
NGF	1	0.14	3.34	0.43
KLF10	1	0.10	2.79	0.14
EGR3	1	0.13	2.74	0.32
INHBA	1	0.12	2.73	0.29
GRIN2C	1	0.24	2.70	0.18
ARC	1	0.04	2.66	0.48
TNF	1	1.33	2.52	2.33
JUNB	1	0.06	2.50	0.18
CEBPD	1	0.17	2.43	0.47
CREM	1	0.11	2.38	0.10
GRM8	1	0.05	2.38	0.30
IGF1	1	0.18	2.29	0.43
CEBPB	1	0.04	2.24	0.18
B2M	1	0.03	2.21	0.47
EGR4	1	0.40	2.13	1.33
GRIA3	1	0.03	2.05	0.03
PRKCA	1	0.02	2.00	0.11
PLAT	1	0.03	2.00	0.14
ADCY1	1	0.07	1.98	0.11
PIM1	1	0.03	1.92	0.13
GRM7	1	0.001	1.91	0.18
JUN	1	0.006	1.90	0.08
NPTX2	1	0.07	1.88	0.05
GRIN2B	1	0.05	1.77	0.08
CAMK2G	1	0.15	1.76	0.28
PPP1CC	1	0.005	1.76	0.18
CAMK2A	1	0.04	1.74	0.09
KIF17	1	0.02	1.72	0.18
PCDH8	1	0.06	1.71	0.06
GRIN2A	1	0.05	1.69	0.10

Gene Symbol	Synaptic plasticity			
	DMSO		VPA	
	Mean	SD	Mean	SD
MAPK1	1	0.02	1.66	0.03
GRM5	1	0.05	1.64	0.11
GNAI1	1	0.006	1.59	0.01
NFKBIB	1	0.02	1.58	0.21
RAB3A	1	0.05	1.58	0.06
PPP3CA	1	0.08	1.57	0.05
AKT1	1	0.02	1.55	0.10
GRM3	1	0.16	1.55	0.21
RGS2	1	0.05	1.55	0.19
RHEB	1	0.03	1.51	0.24
HOMER1	1	0.08	1.50	0.14
GRIA1	1	0.007	1.48	0.05
CDH2	1	0.03	1.42	0.03
CREB1	1	0.05	1.41	0.08
NR4A1	1	0.03	1.39	0.07
RELA	1	0.02	1.39	0.04
ADCY8	1	0.07	1.37	0.05
GAPDH	1	0.05	1.37	0.16
HPRT1	1	0.03	1.36	0.13
GRIA2	1	0.07	1.31	0.08
PPP2CA	1	0.023	1.30	0.02
ADAM10	1	0.023	1.29	0.86
CNR1	1	0.05	1.28	0.07
DLG4	1	0.01	1.27	0.04
RPLP0	1	0.09	1.27	0.22
NCAM1	1	0.03	1.25	0.003
GRIP1	1	0.01	1.24	0.03
EPHB2	1	0.02	1.22	0.06
RELN	1	0.05	1.22	0.06
YWHAQ	1	0.06	1.21	0.05
PPP1CA	1	0.05	1.20	0.06
PLCG1	1	0.04	1.17	0.02
SRF	1	0.03	1.15	0.06
PRKG1	1	0.03	1.14	0.08
NTRK2	1	0.08	1.08	0.03
GRIA4	1	0.03	1.05	0.005
GRM2	1	0.04	1.03	0.12
NOS1	1	0.30	1.00	0.11
ACTB	1	0	1	0
GRM4	1	0.04	0.96	0.03
NFKB1	1	0.06	0.96	0.05
GRIN2D	1	0.02	0.95	0.03
TIMP1	1	0.02	0.90	0.15
FOS	1	0.05	0.81	0.05
PICK1	1	0.08	0.81	0.02
SIRT1	1	0.01	0.70	0.08

GABA/Glutamate system				
Gene Symbol	DMSO		VPA	
	Mean	SD	Mean	SD
GABRD	1	1.330	33.897	8.158
SLC17A7	1	0.124	13.319	1.298
GABRA4	1	0.582	11.944	0.60
GABRE	1	0.232	8.901	0.240
GABRG1	1	0.342	4.842	0.840
GRM1	1	0.127	4.657	0.343
SLC6A12	1	0.212	4.415	0.434
GABRQ	1	0.161	4.338	0.455
ITPR1	1	0.131	3.790	0.203
GABRA5	1	0.020	3.707	0.398
GABRA1	1	0.355	3.638	1.105
P2RX7	1	0.335	3.346	0.223
SNCA	1	0.011	3.076	0.338
SLC17A8	1	0.050	2.695	0.141
IL1B	1	0.294	2.438	2.441
B2M	1	0.041	2.374	0.558
GRM8	1	0.154	2.316	0.137
SLC6A1	1	0.030	2.234	0.114
GABRG3	1	0.065	2.152	0.115
SLC7A11	1	0.080	2.011	0.142
BDNF	1	0.000	1.994	0.277
ADORA2A	1	0.063	1.994	0.052
ADCY7	1	0.033	1.993	0.172
GRM7	1	0.096	1.988	0.173
GRIK4	1	0.006	1.935	0.189
GRM3	1	0.254	1.843	0.213
CACNA1A	1	0.039	1.820	0.146
GRIN2C	1	0.248	1.817	0.284
GRIA3	1	0.040	1.799	0.059
PLCB1	1	0.029	1.776	0.103
GABRB1	1	0.082	1.762	0.217
GABRG2	1	0.067	1.748	0.086
HOMER2	1	0.039	1.745	0.037
ADORA1	1	0.034	1.717	0.069
GRIK1	1	0.127	1.692	0.161
CACNA1B	1	0.028	1.664	0.061
GABRR2	1	0.154	1.645	0.739
GRIN2A	1	0.062	1.624	0.067
GRIN2B	1	0.067	1.601	0.133
GLS	1	0.045	1.586	0.036
NSF	1	0.051	1.577	0.078
GPHN	1	0.055	1.564	0.104
GRIA4	1	0.041	1.557	0.129

Gene Symbol	GABA/Glutamate system			
	DMSO		VPA	
	Mean	SD	Mean	SD
SLC1A2	1	0.068	1.541	0.098
GNAI1	1	0.021	1.538	0.027
SRR	1	0.045	1.534	0.191
SLC1A6	1	0.052	1.502	0.182
GABRA2	1	0.093	1.486	0.123
GRIA2	1	0.022	1.470	0.217
GRIN1	1	0.038	1.464	0.044
GABRB3	1	0.050	1.454	0.100
HPRT1	1	0.039	1.439	0.151
GAD1	1	0.052	1.436	0.040
MAPK1	1	0.032	1.414	0.048
APP	1	0.024	1.376	0.090
SLC1A3	1	0.065	1.362	0.123
PHGDH	1	0.114	1.362	0.295
AVP	1	0.666	1.337	0.891
HOMER1	1	0.075	1.287	0.225
GABBR2	1	0.086	1.279	0.113
GRIA1	1	0.032	1.268	0.050
GABBR1	1	0.045	1.259	0.172
GRM5	1	0.072	1.256	0.051
RPLP0	1	0.118	1.237	0.274
GAPDH	1	0.061	1.230	0.209
SLC1A1	1	0.025	1.211	0.051
GLUL	1	0.036	1.207	0.063
SLC38A1	1	0.017	1.179	0.053
SLC6A11	1	0.019	1.151	0.030
SLC17A6	1	0.021	1.149	0.117
PRODH	1	0.033	1.141	0.128
DLG4	1	0.046	1.139	0.044
GRIK2	1	0.023	1.121	0.306
ABAT	1	0.020	1.085	0.035
SLC6A13	1	0.063	1.079	0.195
PLA2G6	1	0.025	1.078	0.150
SLC32A1	1	0.016	1.030	0.043
ACTB	1	0	1	0
GRM4	1	0.044	0.989	0.097
GABRA6	1	0.172	0.988	0.302
GNAQ	1	0.058	0.980	0.098
GABRR1	1	0.061	0.950	0.235
CLN3	1	0.072	0.942	0.166
SHANK2	1	0.055	0.890	0.018
GRM2	1	0.056	0.881	0.010
GRM6	1	0.127	0.871	0.251
ALDH5A1	1	0.0355	0.854	0.042
CDK5R1	1	0.049	0.774	0.086
GRIK5	1	0.088	0.639	0.053

Gene Symbol	Synaptic plasticity			
	DMSO		Lithium	
	Mean	SD	Mean	SD
GRIN2C	1	0.24	2.31	0.63
NTF3	1	0.20	2.22	0.38
NTF4	1	0.13	2.20	0.34
MMP9	1	0.04	1.98	0.27
TNF	1	1.33	1.98	2.64
NOS1	1	0.30	1.67	1.11
GRM3	1	0.16	1.66	0.22
PPP1R14A	1	1.00	1.52	1.38
PRKG1	1	0.03	1.40	0.06
NR4A1	1	0.03	1.39	0.06
PRKCG	1	0.18	1.36	0.07
GABRA5	1	0.04	1.32	0.19
EGR3	1	0.13	1.29	0.21
CREM	1	0.11	1.24	0.05
GRIA3	1	0.03	1.23	0.07
GAPDH	1	0.05	1.16	0.07
GRIA1	1	0.007	1.16	0.17
TIMP1	1	0.02	1.14	0.08
GRM8	1	0.05	1.14	0.18
EGR4	1	0.40	1.14	0.79
GRIN2A	1	0.05	1.13	0.05
B2M	1	0.03	1.13	0.09
GRIN2B	1	0.05	1.12	0.07
EGR1	1	0.09	1.11	0.19
GRM2	1	0.04	1.11	0.05
RPLP0	1	0.09	1.08	0.04
INHBA	1	0.12	1.07	0.09
NPTX2	1	0.07	1.06	0.14
GRIP1	1	0.01	1.05	0.10
GRIA2	1	0.07	1.04	0.12
CAMK2G	1	0.15	1.04	0.10
NFKBIB	1	0.02	1.03	0.04
PPP1CC	1	0.005	1.03	0.18
NFKB1	1	0.06	1.02	0.09
IGF1	1	0.18	1.02	0.28
GRM7	1	0.001	1.02	0.13
ARC	1	0.04	1.01	0.20
CNR1	1	0.05	1.01	0.02
GRIN1	1	0.04	1.01	0.06
NGFR	1	0.10	1.01	0.21
CEBPB	1	0.04	1.01	0.03
RELA	1	0.02	1.00	0.06
BDNF	1	0.05	1.00	0.09
SYNPO	1	0.10	1.00	0.06
RELN	1	0.05	1.00	0.16
ACTB	1	0	1	0

Gene Symbol	Synaptic plasticity			
	DMSO		Lithium	
	Mean	SD	Mean	SD
PPP1CA	1	0.05	0.99	0.07
RAB3A	1	0.05	0.99	0.07
GRM5	1	0.05	0.99	0.01
KIF17	1	0.02	0.99	0.14
PRKCA	1	0.02	0.98	0.02
CDH2	1	0.03	0.98	0.06
FOS	1	0.05	0.98	0.10
HOMER1	1	0.08	0.98	0.04
NTRK2	1	0.08	0.97	0.10
PICK1	1	0.08	0.96	0.02
CAMK2A	1	0.04	0.96	0.05
AKT1	1	0.02	0.96	0.12
DLG4	1	0.01	0.95	0.06
PLAT	1	0.03	0.95	0.06
JUNB	1	0.06	0.94	0.16
PPP2CA	1	0.02	0.94	0.08
RHEB	1	0.03	0.94	0.08
YWHAQ	1	0.06	0.94	0.13
GRM1	1	0.10	0.93	0.18
PIM1	1	0.03	0.93	0.05
SRF	1	0.03	0.93	0.07
MAPK1	1	0.02	0.93	0.09
GNAI1	1	0.006	0.92	0.13
GRIA4	1	0.03	0.92	0.06
GRIN2D	1	0.02	0.91	0.05
ADCY8	1	0.07	0.91	0.10
CREB1	1	0.05	0.91	0.10
JUN	1	0.006	0.90	0.06
PPP3CA	1	0.08	0.90	0.03
HPRT1	1	0.03	0.89	0.09
EPHB2	1	0.02	0.89	0.06
PCDH8	1	0.06	0.89	0.07
EGR2	1	0.12	0.89	0.05
ADAM10	1	0.02	0.87	0.02
RGS2	1	0.05	0.86	0.03
KLF10	1	0.10	0.85	0.15
NCAM1	1	0.03	0.84	0.05
GRM4	1	0.04	0.84	0.08
CEBPD	1	0.17	0.82	0.11
ADCY1	1	0.07	0.80	0.04
PLCG1	1	0.04	0.77	0.04
NGF	1	0.14	0.74	0.13
SIRT1	1	0.013	0.62	0.06

GABA/Glutamate system				
Gene Symbol	DMSO		Lithium	
	Mean	SD	Mean	SD
IL1B	1	0.294	2.791	0.258
P2RX7	1	0.335	2.545	0.152
AVP	1	0.666	2.106	0.173
HOMER2	1	0.039	1.945	0.015
GRM3	1	0.254	1.542	0.080
SLC6A13	1	0.063	1.521	0.209
SLC6A12	1	0.212	1.469	0.489
GABRR1	1	0.061	1.434	0.154
GRM1	1	0.127	1.401	0.160
GRM6	1	0.127	1.379	0.476
GRIK4	1	0.006	1.365	0.092
ADORA1	1	0.034	1.358	0.110
GABRA5	1	0.020	1.330	0.142
MAPK1	1	0.032	1.323	0.109
SNCA	1	0.011	1.259	0.092
GRIA4	1	0.041	1.247	0.080
GRIA2	1	0.022	1.237	0.118
GPHN	1	0.055	1.232	0.140
SLC7A11	1	0.080	1.224	0.071
GABRA6	1	0.172	1.219	0.244
GRIN2A	1	0.062	1.207	0.057
GRM7	1	0.096	1.204	0.138
SLC6A1	1	0.030	1.200	0.170
SLC17A6	1	0.021	1.195	0.100
GRIA1	1	0.032	1.173	0.074
SRR	1	0.045	1.173	0.150
SHANK2	1	0.055	1.169	0.066
ADORA2A	1	0.063	1.167	0.157
B2M	1	0.04	1.161	0.052
GAD1	1	0.052	1.160	0.113
GABBR2	1	0.086	1.156	0.102
GRIK2	1	0.023	1.138	0.069
GRIN2B	1	0.067	1.133	0.050
PHGDH	1	0.114	1.132	0.030
BDNF	1	0.000	1.128	0.168
CACNA1B	1	0.028	1.128	0.058
GABRA1	1	0.355	1.120	1.493
GRM8	1	0.154	1.114	0.227
HPRT1	1	0.039	1.114	0.117
RPLP0	1	0.118	1.108	0.040
GNAQ	1	0.058	1.104	0.189
GABBR1	1	0.045	1.103	0.024
GRIA3	1	0.040	1.099	0.036
GRIN1	1	0.038	1.097	0.066
GRIK5	1	0.088	1.085	0.028
SLC1A1	1	0.025	1.084	0.115

GABA/Glutamate system				
Gene Symbol	DMSO		Lithium	
	Mean	SD	Mean	SD
GRIK1	1	0.127	1.081	0.158
ITPR1	1	0.131	1.075	0.292
SLC6A11	1	0.019	1.068	0.040
GAPDH	1	0.061	1.065	0.066
GRM4	1	0.044	1.062	0.101
ADCY7	1	0.033	1.061	0.097
APP	1	0.024	1.057	0.006
GLUL	1	0.036	1.055	0.055
SLC1A3	1	0.065	1.051	0.064
SLC1A6	1	0.052	1.040	0.074
GRM2	1	0.056	1.039	0.091
GABRA2	1	0.093	1.033	0.047
CACNA1A	1	0.039	1.023	0.031
NSF	1	0.051	1.014	0.107
GLS	1	0.045	1.008	0.065
SLC38A1	1	0.017	1.008	0.152
HOMER1	1	0.075	1.004	0.074
ACTB	1	0	1	0
PRODH	1	0.033	0.997	0.035
GNAI1	1	0.021	0.993	0.119
GABRG3	1	0.065	0.988	0.039
DLG4	1	0.046	0.987	0.025
GABRA4	1	0.582	0.987	0.657
GABRB1	1	0.082	0.983	0.113
SLC1A2	1	0.068	0.970	0.025
CLN3	1	0.072	0.968	0.054
ABAT	1	0.020	0.964	0.066
GRM5	1	0.072	0.961	0.010
GABRB3	1	0.050	0.948	0.051
PLCB1	1	0.029	0.935	0.107
SLC32A1	1	0.016	0.922	0.100
CDK5R1	1	0.049	0.920	0.054
GABRG2	1	0.067	0.909	0.130
PLA2G6	1	0.025	0.876	0.104
SLC17A8	1	0.050	0.870	0.075
GRIN2C	1	0.248	0.852	0.175
ALDH5A1	1	0.035	0.830	0.061
GABRQ	1	0.161	0.789	0.183
GABRG1	1	0.342	0.732	0.347
SLC17A7	1	0.124	0.715	0.153
GABRR2	1	0.154	0.639	0.033
GABRE	1	0.232	0.510	0.162
GABRD	1	1.330	0.281	0.105

Table S4: Complete clinical assessment of patient AUN-003

Assessment scores obtained while exploring the patient AUN-003. SRS: Social Responsiveness Scale, ADOS: Autism Diagnosis Observational Scale, PPVT: Peabody Picture Vocabulary Test, RPM: Raven’s progressive matrices, GAS: Global Assessment Scale, Y-MRS: Young-Mania rating Scale, ADHD: Attention Deficit Hyperactive Disorder rating scale. Darville et al. submitted.

Time of assessment	Main DSM 5 Diagnosis	Main psychiatric comorbidities	Drugs	Autistic symptom Assessment				Psychiatric comorbidities		
				SRS	ADOS			ADHD-RS		YMRS
				Raw-score / T-score	Social domain	Communication domain	Social affect domain	Inattention domain	Hyperactivity-impulsivity domain	
T0	ASD	moderate ID	NA	101 / 89	14	9	23	10	0	0*
Black Arrow		start of mood deregulation								26 # *
Red Arrow		start lithium	theralite (1000mg/d)							
T1		Mania (Mixt features)	theralite (1000mg/d)	84 / 80				10	13	18
T2		ADHD	theralite (1000mg/d)	73 / 75	11	6	17	10	15	18

items concerning sexuality, insight and appearance were not included in the assessment due to the cognitive deficit of the subject.

* restrospective assesement

Time of assessment	Cognitive Assessment	
	Raven's Progressive Matrice	PPVT
	Raw-score / T-score	Raw-score / T-score
T0	9 / <70	133 / 101
T1	13 / <70	
T2	15 / <70	85 / 50

Time of assessment	Adaptative behavior Assessment							
	GAS	Vineland						
		Communication domain		Daily living skills	socialization domain		Motor skills domain	
		Raw-score	age related	age related	Raw-score	age related	Raw-score	age related
T0	30	41	1y 9m	0y 9m	28	1y	39	2y1m
T1	25	31	1y 5m	1y 5m	13	0y 4m	29	1y5m
T2	30	36	1y7m	1y 1m	16	0y10m	47	2y8m

Résumé

Objectifs : Le gène *SHANK3* code pour une protéine dite d'« échafaudage », localisée dans les synapses des neurones glutamatergiques, qui est cruciale pour une transmission synaptique efficace. Des anomalies génétiques, conduisant à la diminution de la protéine SHANK3, sont impliquées dans des formes génétiques de troubles du spectre autistique ainsi que dans la schizophrénie. Les mutations étant hétérozygotes, il est théoriquement possible d'augmenter l'expression de la protéine SHANK3 en augmentant la transcription de l'allèle sain par des traitements chimiques. L'objectif de mon travail de thèse a été de tirer avantage des propriétés des cellules souches pluripotentes humaines (*Human Pluripotent Stem Cells*, hPSC) pour produire une grande quantité de neurones humains glutamatergiques *in vitro* et de les utiliser afin d'identifier des modulateurs de la transcription du gène *SHANK3* par criblage à haut débit.

Résultats : Des neurones corticaux glutamatergiques ont été différenciés à partir d'une lignée de cellules souches embryonnaires humaines (SA001, 46 XY, Cellartis, Suède) dans des plaques 384 puits. Une technique de criblage automatisée et miniaturisée a été développée pour permettre l'extraction de leur ARNm et la quantification, par qPCR Taqman en duplex, des variations d'ARNm de SHANK3. Un criblage de 205 composés, incluant des inhibiteurs de kinase, des régulateurs épigénétiques et des médicaments repositionnables, a permis d'identifier 28 hits augmentant de plus de 30 % l'ARNm de SHANK3. Quinze ont pu être confirmés par des expériences de dose réponses sur l'ARNm de SHANK3. Des expériences d'immunofluorescence par imagerie à haut contenu ont montrées que 4 composés augmentaient également les niveaux de la protéine SHANK3 dans le réseau neuritique, incluant des inhibiteurs de la kinase cycline dépendante 5 avec la roscovitine et le lithium (régulateur d'humeur), l'antiépileptique acide valproïque et l'antipsychotique fluoxétine. Des mesures fonctionnelles de flux calcique ont validé l'effet du lithium et de l'acide valproïque sur la force synaptique glutamatergique. Enfin, le potentiel de ces composés a également été confirmé sur des neurones différenciés à partir de cellules souches induites à la pluripotence (*Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) d'individus autistes portant une mutation sur le gène *SHANK3*.

Conclusion : Cette étude démontre qu'il est possible d'identifier des voies de régulation de protéines synaptiques clés, comme SHANK3, par méthode de criblage à haut débit en utilisant des neurones humains dérivés d'hPSC, incluant des neurones représentatifs d'individus autistes. Cette nouvelle approche devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsable de l'autisme et la découverte de nouveaux composés thérapeutiques, personnalisables à des sous-groupes de sujets autistes classifiés en fonction du gène ou de la voie de signalisation à corriger plutôt qu'en fonction de leurs symptômes cliniques hétérogènes.

Mots clés : Troubles du spectre autistique, SHANK3, régulation de transcription, criblage, iPSC, hPSC, neurones corticaux glutamatergiques, lithium, acide valproïque.

Abstract

Aims: The *SHANK3* gene encodes for a scaffold protein, located in synapses of glutamatergic neurons. It plays a crucial role in controlling glutamatergic synaptic transmission. Genetic anomalies leading to a decrease in SHANK3 protein expression are implicated in genetic forms of autism spectrum disorders and schizophrenia. Mutations being heterozygous, treatments that increase SHANK3 protein through transcriptional regulation may be therapeutically useful. Here I took advantage of properties of human pluripotent stem cells (hPSC) to produce a large amount of human glutamatergic neurons *in vitro* and use them to identify *SHANK3* gene transcription modulators by a large-scale screening strategy.

Results: Cortical glutamatergic neurons were differentiated from a human embryonic stem cell line (SA001, 46 XY, Cellartis, Sweden) in 384-well plates. An automated and high-throughput screening test was developed to extract mRNA and quantify SHANK3 mRNA variations using duplex Taqman qPCR. A screening assay was conducted on 205 compounds, including kinase inhibitors, epigenetic regulators and repositionable marketed drugs, and 28 compounds successfully passed the hit selection criteria yielding SHANK3 mRNA increases of at least 30%. Fifteen compounds were confirmed by dose-response experiments on SHANK3 mRNA. Further immunofluorescence studies using high content imaging confirmed that 4 compounds increased levels of SHANK3 protein in the neuritic network. Thus, this screening identified as SHANK3 regulators, 2 Cyclin-dependent kinase 5 inhibitors the lead molecule, roscovitine and the mood regulator, lithium; the antiepileptic drug valproic acid and the antipsychotic fluoxetine. In addition, functional calcium flux experiments validated lithium and valproic acid effect on glutamatergic synaptic strength. Finally, the efficacy of compounds was also confirmed on neurons differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC) of autistic patients bearing SHANK3 mutation.

Conclusion: This study demonstrates that cellular pathways regulating a key synaptic protein, SHANK3, can be explored on a large scale using hPSC-derived neurons, including autistic individuals neurons. This approach should improve knowledge of the molecular mechanisms responsible of autism and promote the discovery of new therapeutic compounds, personalized to autistic subgroups of individuals stratified according to gene or pathway dysfunction rather than according to clinical heterogeneous symptoms.

Key words: Autism spectrum disorders, SHANK3, transcriptional regulation, screening, iPSC, hPSC, glutamatergic neurons, lithium, valproic acid.