



HAL
open science

Analyses phénotypiques in vitro et in vivo de mutations de novo tronquantes dans le gène SHANK3

Aline Vitrac

► **To cite this version:**

Aline Vitrac. Analyses phénotypiques in vitro et in vivo de mutations de novo tronquantes dans le gène SHANK3. Neurobiologie. Université Paris Cité, 2020. Français. ⟨NNT : 2020UNIP7173⟩. ⟨tel-03278102⟩

HAL Id: tel-03278102

<https://theses.hal.science/tel-03278102v1>

Submitted on 5 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université de Paris

Ecole doctorale BioSPC - ED562

Laboratoire de Génétique Humaine et Fonctions Cognitives

Aline Vitrac

**Analyses phénotypiques *in vitro* et *in vivo* de mutations *de novo*
tronquantes dans le gène *SHANK3***

Thèse de doctorat de Neurobiologie

Dirigée par Isabelle Cloëz-Tayarani

Présentée et soutenue publiquement à l'Institut Pasteur le 12 Novembre 2020

COMPOSITION DU JURY

Rapportrice : Pr Afsaneh Gaillard, PU, DR, Université de Poitiers

Rapporteur : Dr Frédéric Laumonier, CR Inserm, Université de Tours

Examineur : Dr Richard Belvindrah, MCU, Institut du Fer à Moulin

Examinatrice : Dr Cécile Martinat, DR2 Inserm, Institut des cellules souches

Directrice de thèse : Dr Isabelle Cloëz-Tayarani, CR, Institut Pasteur

Membre invité : Pr Thomas Bourgeron, PU, DR, Institut Pasteur

RÉSUMÉ

Les troubles du spectre autistique (TSA) résultent de désordres neurodéveloppementaux caractérisés par une altération des interactions sociales, la présence de comportements répétitifs et d'intérêts restreints. L'origine des TSA est multifactorielle avec une forte composante génétique et leur héritabilité est estimée à 50%. *SHANK3* est un gène synaptique majeur pour les TSA, identifié au laboratoire. Il code une protéine d'échafaudage exprimée au niveau de la densité post-synaptique des neurones glutamatergiques excitateurs, et joue un rôle crucial dans la transmission synaptique de ces neurones, la formation des synapses ainsi que dans la maturation des épines dendritiques.

Mon projet de thèse porte sur l'analyse *in vitro* et *in vivo* de l'effet de mutations *de novo* hétérozygotes au sein de *SHANK3*, identifiées chez des individus atteints de TSA sévères. L'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) obtenues à partir de ces patients, donne accès à un modèle permettant d'étudier l'effet de mutations hétérozygotes dans le contexte génétique du patient. Ce modèle offre la possibilité d'évaluer certains phénotypes à partir de neurones humains en culture ou greffés chez la souris au stade périnatal. Les TSA étant des troubles du neurodéveloppement initiés dès la période fœtale et périnatale, le modèle utilisé dans mon projet se place dans un créneau temporel tout à fait adéquat pour étudier les dysfonctionnements synaptiques liés aux mutations *SHANK3*, et suivre à des stades précoces, le développement des neurones humains.

Ainsi, le laboratoire a sélectionné 3 individus contrôles ainsi que 4 patients indépendants portant dans leur génome, des mutations *de novo* hétérozygotes tronquantes dans *SHANK3*. Les iPSC correspondantes ont été générées en collaboration avec le laboratoire I-Stem (Coll A. Benchoua), avant d'être dérivées cellules progénitrices neurales (NPC), puis différenciées en neurones corticaux glutamatergiques pyramidaux. La partie *in vitro* de ce projet a permis de mettre en évidence une diminution significative du niveau d'ARNm de *SHANK3* dans les cellules des patients, corrélée à une réduction de 50 % de la densité des épines dendritiques avec la mise en évidence de diverses modifications de leur morphologie en 3D.

Pour le projet de greffe de NPC *in vivo*, les progéniteurs neuraux d'un individu contrôle représentatif ont été transplantées seules dans les ventricules ou dans le cortex moteur de souris immunodéficientes à leur naissance afin de caractériser le développement de ces progéniteurs *in vivo* et la distribution de leurs projections axonales dans le cerveau murin adulte. La co-transplantation des NPC de l'individu contrôle et de celles d'un patient a ensuite montré une diminution de la taille des somas des neurones issus du patient, ainsi que de leurs projections axonales par rapport aux neurones de l'individu contrôle. Les épines dendritiques ne présentent pas de différences significatives aux stades précoces de développement *in vivo*.

En conclusion, l'approche *in vitro* a permis de mettre en évidence des altérations synaptiques chez les neurones des patients pouvant être reliés aux anomalies de la connectivité observée chez divers patients avec TSA. L'approche *in vivo* a fourni des données complémentaires concernant la connectivité cellulaire de ces neurones en mettant en évidence une baisse des projections axonales développées dans le cerveau murin. Le modèle iPSC humaines testé à la fois *in vitro* et *in vivo* chez la souris offre ainsi un large champ d'investigation pour décrypter les mécanismes précoces à l'origine des TSA.

Mots clés : Autisme, *SHANK3*, hiPSC, neurones excitateurs, neurodéveloppement, souris chimères, xénotransplantations, épines dendritiques

ABSTRACT

Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders characterized by deficits in social interactions as well as the presence of repetitive behaviors and restricted interests. It is now well accepted that ASD have a multifactorial origin with a strong genetic basis and a heritability estimated at 50%. *SHANK3* is a synaptic gene highly associated with ASD and identified in our laboratory as a major risk for ASD. The SHANK3 protein encodes a scaffolding protein expressed within the synapses of excitatory neurons and plays major role in dendritic spines maturation and formation of synapses.

My thesis project focuses on the *in vitro* and *in vivo* analysis of *de novo* heterozygous truncating mutations found in *SHANK3* using induced pluripotent stem cells (iPSC) obtained from patients diagnosed with ASD. iPSC model allows to generate a wide number of human neurons that are normally non accessible. Moreover, this model provides the opportunity to study the effect of heterozygous mutations in the patient genetic background and to assess developmental phenotypes of human neurons cultured *in vitro* or grafted into the neonatal mouse brain. Based on the early onset of cellular impairments in ASD (fetal and perinatal stages) the model used in my project is fully relevant in terms of temporal windows to study synaptic alterations linked to SHANK3 mutations and to follow the development of human neurons at early stages.

In order to study the consequences of *SHANK3* mutations on the human neuronal development, the laboratory has selected three control individuals and four independent patients carrying heterozygous truncating *de novo SHANK3* point mutations. The corresponding iPSC have been generated in collaboration with the I-Stem Institute (Coll Dr A. Benchoua) for their derivation into cortical glutamatergic neurons. The first part of this project conducted *in vitro*, highlighted reduced densities in dendritic spines and abnormalities in their morphologies in correlation with decreases in *SHANK3* mRNA expression.

In the second part of the project, neural progenitor cells (NPC) from a control individual have been grafted neonatally (between P0 and P2) into the ventricles or the motor cortex of immunodeficient mice in order to characterize the development of these progenitors *in vivo* as well as the distribution of their axonal projections in the mouse brain. By co-transplanting NPC from a control individual and from an ASD patient, we observed a diminution in soma size and axonal projections in the ASD patient neurons compare to the control individual neurons. However, there is no significant differences on dendritic spine density and morphology in the early neurodevelopment *in vivo* between the two populations of neurons grafted together.

To conclude, the *in vitro* approach allows to bring out synaptic alterations in the patient neurons that could be linked to the connectivity anomalies observed in some patients with ASD. The *in vivo* approach provided complementary data on the cellular connectivity of these neurons in a 3D environment. The iPSC model tested both *in vitro* and *in vivo* is then a suitable model that provide wide possibilities to investigate the early cellular mechanisms of ASD.

Key words: Autism, SHANK3, hiPSC, excitatory neurons, chimeric mice, xenotransplantation, dendritic spines

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai effectué pendant ma thèse. Je vous remercie d'avance pour le temps que vous allez tous accorder à la lecture de mon manuscrit, et pour les commentaires que vous pourrez m'apporter.

Je tiens ensuite à remercier Isabelle Cloëz-Tayarani pour la confiance qu'elle m'a accordée sur ce projet et pour m'avoir grandement aidé avec les souris pour toutes les manipulations d'injections. Merci de m'avoir encadrée avec autant de patience et de gentillesse et d'avoir toujours vu le verre à moitié plein quand je le voyais à moitié vide. Je vous souhaite un bel avenir dans l'équipe NISC.

Je remercie aussi, avec beaucoup de gratitude, Thomas Bourgeron pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour vos encouragements constants et merci d'avoir toujours cru en moi. Et surtout merci de me permettre de rester un peu plus longtemps dans l'équipe en me proposant un nouveau projet en génétique.

Merci également à tout le laboratoire de Génétique Humaine et Fonctions Cognitives pour m'avoir apporté autant de connaissances sur les diverses disciplines qui entourent l'étude des TSA. Je me dois en particulier de remercier tous les cliniciens travaillant au laboratoire, sans qui ce projet, et bien d'autres, n'aurait pas été possible : Merci à Richard, Frédérique, Aline, Anna, Anne Claude et Anita.

A tous ceux qui ont partagé mon bureau, merci de m'avoir supportée aussi longtemps, même lorsque j'ai barricadé chaque fenêtre de sacs poubelles ou que je parlais toute seule dans mon coin.

Merci Thibeault pour tes nombreux conseils et pour tout ce que j'ai pu apprendre grâce à toi sur les souris Shank3. Merci à Elodie, pour nous avoir fait voyager en Alsace bien des fois grâce à ses petites confections culinaires. Merci à Jean Pierre qui, en plus de m'avoir nourri intellectuellement, était toujours là au moment du goûter ou en fin de journée pour me redonner des forces à coup de chocolat, gaufres et autres sucreries. Merci aussi pour toutes les discussions que nous avons eues autour de mon projet, toujours enrichissantes. Merci à Fabrice, le génie des programmes d'analyses pour avoir essayé de me sauver de mon naufrage d'analyse manuelle dans le noir. Un grand merci également à Elisabeth et Sabrina pour leur présence. Vous êtes toutes les deux adorables et votre soutien et vos encouragements m'ont été précieux à de très nombreuses reprises. J'espère qu'on gardera contact encore longtemps. Promis après ma thèse, je reprends le sport (pas sûre que ma gourmandise s'arrête par contre). Un mot pour Benoit, le « petit nouveau » de ce bureau que je remercie également pour me rappeler qu'il faut que j'arrête de me sous-estimer.

Je remercie aussi Alex et Ben, le duo inséparable du labo. Il aura fallu un peu de temps, mais je suis super contente d'avoir réussi à créer des liens avec vous. Je n'oublierai pas tous les moments où vous m'avez fait rire (et c'est important de rire pendant la thèse) même si parfois c'était à mes dépens ou aux dépens de la pauvre Nath. Je remercie aussi votre volonté à instaurer un peu de méchanceté en moi (pour mon bien). Ce n'est pas encore gagné, on est d'accord. Ben, merci de nous accompagner

continuellement dans toutes nos tâches administratives et pour ton humour. Et toi, Alex, merci de nous dépanner informatiquement à chaque fois que nous en avons besoin et d'avoir partagé avec moi toutes tes expériences ludiques d'escape game ainsi que tes super imitations (palme d'or pour le dauphin).

Merci au bureau du milieu : A Roberto et Katja pour votre joie de vivre et cette agréable odeur de pop-corn que je pouvais sentir jusqu'à mon bureau. A Nicolas pour sa gentillesse et pour tous les repas partagés en ensemble. A Guillaume pour sa passion pour la recherche. Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta future équipe à Montréal.

Merci aux généticiens/bioinformaticiens du labo : Simon, Freddy, Claire, Thomas, Alex (encore toi) pour m'avoir permis de ne pas perdre toutes mes notions de génétiques apprises au magistère de génétique (je crois que grâce à vous j'ai encore quelques restes). J'espère pouvoir apprendre encore plus de vous si je reviens au laboratoire dans la team génétique.

Merci à Florence pour m'avoir souvent écoutée et rassurée. Merci à Julien pour son implication dans l'organisation de ce laboratoire.

Je souhaite également remercier Corinne et toute l'équipe de la cuisine qui nous permettent chaque jour de pouvoir travailler dans de bonnes conditions et avec du matériel propre. Je dois aussi dire que ça faisait du bien de croiser du monde dans les couloirs lorsque mes manips m'obligeaient à arriver tôt le matin.

Merci à tous ceux du labo qui sont partis : A Hany qui m'a tant appris, merci pour toute l'aide apportée concernant la partie *in vitro* de ce projet, et également pour toutes ces petites pauses culturelles. A Anne-Marie, une personne formidable que j'ai eu le plaisir de connaître. Aux anciennes thésardes Marion, Coralie et Ophélie pour avoir partagé avec moi leur expérience de thèse. A Laura pour m'avoir légué son projet. Merci également aux thésards de ma génération, Min et Oscar, deux personnes dotées d'une incroyable zen attitude que j'ai d'ailleurs toujours enviée. Merci à Anne, pour avoir mis au profit de ce projet, toute son expertise en matière d'analyse de RNAseq.

Bien sûr, je remercie aussi mes petites stagiaires que j'ai adoré encadrer : Amina, Aziliz, Noor, et Marta. Merci d'avoir été si parfaites et de m'avoir tant avancé dans mes manips. Je souhaite à tous les thésards d'avoir des stagiaires comme vous.

Mais surtout un énorme merci à Nathalie, toujours présente dans les bons comme dans les mauvais moments. Dès les premières difficultés, tu n'as pas hésité à apprendre de nouvelles techniques pour m'aider, et tu n'imagines pas le gain de temps que cela m'a apporté. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi. Merci également pour avoir toujours su trouver les bons mots pour me rebooster et pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble. J'espère qu'il y en aura pleins d'autres. Et je persiste, c'est toi la pipelette numéro 1 du labo.

Un nombre incalculable de personnes m'ont aidée à un moment ou un autre de ma thèse. J'aimerais tous les remercier.

Tout d'abord, merci à toute l'unité NISC. Merci à Stéphanie pour avoir eu la gentillesse de me fournir en lentivirus. Je te remercie aussi pour toutes les autres petites astuces que tu m'as apportées pendant 4 ans. Merci à Laurène pour sa bonne humeur sans faille perceptible à chaque recoin du premier étage. Merci à Uwe pour m'avoir laissée présenter mon travail aux réunions NISC et pour les discussions scientifiques qui s'en sont suivies. Mille mercis à toi Célia. Tu as été mon guide scientifique pendant ces 4 années, et toute ton expérience m'a été bénéfique. Merci d'avoir toujours su répondre à mes nombreuses questions.

Je remercie aussi tous les ingénieurs de la plateforme d'imagerie de l'institut Pasteur et plus particulièrement Audrey et Julien qui ont toujours été présents pour me secourir lorsque le microscope ne voulait pas que je travaille. Merci à Emma et Stéphane de la plateforme d'analyse d'images pour leur aide concernant l'analyse de mes méli-mélo de neurones. Merci à toi, Jean-Yves, pour ta disponibilité, pour l'intérêt que tu as porté à mon projet et pour tout ce que tu m'as appris au cours de ma thèse. Merci à Stéphane et Laurent de la pièce cellules, qui ont rendu mes journées derrière la hotte moins monotones pendant toute la partie *in vitro* de ce travail.

Un petit mot aussi pour tous mes amis - A ceux de Thiais : Nelly, Mélanie, Denis, mes meilleurs amis, merci d'être toujours là depuis maintenant plus de 15 ans et pour tous les souvenirs merveilleux que vous m'avez apportés durant toutes ces années - A ceux que j'ai rencontré après le lycée : Audrey, Victoria, Laetitia, Julia et Aude, merci de m'avoir supportée dans les deux sens du terme à chaque instant. Je sais que je n'ai pas toujours été très disponible ces dernières années, mais j'espère pouvoir me rattraper.

Je n'oublie pas les personnes qui me sont le plus chers : mes parents. Merci infiniment pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma scolarité, de la prépa jusqu'à la fin de cette thèse. Merci d'avoir supporté mes sauts d'humeurs quand j'étais stressée, merci de m'avoir consolée lorsque je ne croyais plus en moi, merci pour tous ces allers retours Thiais – Saint-Maur pendant la prépa, puis Thiais – Pasteur/Montrouge/Chatelet pendant la thèse afin que je puisse vous voir le week-end sans perdre trop de temps dans les transports.

Je remercie aussi particulièrement mon frère adoré et ma super belle-sœur pour toutes ces après-midi/soirées jeux/escape game me permettant de décompresser. Merci pour tout votre soutien et pour tous ces moments partagés. On n'a pas pu beaucoup se voir avant votre départ en Bretagne, mais ce n'est que partie remise.

Merci également à tout le reste de ma famille pour tous les bons moments que je vis à vos côtés.

Pour finir, je te remercie toi, Victor, qui m'a épaulée sans conditions lors de ma dernière année de thèse. Même pendant le confinement, tu as su me trouver les meilleures conditions pour que je puisse réussir. Cette période n'a pas été facile pour toi, mais je te remercie d'avoir tout fait pour prendre soin de moi et d'avoir su raviver mon sourire lorsque mes moments de doutes prenaient le dessus. Maintenant que le plus dur est passé, on peut enfin bientôt quitter ce mini-studio pour démarrer de nouvelles aventures ensemble. Enfin, merci pour tout le bonheur et tout l'amour que tu m'apportes chaque jour.

TABLE DES ABRÉVIATIONS

A

- ABA** : Applied behavioral analysis
ACTN4 : Actinin alpha 4
ADI-R : Autism diagnostic interview-revised
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADOS : Autism diagnosis observation schedule
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid
ANK : Ankyrine
ANKRD11 : Ankyrin repeat domain 11
aPKC : Protein kinase C alpha
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASMT : Acetylserotonin O-Methyltransferase

B

- BDNF** : Brain-derived neurotrophic factor
BHE : Barrière Hématoencéphalique
BMP : Bone morphogenetic protein
BRG : basale Radial glia
BRG1 : Brahma homolog 1
BRN1 : Brain-specific homeobox/POU Domain protein 1
BRN2 : Brain-specific homeobox/POU Domain protein 2

C

- CACNA1C** : Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C
CACNA2D3 : Calcium voltage-gated channel subunit alpha2 delta3
CADPS2 : Calcium dependent secretion activator 2
CAMKI : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I
CAMKII : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CARS : Childhood autism rating scale
CDC42 : Cell division cycle 42
CGH : Comparative genomic hybridization
CHD8 : Chromodomain helicase DNA binding protein 8
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
c-Myc : Myc proto-oncogene protein

CNTN : Contactin (Contactine)

CNTNAP : Contactin-associated protein Like

CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

CNV : Copy number variant

CRISPR/cas9 : Clustered regular interspaced short palindromic repeats / Caspase 9

CUX1 : Cut like homeobox 1

CUX2 : Cut like homeobox 2

D

DDP10 : Dipeptidyl peptidase like 10

DGK : Diacylglycerol kinase

DIVA: Data Integration and Visualization in Augmented and Virtual Environments

DLGAP2 : DLG associated protein 2

DNMT3A : DNA Methyltransferase 3 Alpha

DNMT3B : DNA Methyltransferase 3 Beta

DSM : Diagnostic and statistical manual of mental disorders

DOT1L : DOT1 like histone lysine methyltransferase

DPP6 : Dipeptidyl peptidase like 6

DPYD : Dihydropyrimidine dehydrogenase

E

EB : Embryoid bodies (Corps embryoides)

EEG : Electroencephalogramme

EGF : Epidermal growth factor

E/I : Excitation/Inhibition

Emx1: Empty Spiracles Homolog 1

EN2 : Homeobox engrailed 2

ESC : Embryonic stem cell (Cellule Souche Embryonnaire)

F

FACS : Fluorescence activated cell sorting (Tri cellulaire induit par fluorescence)

FDA : Food drug administration

FDG6 : FYVE, RhoGEF And PH Domain Containing 6

FGF : Fibroblast growth factor

FISH : Fluorescence *in situ* hybridization

FOXA2 : Forkhead box A2

FMR1 : Fragile mental retardation 1

FXS : Fragile X-syndrome (Syndrome de l'X fragile)

G

GABA : γ -Aminobutyric acid (Acide γ -aminobutyrique)

GABRA3 : Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha3

GABRA4 : Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha4
GABRB1 : Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta1
GABRB3 : Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta3
GDP : Guanosine diphosphate
GFP : Green fluorescent protein
GKAP : Guanylate kinase-associated protein
GTP : Guanosine triphosphate
GRIP : Glutamate receptor-interacting protein
GWAS : Genome wide association studies

H

HCN : Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel
HOMER : Homer scaffold protein

I

ICD : International classification of diseases
IGF-1 : Insulin growth factor-1
IP3 : Inositol 1,4,5 triphosphate
IPC : Intermediate progenitor cell
iPSC : induced Pluripotent stem cells (cellules souches pluripotentes induites)
IRM : Imagerie par résonance magnétique

J

JAK : Janus kinase 2

K

KLF4 : Krüppel-like factor

L

LIN28 : Lin 28 homolog
LIMK1 : Lim domain kinase 1
LTD : Long-Term depression (Dépotentialisation à long terme)
LTP : Long-Term potentiation (Potentialisation à long terme)

M

MAGUK : Membrane-associated guanylate kinase
MAPK7 : Mitogen-activated protein kinase 7
ME : Microscopie électronique
MECP2 : Methyl CpG binding protein 2
mEPSC : miniature Excitatory postsynaptic current
mGluR : metabotropic Glutamate receptor
miARN : micro ARN
mTORC1 : mammalian Target of rapamycin complex 1

N

NE : Neuroépithéliale

NK : Natural killer

NLGN : Neuroligine

NMD : Non sense mediated decay

NMDA : N-methyl-D-aspartate receptor`

NPC : Neural progenitor cell (Cellule progénitrice Neurale)

Nr1d1 : Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1

Nr2a : Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A

NR5A2 : Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2

NRXN : Neurexine

NSC : Neural stem cell (Cellule souche neurale)

O

Oct4 : Octamer-binding transcription factor 4

P

PA : Potentiel d'action

PAK : p21-activating kinase

PCR : Polymerase chain reaction

PER3 : Period Circadian Regulator 3

PFN2 : Profilin 2

PLAUR : Plasminogen activator, urokinase receptor

PMDS : Phelan McDermid syndrome (Syndrome de Phelan McDermid)

PSD : Postsynaptic density (Densité post-synaptique)

PSD95 : Postsynaptic density 95

PDZ : PSD95/disc large/zone occludens 1

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

Q

QI : Quotient intellectuel

R

Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RBS-r : Repetitive behavior scale – revised

Rhoa: Ras homologous member

S

SAM : Steril alpha motif

SAP30 : Sin3A associated protein 30

SAPAP3 : Disks large associated protein 3

SCN1A: Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 1

SFARI : Simons foundation autism research initiative

SCNT : Somatic cell nuclear transfer
SH3 : Src homology 3
SHANK : SH3 and multiple ANKyrin repeat domains
SNP (partie génétique) : Single-nucleotide polymorphism
SNP (partie neurogène) : Short neural precursors
SNV : Single-nucleotide variant
SOX2 : SRY-box 2
SRPR : Signal recognition particle receptor
SRS : Social responsiveness scale
SSEA-1 : Fucosyltransferase 4
SUV39H1 : Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
SVZ : Sub ventricular zone (Zone sous-ventriculaire)
SYNGAP : Synaptic ras GTPase activating protein 1

T

TDAH : Troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité
TEACCH : Treatment and education of autistic and related communication handicapped children
TGF : Transforming Growth Factor
TSA : Troubles du spectre autistique
TSC1 : Tuberous sclerosis complex 1
TSC2 : Tuberous sclerosis complex 2

U

UBE2H : Ubiquitin conjugating enzyme E2 H
UBE3A : Ubiquitin Protein Ligase E3A

V

VGLUT : Vesicular Glutamate Transporter 1
VZ : Ventricular zone (zone ventriculaire)

W

WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein
WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein

INDEX DES FIGURES

- Figure 1** : Présentation et évolution des critères majeurs de diagnostic des TSA
- Figure 2** : Présentations des comorbidités les plus retrouvées dans les TSA
- Figure 3** : Évolution de la prévalence des TSA dans les années 2000
- Figure 4** : Altération de la connectivité locale des régions corticales impliquées dans le langage
- Figure 5** : Architecture génétique des TSA
- Figure 6** : Facteurs environnementaux impliqués dans les TSA
- Figure 7** : SHANK3 et organisation de la synapse
- Figure 8** : Profil des îlots CpG et du niveau de méthylation sur le gène *SHANK3*
- Figure 9** : Expression de SHANK3 au cours du développement chez l'humain
- Figure 10** : Illustration des isoformes présentes dans les différents modèles de délétions de Shank3
- Figure 11** : Illustration du système de mutation conditionnelle Cre-Lox
- Figure 12** : Présentation des différentes classes d'épines dendritiques
- Figure 13** : Illustration des différents modèles de spinogénèse
- Figure 14** : Profil des anomalies retrouvées au niveau des épines dendritiques dans les différents troubles reliés aux TSA
- Figure 15** : Cellules souches et leurs niveaux de différenciation possibles
- Figure 16** : Présentation des différentes techniques de reprogrammation
- Figure 17** : Exemple de mécanismes impliqués dans les étapes de reprogrammation
- Figure 18** : Régionalisation du cerveau embryonnaire par les gradients de facteurs de croissance
- Figure 19** : Régionalisation du tube neural et illustration des différentes vésicules cérébrales
- Figure 20** : Obtention expérimentale des différents sous types neuronaux
- Figure 21** : Présentation des différentes étapes de la neurogenèse corticale
- Figure 22** : Divers exemples de transdifférenciation neuronale à partir de fibroblastes humains et murins
- Figure 23** : Variation du risque de rejet de greffe en fonction du la concordance entre donneur et receveur

Figure 24 : Différences anatomiques et développementales entre les cerveaux humain et murin

Figure 25 : Présentation des différents axes étudiés dans les projets *in vitro* et *in vivo* de cette thèse

Figure 26 : Résumé des résultats obtenus lors des projets *in vitro* et *in vivo* de cette thèse

Figure 27 : Distributions des astrocytes humains au sein des cultures *in vitro*

Figure 28 : Expression de SHANK3 chez la souris et l'humain dans les différentes catégories cellulaires cérébrales

Figure 29 : Astrocytes humains et murins dans le cerveau de souris et dans la greffe humaine

Figure 30 : Paramètres morphologiques des différentes classes d'épines dendritiques

Figure 31 : Profils synaptiques visualisés dans la greffe de neurones humain en ME

Figure 32 : Représentation du circuit de migration rostrale murin

Figure 33 : Visualisation des coupes de cerveaux greffés par les cellules de l'individu contrôle et du patient grâce à l'outil DIVA

Figure 34 : Résultats préliminaires obtenus par injection *in utero* de précurseurs neuronaux

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	3
ABSTRACT.....	4
REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	8
INDEX DES FIGURES.....	13
TABLE DES MATIÈRES.....	15
INTRODUCTION.....	19
II] L'AUTISME.....	21
A) Historique.....	21
B) Définition et caractéristiques des Troubles du Spectre Autistique.....	22
1- La dyade autistique.....	22
2- Évolution de la définition et de la classification de l'autisme.....	23
3- Description des différents sous-types des TSA.....	24
a. <i>Autisme classique de Kanner.....</i>	<i>24</i>
b. <i>Syndrome d'Asperger.....</i>	<i>24</i>
c. <i>Troubles désintégratifs de l'enfance.....</i>	<i>24</i>
d. <i>Troubles envahissants du comportement non identifiés.....</i>	<i>24</i>
C) Comorbidités.....	25
1- Comorbidités psychiatriques.....	25
2- Comorbidités neurologiques.....	26
3- Comorbidités physiologiques.....	27
4- Syndromes génétiques.....	27
D) Prévalence.....	29
E) Diagnostic.....	31
F) Traitement.....	32
1- Méthode comportementale et développementale.....	33
2- Traitements pharmacologiques.....	34
3- Développement d'une médecine personnalisée.....	35
G) Physiopathologie.....	36
1- Altération de la connectivité.....	36
2- Déséquilibre de la balance excitatrice/inhibitrice.....	37
H) Etiologie.....	39
1- Facteurs génétiques.....	39
a. <i>Évaluation de la composante génétique des TSA.....</i>	<i>39</i>
b. <i>Identification des mutations et des gènes impliqués dans les TSA.....</i>	<i>40</i>
c. <i>Proposition d'un modèle génétique.....</i>	<i>43</i>
d. <i>Catégorie des gènes mutés et voies biologiques associées.....</i>	<i>44</i>
2- Facteurs environnementaux.....	47
III] SHANK3 ET ÉPINES DENDRITIQUES.....	50
A) Présentation de la famille SHANK.....	50
B) Expression des protéines SHANK.....	53
1- Expression spatiale au niveau tissulaire.....	53
2- Régulation de l'expression des gènes <i>SHANK</i>	53
3- Expression spatiale au niveau cellulaire.....	55
4- Expression temporelle.....	55

C) SHANK et leur implication dans les troubles neuropsychiatriques	56
1- TSA et PMDS.....	56
2- Autres troubles neuropsychiatriques.....	58
a. <i>Troubles bipolaires</i>	59
b. <i>Schizophrénie</i>	59
D) Études de l'effet de SHANK3 dans les TSA	60
1- Les modèles <i>in vitro</i>	60
2- Le modèle murin.....	62
3- Autres modèles animaux.....	67
4- Étude de patients.....	68
E) Epines dendritiques	69
1- Structure et caractéristiques des épines dendritiques.....	69
2- Organisation des épines dendritiques.....	71
a. <i>Récepteurs</i>	72
b. <i>Protéines d'adhésion cellulaire</i>	73
c. <i>Protéines d'échafaudage</i>	74
d. <i>Protéines du cytosquelette</i>	75
e. <i>Protéines de signalisation</i>	76
3- Formation des épines dendritiques.....	76
4- Rôles des épines dendritiques.....	78
5- Epines dendritiques et TSA.....	80
III] MODÈLE D'ÉTUDE	82
A) Présentation du modèle iPSC	82
1- Définitions des cellules souches.....	82
a. <i>Les cellules souches embryonnaires</i>	84
b. <i>Les cellules souches adultes</i>	85
2- Génération de cellules souches pluripotentes par reprogrammation.....	86
a. <i>Reprogrammation par transfert nucléaire</i>	87
b. <i>Reprogrammation par fusion cellulaire</i>	88
c. <i>Reprogrammation par induction</i>	89
3- Mécanismes impliqués dans la formation des iPSC.....	90
a. <i>Présentation des différentes étapes de reprogrammation</i>	90
b. <i>Modification des histones</i>	91
c. <i>Modification épigénétique de l'ADN</i>	91
d. <i>Modifications de la conformation tri-dimensionnelle de l'ADN</i>	92
e. <i>Rôle et mode d'action des facteurs de Yamanaka</i>	92
4- Dérivation des cellules iPSC en cellules souches neurales.....	95
5- Développement cortical.....	98
a. <i>Organisation du cortex</i>	98
b. <i>Formation du cortex</i>	100
6- Méthodes de différenciation corticale des cellules souches neurales.....	103
7- Applications.....	105
a. <i>Modélisation des TSA</i>	106
b. <i>Test et criblage de molécules thérapeutiques</i>	108
8- Limitations du modèle iPSC.....	109
a. <i>Rendements faibles</i>	109
b. <i>Élimination des marques épigénétiques</i>	111
c. <i>Variabilités</i>	112
d. <i>Carences du modèle</i>	112
B) Transplantation cellulaire <i>in vivo</i>	113
1- Historique.....	113
2- Transplantation et rejet de greffe.....	114
3- Apport du modèle de transplantation sur le neurodéveloppement.....	116
4- Modélisation de troubles du neurodéveloppement et approche thérapeutique.....	119

OBJECTIFS DE LA THESE	121
RESULTATS.....	125
ARTICLE 1 : ALTEREDSPINOGENESIS IN IPSC-DERIVED CORTICAL NEURONS FROM PATIENTS WITH AUTISSM CARRYING <i>DE NOVO SHANK3</i> MUTATIONS	131
REVUE : INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AS A TOOL TO STUDY BRAIN CIRCUITS IN AUTISM- RELATED DISODERS.....	157
ARTICLE 2 : A CHIMERIC MOUSE MODEL TO STUDY HUMAN IPSC-DERIVED NEURONS: THE CASE OF A TRUNCATING MUTATION	167
DISCUSSION	191
BIBLIOGRAPHIE.....	217

INTRODUCTION

II L'autisme

A) Historique

La notion d'autisme ou Austimus a été employée pour la première fois en 1911 par le psychiatre Eugen Bleuler. Etymologiquement, ce terme se compose du radical grec « αὐτός » (autos) qui signifie « soi-même » et du suffixe « ismus » employé pour qualifier un comportement.

Eugen Bleuler attribue ce terme à un groupe de symptômes secondaires, associés à la manifestation d'un état schizophrénique de patients ayant développé des difficultés à interagir avec leur environnement et une tendance à se replier sur eux-mêmes (Bleuler, 1911).

Les troubles autistiques représentant un trouble à part entière ont été mis en évidence par le pédopsychiatre Léo Kanner. Dans *Autistic Disturbance of Affective Contact*, publié en 1943 dans le journal *Nervous Child*, il décrit cliniquement le cas de 11 enfants qu'il suit en tant que patients depuis 1938. Au cours d'entretiens médicaux, Leo Kanner constate que ces 11 enfants partagent un profil comportemental similaire. En effet, ces derniers montrent une tendance à l'isolement, une difficulté à faire face aux changements de la vie quotidienne et un retard du langage (Kanner, 1943). L'autisme de Kanner voit alors le jour.

La distinction entre l'autisme de Kanner et la schizophrénie peut s'illustrer par cette citation de Léo Kanner : « Alors que le schizophrène essaye de résoudre son problème en quittant un monde dont il faisait partie et avec lequel il était en contact, nos enfants (autistes) arrivent progressivement au compromis qui consiste à tâter prudemment un monde auquel ils ont été étrangers dès le début. » (Kanner, 1943).

En parallèle, Hans Asperger, un psychiatre autrichien, dresse un portrait de l'autisme différent de celui énoncé par Léo Kanner. Il rapporte le cas de 4 jeunes garçons présentant les signes suivants : « Un manque d'empathie, une faible capacité à se créer des amis, des conversations unidirectionnelles, une intense préoccupation pour un sujet particulier et des mouvements maladroits ». Son étude, rédigée en 1943 et parue en 1944 dans un journal allemand, est présentée dans *Die « Autistischen Psychopathen » im Kindesalter* (Asperger, 1944). On retrouve des similitudes chez ces enfants et chez ceux de Leo Kanner, en particulier au niveau de l'intégration et de la sociabilisation. Ils se distinguent toutefois, par leurs capacités cognitives plus élevées et leur langage plus développé.

Ses travaux sont longtemps restés ignorés des scientifiques et médecins de son époque, les textes allemands étant peu lus. Lorna Wing, une pédopsychiatre, permet de rendre publiques les observations de Hans Asperger en 1981 à l'occasion de la publication de ses recherches « Asperger's syndrome, a clinical account ». C'est seulement en 1991 que son article est traduit en anglais par Uta Erith.

B) Définition et caractéristiques des Troubles du Spectre Autistique

1- La dyade autistique

La dyade autistique correspond aux deux caractéristiques actuellement proposées pour décrire les troubles du spectre autistique (TSA). Elle comprend la présence (1) de déficits de la communication sociale et des interactions sociales ainsi que (2) de comportements stéréotypés et d'intérêts restreints. Il est à noter qu'auparavant, la définition des TSA reposait sur une triade de symptômes avec deux catégories distinctes pour les troubles de la communication et des interactions sociales (figure 1).

Les altérations de l'interaction sociale se traduisent par une difficulté à engager des interactions avec d'autres individus et à maintenir une conversation. Cela est principalement dû à une mauvaise maîtrise des codes de la communication aussi bien verbale, que gestuelle (peu d'expression faciale, gestuelle limitée, absence de contacts visuels), ainsi qu'à une analyse uniquement littérale des mots. Ainsi, les mots à double sens, les jeux de mots et l'ironie constituent un obstacle dans les conversations qu'entretiennent ces enfants. Ces derniers rencontrent également des difficultés à interpréter les émotions des personnes qui les entourent, ce qui leur confère un manque d'empathie élevé. Ces difficultés dans les interactions sociales entraînent souvent un isolement important des enfants avec autisme.

Les comportements stéréotypés peuvent être nombreux et prendre différentes formes. Lorsqu'ils interviennent verbalement, on parle d'écholalie. Il s'agit de répétitions de certains mots ou de morceaux de phrases que l'enfant emploie pour s'adresser à son interlocuteur. Souvent ces répétitions sont empruntées directement du discours de l'interlocuteur, mais elles peuvent également provenir d'un autre support comme d'une émission vue à la télévision ou une chanson écoutée à la radio. Les stéréotypies peuvent également se manifester dans la gestuelle de l'enfant. Parmi les gestes les plus fréquents on retrouve : des mouvements de balancement du corps ou de « flapping » (mouvement de battements des bras ou des mains répétés). Ces comportements, mal perçus par le monde extérieur, contribuent aussi à l'isolement des enfants atteints de troubles autistiques. Ces stéréotypies peuvent être plus violentes et s'exprimer par des comportements d'automutilations comme s'arracher les cheveux, se mordre une partie du corps ou encore se frapper. D'autres stéréotypies sont d'ordre sensoriel. Des exemples de ce type de stéréotypies comprennent le besoin de stimulations visuelles par activation et désactivation répétées d'interrupteurs, ou le besoin de stimulation auditives par la recherche de certains bruits particuliers.

Les intérêts restreints correspondent à des attachements anormaux et disproportionnés envers certains sujets. Ils sont souvent envahissants car l'intérêt est tel qu'il est difficile pour l'enfant de se concentrer sur d'autres activités ou d'aborder d'autres sujets. Cela peut s'exprimer par un besoin constant

de se documenter sur le sujet ou bien par l'obsession de collectionner un nombre anormalement élevé d'objets. Cela peut aussi être l'objet d'une focalisation lors d'échanges verbaux. Ces intérêts restreints se manifestent car ils apportent aux patients une meilleure estime de soi et contribuent à la régulation de leurs émotions.

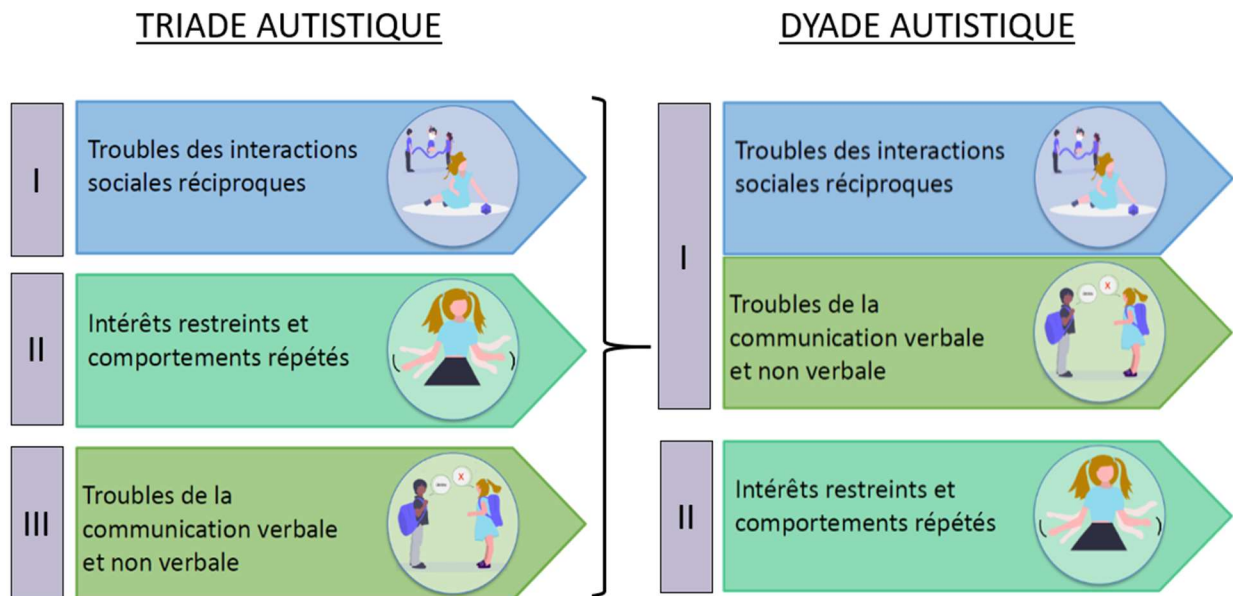


Figure 1 : Présentation et évolution des critères majeurs de diagnostic des TSA

Les critères d'inclusion dans les TSA ont sans cesse évolué depuis la première publication du DSM. Dans la version 4 du DSM, trois catégories de symptômes étaient incluses : troubles des interactions sociales réciproques, intérêt restreints et comportements répétés et troubles de la communication. Dans la version 5 du DSM, les troubles des interactions sociales réciproques ainsi que les troubles de la communication verbale et non verbale ont été rassemblés dans une même catégorie de symptômes. Pour chacune de ces catégories, le DSM5 présente plusieurs exemples de symptômes caractéristiques des TSA. L'enfant doit manifester les trois symptômes de la première catégorie et au moins deux symptômes de la seconde catégorie pour entrer dans le spectre de l'autisme

2- Évolution de la définition et de la classification de l'autisme

Les TSA se déclinent sous différentes formes pouvant être très variables en termes de symptômes et de sévérité phénotypique. La définition ainsi que les critères de diagnostic des TSA ont beaucoup évolué au cours du temps. On peut retrouver ces critères dans différents ouvrages ayant pour but de recenser les troubles d'ordre psychiatrique et d'en établir une classification. Ces documents regroupent également les principales caractéristiques de ces troubles et sont ainsi souvent utilisés par les médecins pour établir un diagnostic de leurs patients. Les deux manuels les plus couramment utilisés sont le DSM (Diagnostic and statistical manual of mental disorders) et l'ICD (the International Classification of Disease).

Dans la première version du DSM publié en 1952, l'autisme est associé à une forme de schizophrénie infantile (American Psychiatric Association, 1952). La définition de l'autisme a ensuite été remaniée dans chaque version du DSM. Dans le DMS IV, l'autisme est relié à d'autres troubles et

apparaît sous une nouvelle appellation : les troubles envahissants du comportement dans lesquels on retrouve cinq formes différentes - l'autisme classique de Kanner, le syndrome d'Asperger, les troubles désintégratifs de l'enfance, les troubles envahissants du comportement non spécifiés et le syndrome de Rett. En 2013, la cinquième édition du DSM (correspondant à l'édition actuelle) supprime le syndrome de Rett de la classification et regroupe les autres sous-types autistiques dans une nouvelle catégorie : les Troubles du Spectre Autistique (American Psychiatric Association, 2013). Les critères d'évaluation ont également été révisés dans cette nouvelle version du DSM (figure 1). Cette dernière a également introduit une échelle visant à évaluer la sévérité des différents traits autistiques.

3- Description des différents sous-types des TSA

a. Autisme classique de Kanner

Cette catégorie correspond aux enfants manifestant les trois critères des troubles du spectre autistique et qui présentent en plus des troubles du langage, ainsi qu'une déficience intellectuelle. Le terme d'autisme de « bas niveau » est souvent associé à cette catégorie.

b. Syndrome d'Asperger

Les enfants atteints du syndrome d'Asperger développent également les trois critères des TSA. Leur langage n'est cependant pas affecté et peut être d'un niveau supérieur à la moyenne mais il ne leur permet pas de s'intégrer socialement. Les intérêts restreints de ces enfants sont visiblement plus marqués. Par opposition à l'autisme de Kanner, les enfants touchés par ce syndrome sont des autistes dits de « haut niveau ».

c. Troubles désintégratifs de l'enfance

Dans les troubles désintégratifs de l'enfance, les symptômes se manifestent plus tardivement. On observe tout d'abord un développement normal jusqu'à l'âge deux ans, puis apparaît une régression des aptitudes sociales et d'intégration précédemment acquises. Cela inclut les capacités motrices, de langage et de comportement social.

d. Troubles envahissants du comportement non identifiés

La définition des troubles envahissants du comportement non identifiés est plus vague. Les enfants présentant ce trouble manifestent des problèmes d'interaction sociale mais ne développent pas tous les critères ou alors les phénotypes observés sont plus modérés.

C) Comorbidités

L'hétérogénéité des phénotypes autistiques repose principalement sur la co-occurrence très importante de comorbidités accompagnant les TSA. Les comorbidités sont des traits cliniques se développant en parallèle d'un trouble considéré comme primaire ou principal. Une étude, menée par Simonoff et ses collègues, sur un groupe de 112 adolescents âgés de 10 à 14 ans et diagnostiqués autistes a révélé que 70 % d'entre eux avaient développé au moins une comorbidité psychiatrique et que 41% d'entre eux en avaient développé davantage (Simonoff *et al*, 2008; Sharma *et al*, 2018). Bien que les comorbidités ciblées dans cette étude soient de nature psychologique, dans les TSA, elles peuvent aussi être d'ordre neurologique ou encore physiologique comme illustré en figure 2.

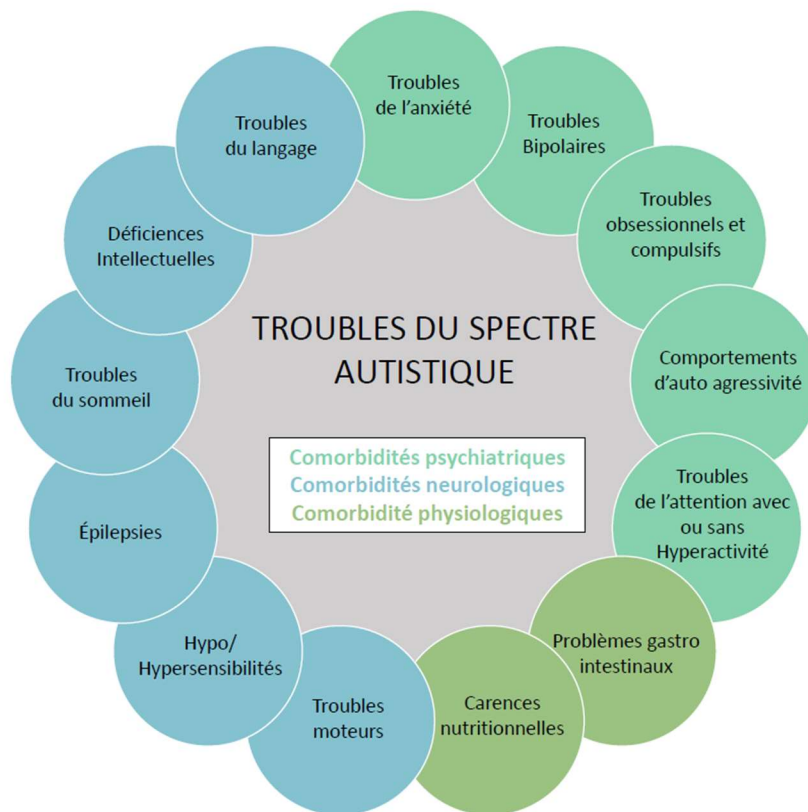


Figure 2 : Présentation des comorbidités les plus retrouvées dans les TSA

Dans la majorité des cas, les TSA s'accompagnent de comorbidités. Différents exemples sont représentés dans cette figure en fonction de leur nature : comorbidités psychiatriques, comorbidités neurologiques et comorbidités physiologiques. Ces troubles secondaires arborent une sévérité variable entre les différents patients atteints de TSA.

1- Comorbidités psychiatriques

Les troubles anxieux figurent parmi les comorbidités psychiatriques les plus fréquemment présentes chez les enfants avec TSA, avec une prévalence d'environ 40% (Simonoff *et al*, 2008; Avni *et al*, 2018). Ils peuvent se manifester, entre autres, lors d'une séparation de l'enfant et de ses parents ou

par la présence marquée de phobies peu communes pour le reste de la population (Leyfer *et al*, 2006). En particulier, 10% des enfants avec TSA manifestent des phobies relatives au bruit (Leyfer *et al*, 2006).

Les TSA s'accompagnent aussi de troubles de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité chez 50 à 70% des enfants atteints (Leyfer *et al*, 2006; Sinzig *et al*, 2009; Avni *et al*, 2018). Ces deux troubles partagent des propriétés communes comme une occurrence plus élevée chez les garçons par rapport aux filles ou la présence de troubles additionnels similaires.

D'autres troubles du comportement sont également répertoriés. On peut retrouver des troubles bipolaires (Kirsch *et al*, 2019), des troubles touchant l'alimentation, des troubles obsessionnels compulsifs (Leyfer *et al*, 2006) ou encore des troubles d'auto-agressivité (Ming *et al*, 2016).

2- Comorbidités neurologiques

Les comorbidités neurologiques associées aux TSA sont aussi nombreuses et très fréquentes.

Par exemple, les cas d'épilepsie représentent environ 5 à 25% des patients avec TSA (Bolton *et al*, 2011; Viscidi *et al*, 2013; Thomas *et al*, 2017). Cette comorbidité avait déjà été observée chez l'un des 11 patients suivis par Kanner (Kanner, 1943). Il est à noter que les risques de crises sont plus forts au moment de l'enfance et de l'adolescence (Gillberg & Steffenburg, 1987) et que celles-ci sont favorisées lorsque les patients présentent en plus une déficience intellectuelle ou du langage (Bolton *et al*, 2011; Jokiranta *et al*, 2014; Thomas *et al*, 2017).

On observe, par ailleurs, une association très forte entre les TSA et les déficiences intellectuelles définies par des quotients intellectuels (QI) inférieurs à 70. Ainsi, près de la moitié des patients porteurs de TSA expriment également des déficiences intellectuelles plus ou moins sévères (Fombonne, 2003; Charman *et al*, 2011; Postorino *et al*, 2016). En particulier, des QI inférieurs à 50 ont été détectés chez 15% des patients (Charman *et al*, 2011). De plus, le risque de développer une déficience intellectuelle est plus élevé en cas de naissance prématurée ou tardive (Xie *et al*, 2017).

Une autre comorbidité neurologique est couramment rapportée par les parents d'enfants avec TSA. Il s'agit des troubles du sommeil qui touchent entre 45 et 80% des enfants avec TSA (Hoshino *et al*, 1984; Richdale & Prior, 1995; Souders *et al*, 2009; Reynolds *et al*, 2019) alors que ce taux ne dépasse pas les 50% quand il est question d'enfants sans TSA. Ces troubles comprennent des réveils nocturnes fréquents et pouvant durer plusieurs heures (Krakowiak *et al*, 2008; Humphreys *et al*, 2014), des difficultés à s'endormir (Malow *et al*, 2006; Krakowiak *et al*, 2008) ou encore des nuits agitées avec cauchemars et mouvements non contrôlés. Ces perturbations du sommeil pourraient s'expliquer par des altérations du cycle circadien ou par la présence de troubles psychologiques additionnels comme les troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) ou les troubles de l'anxiété. Selon une étude récente, ces troubles persistent chez l'adulte avec TSA (Ballester *et al*, 2018).

On peut également citer (1) les troubles sensoriels pouvant se trouver sous forme d'hypersensibilité ou d'hyposensibilité et affecter différents domaines (ex : hypersensibilité au bruit, au

goût, à l'odorat hyposensibilité à la douleur, à la satiété), (2) les troubles moteurs de sévérité légère tels que des troubles de la coordination comme la dyspraxie ou la présence de mouvements inappropriés répétés (Cassidy *et al*, 2016), (3) les troubles du langage avec un taux élevé de dyslexie ou de dysphasie, (4) une prévalence plus élevée de cas de synesthésies (Baron-Cohen *et al*, 2013).

3- Comorbidités physiologiques

Des comorbidités physiologiques apparaissant plus fréquemment chez les patients avec TSA que dans la population générale ont également été recensées.

En particulier, de fortes carences nutritionnelles ont été détectées chez des patients diagnostiqués autistes (Zimmer *et al*, 2012). Ainsi, bien que ce soit très variable d'un individu à un autre, près d'un enfant autiste sur 2 présente une insuffisance pour au moins un nutriment, dont une liste non exhaustive comprend : le fer, le zinc, le calcium, la vitamine D, la vitamine B12 (Zimmer *et al*, 2012). Dans la majorité des cas, cela est dû à une alimentation très sélective (Bandini *et al*, 2010). En effet, de par leur hypersensibilité gustative certains patients expriment des aversions très prononcées envers quelques aliments (Schreck *et al*, 2004). Parfois, le refus d'un aliment résulte de son aspect visuel (couleur, forme) ou de sa texture, mais d'autres raisons de nature variable ont été répertoriées (Schreck *et al*, 2004).

D'autres nutriments sont au contraire présents en trop forte quantité. C'est par exemple le cas du magnésium ou de la vitamine A (Zimmer *et al*, 2012). Il en découle une toxicité marquée par l'apparition de symptômes tels que des maux de tête ou des crises d'eczéma.

Selon diverses études, les individus avec TSA développent aussi plus souvent des troubles gastro-intestinaux (McElhanon *et al*, 2014). Dans le cas des TSA, ces troubles se caractérisent généralement par la présence de constipations anormalement fréquentes, un fort taux de diarrhées, des reflux gastriques et des douleurs abdominales (McElhanon *et al*, 2014). Ces troubles peuvent survenir à la suite d'une carence nutritionnelle, d'une intolérance à certains aliments, être la conséquence d'allergies ou encore résulter d'un déséquilibre du microbiote. Une méta-analyse conduite récemment a ainsi montré une baisse de certaines bactéries probiotiques, comme *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, et *Parabacteroides*, chez des enfants avec TSA. (Xu *et al*, 2019a).

Les individus avec TSA sont également plus fréquemment touchés par les troubles du système immunitaire ou par des troubles affectant le métabolisme (Rossignol & Frye, 2012; Chen *et al*, 2013; Zerbo *et al*, 2015).

4- Syndromes génétiques

Les TSA sont, de plus, très souvent liés à des maladies génétiques rares de type syndromes, dont les caractéristiques et causes sont bien définies. Ces autismes dits syndromiques concernent environ 10 à 20% des patients avec TSA (Abrahams & Geschwind, 2008). Néanmoins, individuellement, ils ne

permettent d'expliquer à eux seuls que 1 à 2% des cas de TSA. Il en existe un grand nombre, le tableau 1 en dresse une liste non exhaustive avec les symptômes et causes génétiques qui leur sont associés. Comme l'indique le tableau 1, la prévalence des cas de TSA détectés dans ces syndromes peut être fortement variable entre les différentes études, en raison de critères d'évaluation ou d'inclusion différents et d'échantillons de trop faibles tailles, mais elle reste dans tous les cas, supérieure à la prévalence retrouvée dans la population générale.

Nom du syndrome	Cause génétique / gènes impliqués	% des cas de TSA dans le syndrome	Principales caractéristiques du syndrome (Hors TSA)	Références
Syndrome d'Angelman	Délétion maternelle de la région 15q11-q13/ <i>UBE3A</i>	~42-61%	Déficience intellectuelle sévère, hyperactivité, crises paroxystiques, épilepsies Manque de concentration, Troubles moteur (ataxie) et du langage (peu ou pas de langage), Dysmorphies faciales, Microcéphalie, Troubles du sommeil, Trouble de l'alimentation.	Peters <i>et al</i> 2004 Bonati <i>et al</i> , 2007
Syndrome de Prader-Willi	Délétion paternelle de la région 15q11-q13 <i>UBE3A</i>	~25-36%	Hypotonie sévère, Dysmorphies faciales, Pieds et mains de petite taille, Altération de la satiété avec risque d'obésité, Parfois déficience intellectuelle légère avec difficulté dans l'apprentissage et l'expression orale, Troubles psychiatriques, Troubles moteurs	Descheemaeker <i>et al</i> , 2006 Bennett <i>et al</i> , 2015
Syndrome du X fragile (XFRA)	<i>FMR1</i> (Expansion du trinucéotide CCG)	~65%	Déficience intellectuelle, Macroencéphalie, Dysmorphies faciales (front et menton élargis), Retard du développement psychomoteur, Anxiété, Trouble du langage verbal et Trouble du comportement de type TDAH	Clifford <i>et al</i> , 2007 García-Nonell <i>et al</i> , 2008
Syndrome de Timothy	<i>CACNA1C</i>	~60-80%	Arythmie et malformation cardiaque, Dysmorphies faciales, Déficience du système immunitaire	Splawski <i>et al</i> , 2004
Syndrome de Phelan-McDermid	Délétion 22q13 terminale (<i>SHANK3</i>)	~39-95%	Macroencéphalie, dolichocéphalie, Hypotonies, Dysmorphies faciales, Retard du développement, Déficiences intellectuelles, Absence ou retard du langage Epilepsies, Insensibilité à la douleur, Anomalies cardiaque et rénale, Infections du tractus respiratoire récurrentes, Strabisme fréquent. Risque de développer un trouble bipolaire	Phelan <i>et al</i> , 2001 Soorya <i>et al</i> , 2013 Ponson <i>et al</i> , 2018
Syndrome de Rett	<i>MECP2</i>	~25-97%	Développement normal puis régression avant les 5 ans avec troubles moteurs (apraxie/ataxie), Troubles du langage, Mouvements répétitifs impliquant les mains, Retard de croissance du crâne, Déficiences intellectuelles	Moss & Howlin, 2009
Syndrome de CHARGE	<i>CHD7</i>	~45-68%	Anomalies pouvant toucher les organes suivants : les yeux, les oreilles, l'appareil génital, le nez Retards de croissance fréquents Parfois : démarche anormale, anomalie dentaire, épilepsie, paralysie faciale hypotonie, anosmie.	Hartshorne <i>et al</i> , 2005 Johansson, 2007 Vignoli <i>et al</i> , 2015
Syndrome de la sclérose tubéreuse	<i>TSC1/TSC2</i>	~15-50%	Développement de tumeurs bénignes pouvant toucher la peau, les yeux, les reins, les poumons et le système nerveux central, Crises d'épilepsies fréquentes, Déficiences intellectuelles, Lésions de la peau et présence de tâches sur la peau	Bolton <i>et al</i> , 2002 Wong, 2006 Vignoli <i>et al</i> , 2015
Syndrome de Down	Trisomie 21	~7-15%	Hypotonie, Dysmorphies faciales (visage rond, petit nez...) Retards de la croissance, Déficiences intellectuelles et Retard psychomoteur, Trouble du langage (élocution lente)	Lowenthal <i>et al</i> , 2007 DiGuseppi <i>et al</i> , 2010
Phénylcétonurie	PAH	~5 -25%	Retard de développement graduel, Convulsions, Microcéphalie, Déficiences intellectuelles, Troubles du comportement (dont hyperactivité et agressivité) et de la motricité Peau et cheveux clairs chez la majorité des patients	Baieli <i>et al</i> , 2003 Khaled Saada <i>et al</i> , 2013
Syndrome de Sanfilippo	Type IIIA : <i>SGSH</i> Type IIIB : <i>NAGLU</i> TYPE IIIC : <i>HGSNAT</i> TYPE IIID : <i>GNS</i>	~25-62%	Premiers symptômes entre 2 et 6 ans : Troubles du comportement (hyperkinésie, agressivité), Déficiences intellectuelles, Troubles du sommeil, Signes dysmorphiques très modérés Vers 10 ans : Perte des acquisitions psychomotrices et de la communication, Epilepsies	Rumsey <i>et al</i> , 2011 Shapiro <i>et al</i> , 2016
Syndrome de Dravet	<i>SCN1A</i>	~24-39%	Principalement épilepsies, Retard de développement, Troubles du langage, Altération des fonctions visuelles, Mauvaise coordination des mouvements et Troubles du comportement	Li <i>et al</i> , 2011 Ouss <i>et al</i> , 2019
Syndrome de DiGeorge ou Velo-cardio-facial	Délétion de la région 22q11.2	~16 - 50%	Malformation congénitale cardiaque, Déficience du système immunitaire induisant des infections pulmonaires fréquentes, Hypocalcémie, Troubles de l'apprentissage, et Troubles de l'alimentation, Dysmorphie faciale, Troubles de la physiologie rénale	Vorstman <i>et al</i> , 2006 Ousley <i>et al</i> , 2017 Serur <i>et al</i> , 2019

D) Prévalence

Différentes études ont permis d'évaluer la prévalence des TSA dans la population mondiale. Les premières études réalisées au cours des années 60 ont estimé la prévalence à 4 enfants atteints pour 1000 (Lotter, 1966). A cette époque, l'autisme pouvait donc être considéré comme une condition rare. Néanmoins, depuis les années 2000, on observe un accroissement important de la prévalence des TSA. Notamment, au niveau des Etats-Unis, les centres de contrôles et préventions des maladies évaluant le taux de TSA de façon bisannuelle ont indiqué une élévation constante du nombre d'enfants avec autisme depuis cette période. La figure 3 montre, qu'en l'espace de 14 ans, la prévalence d'enfants avec autisme a plus que doublé, passant de 1/166 à 1/59. Ce taux a été actualisé cette année et est maintenant de 1 enfant sur 54 (Baio *et al*, 2020).

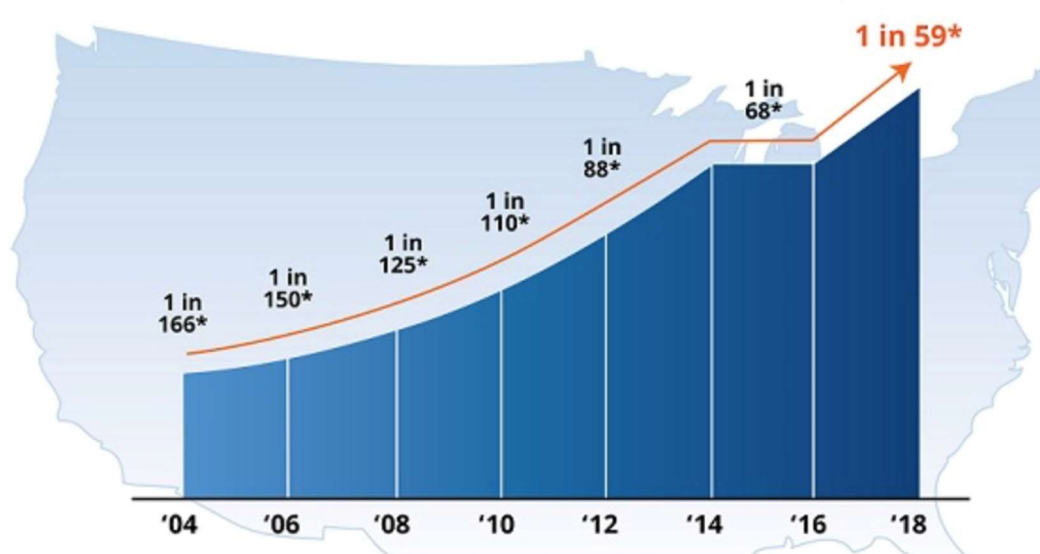


Figure 3 : Évolution de la prévalence des TSA dans les années 2000

Ce graphique représente l'accroissement de la prévalence des TSA aux Etats-Unis entre les années 2000 et 2014. Les taux indiqués correspondent aux mesures publiées par les centres de contrôle et de prévention des Etats-Unis et concernent un échantillon évalué 4 années auparavant. Ainsi, la prévalence de 1 enfant sur 59 indiquée dans le graphique se rapporte à une cohorte d'enfants évalués en 2014.

Graphique issu du site <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>

Cette augmentation ne reflète pas nécessairement une plus grande proportion d'individus présentant un TSA, mais est plutôt le résultat d'un certain nombre d'événements concordants. Tout d'abord, l'évolution des critères de diagnostic contribue considérablement à cet accroissement. En effet, les diagnostics actuels sont mieux définis. Alors qu'auparavant, les enfants présentant des signes autistiques sans déficience intellectuelle n'étaient pas pris en compte lors de l'évaluation clinique, ce caractère n'est aujourd'hui plus exclusif. De plus, il y a une meilleure information des équipes médicales

et de la population générale. Les parents ainsi que les professionnels de la santé sont désormais plus sensibilisés au sujet des TSA, ce qui a permis une amélioration de leur détection. Notamment, les faits de substitutions diagnostiques en raison du manque de connaissances sur les TSA et de la présence de nombreuses comorbidités ont été réduits. Ainsi, dans de nombreux cas, des enfants ayant reçu un diagnostic de déficiences intellectuelles ont pu après réévaluation entrer dans les critères de définition des TSA. Une étude conduite en ce sens a d'ailleurs montré une corrélation négative entre la prévalence des TSA et la prévalence des déficiences intellectuelles, entre les années 2000 et 2010 (Polyak *et al*, 2015).

Des facteurs exogènes pourraient également expliquer l'accroissement de la prévalence, particulièrement l'âge des parents au moment de la conception ou certaines conditions environnementales qui seront discutées dans une partie ultérieure.

Les TSA sont également marqués par une plus forte proportion de garçons diagnostiqués autistes. On en retrouve en effet entre 2 à 6 fois plus selon la sévérité du phénotype (Yeargin-Allsopp *et al*, 2003; Fombonne, 2013). Ainsi, lorsque les TSA sont associés à des déficiences intellectuelles sévères, le rapport est de deux garçons pour une fille (Fombonne, 2013). Par contre, si aucune déficience intellectuelle n'est relevée on observe six garçons pour une fille (Fombonne, 2013).

A l'heure actuelle, aucun mécanisme n'a été clairement identifié afin d'expliquer les raisons de ce sexe ratio. Les premières recherches se sont orientées vers une implication des chromosomes et hormones sexuels, mais celles-ci n'ont pas encore fourni de réponses concluantes. Néanmoins, deux autres théories complémentaires sont actuellement étudiées par la communauté scientifique (Werling & Geschwind, 2013).

La première théorie met en avant un effet protecteur exprimé chez les patientes. Plusieurs études ont montré que ces dernières accumulent plus de variations génétiques délétères que les patients de sexe masculin, suggérant l'existence de facteurs leur permettant d'atténuer les risques causés par les mutations qu'elles portent (Levy *et al*, 2011; Jacquemont *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2020). D'après cette théorie, pour un même nombre de mutations délétères, les filles sont protégées par rapport aux garçons.

Selon la deuxième théorie, les TSA résulteraient d'un profil cérébral particulier qui serait une exacerbation de celui typiquement observé chez les garçons (Baron-Cohen, 2002). Cette théorie s'est fondée sur les deux observations suivantes : (1) le caractère d'empathie plus élevé chez les filles neurotypiques que chez les garçons neurotypiques est diminué chez les patients avec TSA, (2) le caractère de systématisation plus développé chez les garçons neurotypiques que chez les filles neurotypiques est augmenté chez les patients avec TSA (Baron-Cohen, 2002). Des données plus récentes supportent ce modèle (Greenberg *et al*, 2018).

Une autre hypothèse discutée défend la difficulté à poser un diagnostic des TSA chez les filles, qui ont tendance à camoufler certains de leurs traits autistiques, et pour lesquelles les outils d'évaluation

sont moins adaptés (Hull *et al*, 2019). Cela est majoritairement le cas lorsque ces dernières ne présentent pas de déficience intellectuelle (Dworzynski *et al*, 2012). D'autres études indiquent, en outre, que le phénotype autistique développé chez les filles s'exprime différemment de celui des garçons (Szatmari *et al*, 2012; Beggiato *et al*, 2017; Rynkiewicz & Łucka, 2018). Ces divergences phénotypiques n'étant pas prises en compte dans les tests de diagnostic des TSA, cela pourrait également expliquer la sous-représentation des filles dans les TSA (Beggiato *et al*, 2017).

E) Diagnostic

Les TSA peuvent être détectés très tôt au cours du développement. Les premiers symptômes peuvent apparaître, en effet, aux alentours de 1 an. Les signes qui alertent en général les parents sont nombreux et comprennent entre autres un retard ou une absence du langage, un manque d'intérêt envers les parents, une aversion pour les contacts physiques, un évitement du regard, une préférence pour l'isolement, une manipulation anormale des objets ainsi qu'une difficulté à participer à des activités nécessitant de l'imagination. Actuellement, aucun marqueur biologique attestant de la présence d'un TSA n'a été clairement identifié. Des taux très élevés de sérotonine (Leboyer *et al*, 1999; Pagan *et al*, 2014; Bridgemohan *et al*, 2019) associés à des taux très bas de mélatonine (Tordjman *et al*, 2013; Pagan *et al*, 2014; Maruani *et al*, 2019) sont, néanmoins, fréquemment retrouvés chez les patients avec TSA. Il s'agit de biomarqueurs assez reproductibles car répliqués dans plusieurs études, mais qui ne sont pas spécifiques de ces troubles. Ainsi, il est à ce jour difficile d'effectuer des tests biologiques pour diagnostiquer les troubles du spectre autistique. De nouvelles pistes pour détecter les TSA ont émergé grâce au déploiement de l'imagerie fonctionnelle et des électroencéphalogrammes (EEG) (Bhat *et al*, 2014; Grossi *et al*, 2017; Emerson *et al*, 2018).

Les tests cliniques sont donc actuellement privilégiés. Les premières étapes du diagnostic consistent généralement en un entretien structuré entre un pédopsychiatre et les parents. Il en existe plusieurs et permettent à la fois de mettre un nom sur le trouble de l'enfant mais aussi d'évaluer le degré de sévérité des symptômes associés (Thabtah & Peebles, 2019). Dans certains cas, les EEG permettent de valider et de détecter d'autres troubles pouvant être associés aux TSA comme l'épilepsie (Fluss & Korff, 2011). Ces tests peuvent se poursuivre par des examens visant à évaluer les sensibilités sensorielles de l'enfant. Une consultation génétique et des examens neurologiques sont également souvent recommandés.

Parmi les entretiens cliniques couramment utilisés on retrouve : l'ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised), l'ADOS (Autism Diagnosis Observation Schedule), ainsi que le CARS (Childhood Autism Rating Scale), trois tests dont les résultats sont complémentaires. Ces tests sont tous trois basés sur un système d'échelle d'évaluation des troubles autistiques permettant d'attribuer une notation sur différents critères.

- L'ADI-R est un entretien standardisé interrogeant le développement moteur et social de l'enfant, ainsi que son niveau de communication. Les questions posées au patient ou aux parents sont regroupées par items et renvoient aux critères définis par le DSM (Lord *et al*, 1994). Cette évaluation peut être pratiquée avec des enfants âgés de 2 ans au minimum, à condition que ces derniers ne présentent pas de retard du développement trop importants.
- L'ADOS est un entretien durant duquel le médecin observe le patient et ce au cours de plusieurs ateliers le plaçant dans différentes conditions afin de tester son niveau d'interaction sociale (Lord *et al*, 1989). Il existe différents niveaux d'activité selon le niveau de communication du patient et peut s'employer pour diagnostiquer aussi bien des enfants à partir de 1 an que des adultes.
- Le CARS évalue le comportement de l'enfant à travers un questionnaire regroupant 15 items recevant une note de 1 à 4. Une deuxième version de cet outil d'évaluation a été élaborée afin de se rapprocher davantage des critères diagnostiques recensés dans les versions plus récentes du DSM (Schopler *et al*, 1980, 2010).

D'autres systèmes d'évaluation plus spécifiques existent et sont utilisés pour mesurer le degré de sévérité de traits autistiques particuliers. Notamment, le SRS (Social Responsiveness Scale) quantifie les compétences sociales de l'enfant et le RBS-R (Repetitive Behavior Scale-Revised) génère un score de sévérité relatif aux comportements répétés (Bodfish *et al*, 2000; Constantino *et al*, 2004).

F) Traitement

Actuellement, il n'existe aucun traitement pharmacologique permettant une guérison totale des TSA. Les traitements employés visent plutôt à atténuer certains symptômes liés à la pathologie ainsi que les comorbidités qui y sont associés et permettent ainsi d'améliorer le quotidien des individus atteints de TSA. Plusieurs approches sont utilisées : les méthodes pharmacologiques et les méthodes comportementales ou développementales.

Concernant les méthodes comportementales et développementales, la prise en charge de l'enfant sera d'autant plus efficace qu'elle aura été initiée tôt. Certaines d'entre elles peuvent débuter dès les 18 mois de l'enfant (Dawson *et al*, 2012).

Ces approches basées sur le comportement sont encore peu adaptées aux adultes avec TSA et ces derniers sont principalement traités via les approches pharmacologiques. Pour autant, les médicaments

prescrits à ces adultes ont essentiellement été testés chez les enfants ou dans le cadre d'autres pathologies (Murphy *et al*, 2016). Davantage d'études pour le développement d'approches thérapeutiques adaptées aux patients adultes sont nécessaires.

1- Méthode comportementale et développementale

Les méthodes comportementales ont pour but d'aider l'enfant dans l'apprentissage de comportements positifs et l'élimination de comportement inappropriés. Au cours de sa prise en charge, l'enfant développe de nouvelles compétences cognitives, motrices et sociales dans différents domaines dont la communication et l'autonomie (Tiura *et al*, 2017). Il s'agit souvent de programmes intensifs et précoces pouvant débuter dès l'âge de deux ans. La méthode la plus couramment utilisée est la méthode Applied Behavior Analysis (ABA) élaborée par le psychologue norvégien Lovaas (Lovaas, 1987). Le comportement de l'enfant est analysé de façon à déterminer la meilleure stratégie d'apprentissage et de modification de celui-ci (Granpeesheh *et al*, 2009). L'enfant est guidé par un éducateur. L'apprentissage d'un nouveau comportement se décompose en trois étapes : l'éducateur donne les consignes à l'enfant, qui essaie de les reproduire, puis l'éducateur réagit. Des renforçateurs sont donnés à l'enfant, en cas de réussite, de manière à le récompenser et l'inciter à reproduire ce comportement positif (Granpeesheh *et al*, 2009; Tiura *et al*, 2017). L'enfant est occupé à temps plein, au cours de séances répétées, afin de réduire le temps où il est livré à lui-même et ainsi les comportements inappropriés. Lorsque le langage de l'enfant est limité, une communication alternative basée sur des images ou une gestuelle est mise en place.

Lors de son étude pionnière, Lovaas a comparé le devenir d'enfants avec TSA inclus dans un programme de traitement expérimental intensif (40h/ semaine) ou inclus dans un programme plus léger (10h/ semaine). Ses résultats ont révélé que près de la moitié des enfants inclus dans le premier programme ont pu intégrer une école et ont amélioré leurs aptitudes cognitives contre seulement 2% pour les enfants inclus dans le second programme (Lovaas, 1987). Depuis, l'efficacité de ce type d'approche comportementale a été confirmée dans diverses autres études (Peters-Scheffer *et al*, 2011; Reichow *et al*, 2012). Plusieurs d'entre elles ont également montré de meilleurs résultats lorsque les enfants sont traités tôt au cours de leur développement ou lorsque ces derniers présentent peu de déficits intellectuels (Granpeesheh *et al*, 2009a; Tiura *et al*, 2017).

Les méthodes développementales partagent d'importantes similitudes. Une collaboration étroite entre les parents et les professionnels est nécessaire dans ce type de programme (Panerai *et al*, 2002). Cela permet une formation continue avec une reprise des exercices réalisés au cours de la journée, le soir avec les parents. Les capacités des enfants suivis sont mises en avant, les éducateurs accordant une importance plus faible aux handicaps (Panerai *et al*, 2002). Il existe plusieurs programmes orientés vers les approches développementales. Le programme de DENVER basé sur le jeu et la méthode TEACCH

(Treatment and education of autistic and Communication handicapped children) en font partie. L'apprentissage d'une nouvelle compétence s'effectue alors dans un environnement aménagé et adapté à chaque enfant selon ses handicaps et ses intérêts (Panerai *et al*, 2002).

Au début des années 2000, il a été estimé qu'entre 30 à 40% des enfants avec TSA ont bénéficié de la méthode TEACCH (Kielinen *et al*, 2002; Green *et al*, 2006). Plusieurs analyses ont mis en évidence une amélioration des performances cognitives et des capacités motrices d'enfants avec TSA après plusieurs mois de traitement par l'approche TEACCH (Ozonoff & Cathcart, 1998; Panerai *et al*, 2002). Néanmoins, l'efficacité de ce type de thérapie développementale a été contestée à plusieurs reprises (Butler, 2007; Virues-Ortega *et al*, 2013). Ces deux études déplorent en particulier la taille des échantillons utilisés et des lacunes dans leur conception notamment concernant la randomisation de l'inclusion des patients dans les différents groupes. Une méta-analyse plus récente visant à comparer différentes approches non pharmacologiques pour le traitement des TSA a de nouveau souligné l'absence de données solides attestant l'efficacité de la méthode TEACCH (Sandbank *et al*, 2020).

2- Traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques utilisés dans le cadre des TSA agissent sur différents aspects symptomatiques de ces troubles.

Certains traitements ont pour but de diminuer les symptômes principaux des TSA, retrouvés chez patients atteints de TSA, en améliorant entre autres la communication, les stéréotypies et les aptitudes sociales de ces patients. Selon plusieurs études, différentes molécules agissent sur ces aspects. Certains inhibiteurs de la recapture de la sérotonine comme la fluoxétine semblent, par exemple, permettre une réduction des comportements répétés (Hollander *et al*, 2005). De nombreuses études ont en outre été menées sur l'ocytocine, un neuropeptide sécrété par les neurones magnocellulaires et les neurones parvocellulaires de l'hypothalamus et jouant un rôle dans la régulation des émotions. Des modèles animaux, générés pour l'étude de diverses formes d'autisme, ont notamment permis de relever une baisse des comportements sociaux associée à une perte de cellules productrices de l'ocytocine et une baisse des taux de ce neuropeptide (Dombret *et al*, 2012; Peñagarikano *et al*, 2015). Des études cliniques ont ainsi été mises en place pour tester l'effet thérapeutique de ce neuropeptide. Elles ont démontré que l'ocytocine améliorait les aptitudes sociales d'enfants avec TSA (Yatawara *et al*, 2016; Parker *et al*, 2017). Les effets de ce neuropeptide sont d'autant plus importants que ses taux initiaux mesurés chez l'enfant, avant le début de l'étude, sont faibles (Parker *et al*, 2017).

Les patients peuvent également suivre des traitements qui vont agir sur les troubles neurologiques et autres comorbidités développés en parallèle des traits autistiques.

Lorsque des problèmes d'attention ou d'hyperactivité sont détectés, il peut ainsi être recommandé d'administrer à l'enfant des molécules stimulantes, telles que le Methylphenidate, qui agissent en

bloquant la recapture de la noradrénaline et de la dopamine. Ce traitement s'est montré efficace dans deux essais cliniques (Pearson & Santos, 2013; RUPP, 2005). L'un d'entre eux a cependant reporté le développement d'effets secondaires sévères chez 18% des patients (RUPP, 2005). Des résultats encourageants bien qu'insuffisants ont aussi été obtenus par des essais de traitements basés sur la prise de Naltrexone, un antagoniste des opioïdes (Roy *et al*, 2015).

Pour réduire les comportements d'anxiété et de dépression, fréquemment retrouvés chez les patients, il est aussi possible d'utiliser des antidépresseurs et anxiolytiques qui vont permettre de réduire la recapture de la sérotonine ou sa dégradation. En particulier, le Citalopram testé dans le cadre de deux essais cliniques a obtenu des résultats positifs chez plus de la moitié des patients (Namerow *et al*, 2003; Hardan *et al*, 2004). En plus de réduire les troubles de l'anxiété, ce médicament agit aussi sur les troubles de l'irritabilité et sur les comportements agressifs.

Dans le cas des troubles du sommeil, dont sont fréquemment sujets les patients, la mélatonine est la molécule la plus prescrite. Elle permet, en particulier, de diminuer le délai d'endormissement d'environ 25 minutes et d'allonger le temps de sommeil d'environ 32 minutes des enfants traités (Cortesi *et al*, 2012; Gringras *et al*, 2015, 2017). De façon intéressante, une étude a montré une amélioration de la communication après traitement à la mélatonine (Wright *et al*, 2011)

Un grand nombre de médicaments ont ainsi été testés depuis les années 40, pour traiter les divers symptômes se développant à la suite d'un TSA, mais à l'heure actuelle, seuls la Risperidone et l'Aripiprazole font partie des molécules approuvées par la FDA (US Food and Drug Administration). La Risperidone est utilisée pour traiter les comportements agressifs et répétitifs tandis que l'Aripiprazole est prescrit lorsque le patient manifeste des troubles de l'irritabilité.

3- Développement d'une médecine personnalisée

Cependant, les TSA sont caractérisés par une forte diversité phénotypique. Les symptômes aussi bien que les causes du développement des TSA varient fortement d'un patient à un autre. En conséquence, il est difficile d'élaborer un traitement qui soit efficace et adapté pour tous les individus porteurs de traits autistiques. Le développement d'une médecine personnalisée apparaît donc nécessaire dans le cadre des traitements associés à ces troubles.

Un axe de recherche, orienté dans ce but, vise à réaliser une stratification des patients, afin de définir différents groupes et sous-groupes d'individus génétiquement et physio-pathologiquement proches (Loth *et al*, 2017). Cette approche permettra sans doute un avancement de la recherche dans le domaine des traitements des TSA, ainsi que d'un grand nombre d'autres troubles psychiatriques caractérisés par des phénotypes variables.

Plusieurs méthodes de stratification sont à ce jour employées dans les laboratoires, comme la méthode du « Network Based Stratification » (Kim *et al.*, article en préparation) et la méthode du « Finite Mixture Modelling » (Eagle *et al.*, 2010).

G) Physiopathologie

1- Altération de la connectivité

Le cerveau est organisé par différents niveaux de connectivité. A l'échelle cellulaire, les neurones sont connectés entre eux par l'établissement des synapses. Les neurones s'organisent en différents groupes formant des micro-colonnes interagissant au sein de macro-colonnes. Enfin, la connectivité concerne également les différentes régions cérébrales plus ou moins éloignées et connectées par des faisceaux de substances blanches.

Les altérations de la connectivité sont répandues chez les individus présentant un TSA et seraient liées, selon certaines hypothèses, aux périodes de formation et d'élimination des synapses acquises pendant le développement. Normalement, les synapses sont formées en excès pendant la synaptogenèse puis certaines sont éliminées grâce à des événements d'élagage. Cette étape semble être peu suivie chez les patients avec TSA qui présentent dans certaines régions de leur cerveau une densité accrue de synapses (Tang *et al.*, 2014). Ces anomalies se traduisent généralement par une hyperconnectivité exercée localement (Keown *et al.*, 2013) et d'une hypoconnectivité entre différentes régions cérébrales éloignées physiquement (Just *et al.*, 2004; O'Reilly *et al.*, 2017). Cela reste variable selon les régions et la sévérité des TSA. Les hyperconnectivités sont ainsi surtout visibles chez les patients dont les symptômes sont sévères et concernent majoritairement les régions postérieures de leur cerveau (Keown *et al.*, 2013).

Dans une étude sur la connectivité du cortex de patients sans déficience intellectuelle une réduction de l'activité a été détectée au niveau de l'aire de Broca dédiée à l'expression orale (syntaxe, débit, articulation, tonalité de la voix) tandis que l'aire de Wernicke qui gère la partie sémantique du langage est au contraire plus activée (figure 4, Just *et al.*, 2004). Ces observations sont en accord avec les caractéristiques phénotypiques des patients avec TSA sans déficience intellectuelle (richesse du répertoire lexical, mais syntaxe incorrecte, altération du débit et mauvaise utilisation de la tonalité de la voix). Selon cette même étude, un grand nombre de faiblesses cognitives, tout comme les problèmes de socialisation des patients avec TSA, s'expliqueraient par une baisse de la connectivité entre les régions frontales et postérieures (Just *et al.*, 2004). Ces régions communiquant moins bien entre elles, les différents stimuli provenant de l'environnement et que le cerveau doit analyser sont donc moins bien intégrés dans les circuits impliquant diverses régions distantes. Cela empêche les patients de réagir en conséquence et de réaliser des tâches nécessitant la coordination de ces différentes régions.

L'hypoconnectivité entre le cortex frontal et le reste des régions corticales a été répliquée dans un grand nombre d'études (Barttfeld *et al*, 2011; Just *et al*, 2012; O'Reilly *et al*, 2017). Une étude récente réalisée sur des souris mutées au sein du gène *Shank3* impliqué dans les TSA a également mis en évidence un déficit de la connectivité impliquant le cortex préfrontal et des structures plus éloignées comme le caudate putamen et le cortex rétrosplénial (Pagani *et al*, 2019). Néanmoins, des résultats opposés montrant une hyperconnectivité sur de longues distances ont aussi été observés en particulier pendant l'enfance et l'adolescence (Uddin *et al*, 2013; Lynch *et al*, 2013; Supekar *et al*, 2014). De même, lorsque d'autres régions sont analysées, comme le thalamus, des données similaires sont obtenues, avec la visualisation d'une hyperconnectivité entre les régions thalamiques et corticales (Tomasi & Volkow, 2019). La variabilité des résultats observés jusqu'à maintenant pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité clinique et génétique des TSA.

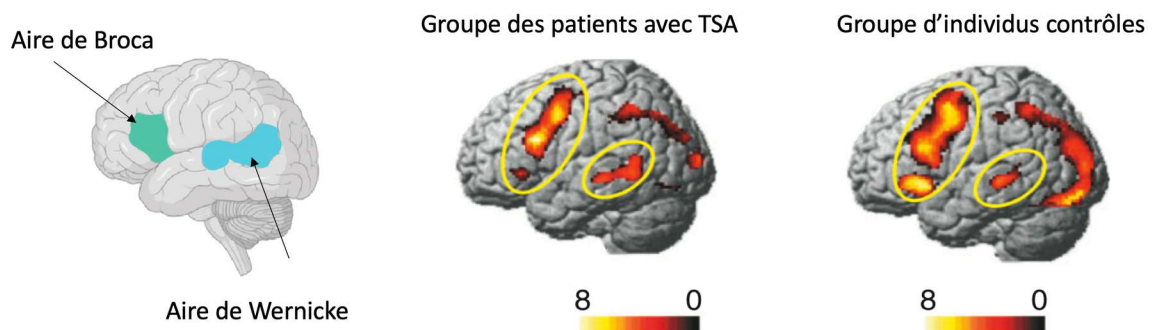


Figure 4 : Altération de la connectivité locale des régions corticales impliquées dans le langage

Les problèmes de connectivités cérébrales sont fréquents chez les patients atteints de TSA et ont beaucoup été étudiés. Un résultat intéressant obtenu par imagerie à résonance magnétique (IRM) fonctionnel a été publié par Just et al en 2004 et indique que l'aire de Broca est plus activée chez les patients avec TSA sans déficience intellectuelle tandis que l'aire de Wernicke est moins activée chez ces derniers. Ces deux aires sont associées à différents aspects du langage. Figure adaptée de Just et al, 2004.

2- Déséquilibre de la balance excitatrice/inhibitrice

Le fonctionnement du cerveau est régi par un certain nombre de mécanismes finement régulés. Par exemple, la balance excitatrice/inhibitrice (E/I) permet d'établir un équilibre entre les transmissions excitatrices provenant des neurones glutamatergiques et les transmissions inhibitrices envoyées par les neurones GABAergiques. Ce contrôle est essentiel dans le traitement des signaux neuronaux ainsi que dans les mécanismes d'apprentissage.

Grâce à des observations convergentes, les neurobiologistes Rubenstein et Merzenich ont pu énoncer qu'une augmentation du ratio excitation/inhibition pourrait être une cause des TSA (Rubenstein & Merzenich, 2003). Tout d'abord, d'un point de vue clinique, comme signalé précédemment, les

patients avec TSA sont fréquemment sujets à développer des crises épileptiques (Canitano, 2007). Ces évènements sont en effet favorisés lorsque le cerveau est dans un état d'hyperexcitabilité. Les études génétiques soutiennent également l'hypothèse d'un dérèglement de l'équilibre des courants électriques (Mehta & Nurmi, 2013; Xu *et al*, 2018). Elles ont permis d'identifier des mutations touchant des gènes impliqués dans le développement et la migration neuronale, la formation, le maintien et le fonctionnement des synapses (protéine d'échafaudage, protéine d'adhésion cellulaire...), ainsi que des gènes codant différents récepteurs et les protéines des voies cellulaires associées. Une étude récente a également mis en évidence une dérégulation de l'expression des gènes appartenant à ces voies, au cours de la différenciation de neurones de patients avec TSA (Derosa *et al*, 2018).

Par exemple, des mutations sur les gènes codant les récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme *GABRA4* et *GABRB1* ont été détectées dans différents groupes de patients (Collins *et al*, 2006). Ces récepteurs apparaissent également moins denses lors de l'étude post-mortem de cerveau de patients avec TSA, en particulier au niveau du cortex cingulaire et du gyrus fusiforme (Oblak *et al*, 2009; Oblak A, 2010). Pour compléter ces observations, des modèles murins ont été générés en invalidant certains gènes candidats pour les TSA ainsi que des gènes impliqués dans le cas d'autisme syndromique. Les souris invalidées pour le gène *En2* montrent ainsi des altérations de leur comportement social, associées à une perte des neurones GABAergiques corticaux et hippocampaux (Cheh *et al*, 2006; Sgadò *et al*, 2013). Une réduction du nombre d'interneurones a en outre été observée chez des souris invalidées pour les gènes de vulnérabilité aux TSA suivants : *CNTNAP2* (Peñagarikano *et al*, 2011), *CADPS2* (Sadakata *et al*, 2007) et *PLAUR* (Eagleson *et al*, 2011). Il a aussi été montré que l'activation des synapses excitatrices grâce à des outils d'optogénétiques génère des altérations des comportements sociaux chez la souris (Yizhar *et al*, 2011).

De plus, grâce au développement d'un algorithme permettant d'estimer le ratio entre l'excitation et l'inhibition à partir d'enregistrement EEG, il a récemment été possible d'évaluer ce paramètre directement sur un groupe d'individus contrôle et sur un groupe d'enfants avec TSA âgés entre 7 et 16 ans. Les résultats de cette étude indiquent que le ratio entre excitation et inhibition est plus élevé chez les enfants avec TSA (Bruining *et al*, 2020).

En plus d'augmenter les risques d'épilepsies, la prépondérance de la transmission excitatrice entraîne un excès d'activité électrique dans le cerveau des patients avec TSA et l'apparition de bruits dans les circuits neuronaux, engendrant des difficultés dans les étapes d'analyse et d'intégration des signaux (Nelson & Valakh, 2015).

L'augmentation de la balance E/I est retrouvée dans diverses formes syndromiques des TSA dont le syndrome de Dravet (Tai *et al*, 2014; Stern *et al*, 2017), la sclérose tuberculeuse (Bateup *et al*, 2011; Zhao & Yoshii, 2019), le syndrome de l'X fragile (El Idrissi *et al*, 2005; Gonçalves *et al*, 2013) et le syndrome d'Angelman (Wallace *et al*, 2012).

Néanmoins, il existe aussi des cas où le déséquilibre de la balance électrique se traduit par un excès de la composante inhibitrice comme dans le syndrome de Rett, pour lequel de nombreuses études ont mis en évidence une diminution des courants excitateurs (Marchetto *et al*, 2010; He *et al*, 2014). Cela est également retrouvé dans certaines formes de TSA causées par des mutations touchant des gènes impliqués dans les synapses excitatrices comme *Shank3*, *Nlgn4* et *PSD95*. Des modèles animaux mutés pour ces gènes présentent en effet des phénotypes similaires (Ehrlich *et al*, 2007; Lee *et al*, 2015b; Unichenko *et al*, 2018).

L'implication de la balance E/I dans le développement des TSA a récemment été remise en cause par les travaux de chercheurs de l'équipe de Feldman. Ces derniers ont analysé les courants électriques post-synaptiques enregistrés dans le cortex somatosensoriel de 4 modèles de souris différents. Pour chacune de ces souris, ces chercheurs ont retrouvé une augmentation du rapport excitation/inhibition. Néanmoins, ce phénotype ne s'accompagne pas d'une augmentation du taux de décharge des neurones pyramidaux (Antoine *et al*, 2019). Les données mises en avant dans cette étude suggèrent que l'augmentation du rapport excitation/inhibition ne serait pas une cause des TSA, mais plutôt un mécanisme mis en place dans le cerveau des patients pour maintenir une activité synaptique stable.

H) Etiologie

On considère aujourd'hui que les TSA ont une origine multifactorielle faisant intervenir des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux.

1- Facteurs génétiques

Différentes approches génétiques ont été employées pour mesurer la part de la génétique impliquée dans les TSA.

a. Évaluation de la composante génétique des TSA

i/ Agrégation familiale

C'est une étude épidémiologique qui s'effectue sur une population. Elle se base sur la comparaison de deux valeurs :

- Le risque qu'un individu développe la maladie d'intérêt sachant qu'un de ses apparentés est déjà atteint.
- Le risque qu'un individu développe la maladie d'intérêt lorsqu'il est pris au hasard dans la population générale.

Le rapport de ces deux valeurs correspond au risque relatif et permet d'évaluer à quel point la maladie a tendance à se concentrer dans certaines familles. Une étude réalisée sur 1,6 million de familles a permis de montrer que la valeur de ce taux baisse lorsque les liens de parenté diminuent, passant de 153 pour des jumeaux monozygotes, à 2 pour des cousins. Ce taux est égal à 8,2 - 3,3 - 2,9 pour les jumeaux dizygotes, les demis frères et sœurs du côté de la mère, les demis frères et sœurs du côté du père respectivement (Sandin *et al*, 2014). Bien qu'informatif, ce test n'est pas suffisant pour conclure. En effet, il existe des maladies génétiques dont le risque relatif est très faible. C'est l'exemple des maladies multifactorielles qui font intervenir un grand nombre de gènes et pour lesquelles l'environnement est très important. Ces tests sont donc souvent complétés par des études de jumeaux.

ii/ Étude de jumeaux

Les études de jumeaux comparent les taux de concordance entre jumeaux monozygotes (génétiquement identiques) et jumeaux dizygotes (ne partageant en moyenne que 50 % de leur génotype). Le taux de concordance correspond au rapport entre le nombre de paires de jumeaux où les deux jumeaux sont atteints et le nombre total de paires. Dans le cas des jumeaux monozygotes partageant 100% de leurs gènes, la concordance inclut les gènes mais aussi leur environnement commun. De nombreuses études de jumeaux ont été appliquées aux cas des TSA (Taniai *et al*, 2008; Rosenberg *et al*, 2009; Huguet *et al*, 2016). Le taux de concordance des jumeaux monozygotes est, dans tous les cas, largement supérieur à celui des jumeaux dizygotes (entre 60% et 95% pour les jumeaux monozygotes et environ 30% pour les jumeaux dizygotes). Des taux plus élevés ont été observés dans les deux groupes, lors d'une méta-analyse plus récente (Tick *et al*, 2016). Cette différence de concordance entre les jumeaux monozygotes et dizygotes traduit l'existence de facteurs génétiques à l'origine des TSA.

b. Identification des mutations et des gènes impliqués dans les TSA

Les études d'agrégations familiales et de jumeaux ont permis de montrer qu'il y a une forte contribution de la génétique dans le développement des TSA. L'hérédité des TSA s'élèverait à 50% selon certaines études (Sandin *et al*, 2014). Plus récemment, une étude basée sur l'analyse de 5 cohortes provenant de pays distincts a mesuré une hérédité de 80% (Bai *et al*, 2019). Pour approximativement 10 à 20% des patients avec TSA, la cause génétique est connue et peut s'apparenter à un des syndromes décrits dans la partie précédente. Pour le reste des cas, que l'on nomme aussi cas d'autismes idiopathiques, des analyses génétiques sont nécessaires pour en déterminer les causes.

i/ Criblages et caractérisation des mutations identifiées

Il est intéressant de noter que toutes les catégories de mutations sont représentées dans les TSA. Différents outils de criblage ont été employés afin de les identifier.

On retrouve ainsi de larges réarrangements chromosomiques détectables par l'observation de caryotypes ou par l'utilisation de la méthode de FISH (Fluorescent in situ hybridization) chez environ 3% des patients (Reddy, 2005). Cette catégorie de mutations inclut des anomalies du nombre de chromosome, des translocations, des inversions ainsi que des délétions ou duplications de grandes tailles. Grâce au développement de méthodologies offrant une détection plus fine, comme la méthode CGH (Comparative genomic hybridization) ou comme les puces à ADN, des mutations de type CNV (Copy number variant) ont pu être observées chez des patients avec TSA (Marshall *et al*, 2008). Les mutations ponctuelles de type SNV (Single nucleotide variant), insertions et délétions sont également présentes (Sanders *et al*, 2012).

Les variations génétiques impliquées dans les TSA peuvent être héritées des parents ou survenir *de novo*, du fait de mutations apparaissant soit dans les gamètes des parents, soit dans la cellule œuf lors de l'embryogenèse. Elles se distinguent de plus par leur prévalence et leur niveau d'impact sur le phénotype. On différencie ainsi les variants rares (fréquence < 1%) caractérisés par un risque élevé de déclencher un TSA, des variants génétiques communs (fréquence > 1%) à faibles effets (Anney *et al*, 2012). Ces derniers nommés aussi variants de vulnérabilité ou de prédisposition augmentent le risque de développer les TSA dans certaines conditions environnementales ou dans un contexte génétique particulier, mais ne sont pas suffisants individuellement pour engendrer un TSA. Ils interviennent de manière importante dans la variabilité de la vulnérabilité entre les patients et expliqueraient 49% des cas de TSA (Gaugler *et al*, 2014).

ii/ Identifications des gènes impliquées dans les TSA

Différentes méthodologies génétiques ont été appliquées afin d'identifier les gènes de vulnérabilité impliqués dans les TSA.

Les études de liaisons ont pour objectif de localiser des facteurs génétiques sur le génome des individus de plusieurs familles, à l'aide de marqueurs génétiques dont la position est connue. Elles se basent sur des calculs de probabilité pour estimer la distance génétique existant entre un marqueur (ex : microsatellite) et un variant responsable d'un caractère (ex : présence de TSA) et permettent de délimiter des régions dans lesquelles marqueurs et variants sont liés génétiquement, c'est-à-dire co-ségrègent ensemble. Il est possible de réaliser des analyses de liaison génétiques orientées vers des régions candidates ou d'effectuer des analyses génétiques de type criblage du génome par une recherche aléatoire, utilisant des centaines de marqueurs génétiques sur la totalité du génome.

De multiples régions sont ressorties de ces études, notamment, les régions 7q31–36 (Barrett *et al*, 1999) et 17q11–21 (Cantor *et al*, 2005) mais peu d'équipes ont été capables de répliquer ces résultats. Afin d'augmenter le pouvoir de détection de ces régions, des approches de types méta-analyses ont été entreprises sans grand succès, puisqu'elles ont échoué à confirmer la majeure partie des résultats (Weiss

et al, 2009). Cela est dû au fait que les variants communs recherchés possèdent un risque trop faible et donc difficilement détectable, compte tenu des tailles d'échantillons incluses dans les analyses précédemment menées.

Une méthode alternative et plus puissante est apportée par les études d'associations, dont l'objectif est d'identifier des facteurs de risques en comparant la fréquence d'allèles entre une population de cas et une population témoin, afin de définir un odd ratio. Ce paramètre permet d'évaluer le niveau de risque associé à un facteur génétique. A l'instar des études de liaison, cette approche peut être tournée vers des gènes candidats ou bien vers le génome entier grâce à l'utilisation de puces permettant de génotyper jusqu'à 1 million de marqueurs de type SNP (Single nucleotide polymorphism). Les gènes candidats sont choisis soit parce qu'ils ont une pertinence biologique (fonction, expression), soit parce qu'ils sont localisés dans une région liée à la pathologie étudiée, puis sont séquencés afin de vérifier s'ils sont porteurs de mutations délétères. Par cette approche, il a été possible de découvrir les gènes *NLGN3*, *NLGN4X* et *SHANK3*, trois gènes aujourd'hui bien caractérisés et dont le rôle dans les TSA est avéré (Jamain *et al*, 2002; Durand *et al*, 2007). Pour qu'elles soient significatives, les études d'association nécessitent des échantillons de grandes tailles. Il est de plus nécessaire de valider les résultats obtenus dans des cohortes indépendantes. Lorsque le but est d'identifier des variations rares, les généticiens se tournent vers deux types de variations génétiques : les SNV dont la fréquence ne dépasse pas les 1% et les CNV principalement présents de façon unique chez les patients avec TSA. La sélection de ces marqueurs s'appuie sur les résultats de séquençages de gènes candidats, d'exomes et de génomes entiers pour les SNV et les CNV et également sur les données de puces à ADN et de CGH pour les CNV.

Différentes études ciblées sur des gènes contenus dans la région 7q31-36 ont démontré une association de *UBE2H* (Vourc'h *et al*, 2003), *GRM8* (Serajee *et al*, 2003) et *En2* (Gharani *et al*, 2004; Benayed *et al*, 2005; Wang *et al*, 2008) avec les TSA. Grâce à une analyse de grande envergure du génome réalisé sur 2 cohortes, 4 régions précédemment mises en évidence sur 8 testées ont été répliquées confirmant le rôle des gènes *NRXN1*, *CNTN4* et *UBE3A* dans la vulnérabilité des TSA (Glessner *et al*, 2009). Pour les mêmes raisons que celles évoquées pour les études de liaison, la plupart des premières études de type GWAS (Genome wide analysis study) ne sont pas parvenues à détecter d'associations avec un seuil de significativité pangénomique (Anney *et al*, 2012). Les difficultés à identifier les variants communs aux TSA s'expliquent par leur faible effet. Selon une étude, pour détecter ces variants, il faudrait réunir des échantillons de 15 000 à 20 000 individus dans chacune des populations cas et témoins (Devlin *et al*, 2011). Plus récemment, une méta-analyse réalisée sur génome entier a été menée sur une cohorte d'environ 18 000 patients et d'environ 28 000 individus contrôles. Sur approximativement 9 000 marqueurs testés, seuls 5 ont atteint le seuil de significativité requis pour ce type d'analyses (Grove *et al*, 2019). D'autres solutions pour améliorer la détection des facteurs de risque pour les TSA par les analyses de liaison et d'association incluent l'étude de populations plus homogènes phénotypiquement ou la prise en compte de traits quantitatifs comme le QI ou la SRS (Hu *et al*, 2011; Lowe *et al*, 2016).

Un grand intérêt s'est aussi porté sur les mutations *de novo* car, en général, elles ont un fort impact sur le phénotype du fait qu'elles n'aient pas encore été soumises à la pression de sélection négative permettant de les éliminer de la population. Ces dernières représenteraient environ 9,5% des facteurs de risques pour les TSA (Huguet *et al*, 2016).

Les mutations ponctuelles *de novo* entraînant une disruption du gène touché ont, en particulier, une plus forte occurrence chez les patients avec TSA que chez leurs frères et sœurs non atteints (Huguet *et al*, 2016). Les CNV *de novo* apparaissent également en excès chez les patients, avec un taux de 5 à 15% contre 1 à 2% pour la population générale (Marshall *et al*, 2008; Sebat *et al*, 2010; Sanders *et al*, 2011), ce qui les rend d'autant plus intéressantes à étudier. De nombreux gènes candidats ont été mis en évidence grâce à leurs analyses. En particulier, une étude réalisée sur 1256 trios génotypés à l'aide de puces a permis d'identifier entre autres un CNV de type délétion dans *SHANK2* chez deux patients, un CNV de type délétions dans *SYNGAP1* chez une patiente et un CNV de type duplication dans *DLGAP2* chez un patient (Pinto *et al*, 2010). Aucune de ces mutations n'a été retrouvée chez les 1287 individus contrôles testés ce qui témoigne, malgré l'absence de significativité de ces résultats, d'un potentiel rôle de ces gènes dans le développement des TSA. On peut également citer les gènes *ANKRD11*, *DPP6*, *DDP10*, *DPYD*, *NLGN*, *SHANK3* et *NRXN1* (Marshall *et al*, 2008). Le risque associé à un CNV est généralement corrélé positivement par sa taille, un large CNV touchant un plus grand nombre de gènes (Girirajan *et al*, 2011).

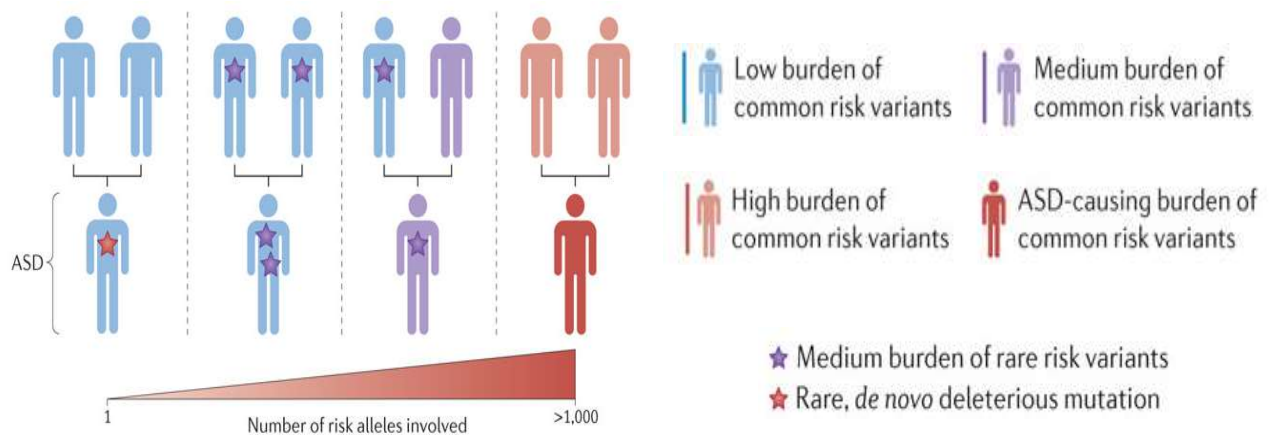
Actuellement, les séquençages d'exomes et de génomes entiers sont privilégiés pour découvrir de nouvelles mutations et de nouveaux gènes car ces techniques permettent de générer un grand nombre de données sans nécessité d'hypothèses sous-jacentes. C'est grâce à ce type d'analyses haut débit que des mutations ont été identifiées dans 33 gènes, certains déjà connus pour augmenter les risques de TSA et 7 encore totalement inconnus (De Rubeis *et al*, 2014). Chaque année, de nouveaux facteurs de risque génétiques sont identifiés grâce aux séquençages d'exome et de génome. Ces dernières années, les gènes *FDG6*, *JAK*, *MAPK7*, *SRPR*, et bien d'autres, se sont ainsi ajoutés à la liste des gènes candidats pour les TSA (Yuen *et al*, 2017; Thongnak *et al*, 2018; Jiao *et al*, 2020; Satterstrom *et al*, 2020)

c. Proposition d'un modèle génétique

Les connaissances apportées par les études génétiques ont fait ressortir la complexité et l'hétérogénéité de la génétique des TSA. Aujourd'hui, il n'y a donc pas un mais plusieurs modèles permettant d'expliquer l'origine des TSA d'un point de vue génétique (figure 5).

Dans certains cas, la présence d'une seule mutation apparue *de novo* est suffisante pour faire apparaître un phénotype autistique. Dans ce cas, la mutation a un caractère délétère avec un fort impact

sur le phénotype (figure 5). Parfois, le développement d'un TSA résulte de la combinaison de deux ou plusieurs variants rares hérités ayant un effet plus modeste. Exprimés individuellement, ces variants ne sont pas suffisants pour déclencher un TSA, le risque augmente par des effets additifs provoqués par leur co-occurrence (figure 5). Comme cela a été évoqué, l'essentiel de la vulnérabilité des TSA peut être attribuée aux variants communs ayant un faible impact. Ainsi, dans d'autres cas correspondant aux modèles dits polygéniques, les TSA ont pour origine une accumulation de variants communs dont les effets combinés peuvent ou non favoriser le développement des TSA (figure 5). Le fond génétique joue un rôle très important car une même mutation pourra être ou non à l'origine de TSA selon le fond génétique porté par l'individu. Il est important de retenir, que ces différentes situations font partie d'un



continuum comprenant des contextes intermédiaires (figure 5).

Figure 5 : Architecture génétique des TSA

Différents modèles sont actuellement proposés pour exposer les diverses origines génétiques des TSA. Ils font intervenir à la fois des variants de novo, des variants rares hérités ayant un impact plus ou moins fort sur le phénotype et des variants communs hérités dont les effets sont en général plus faibles. Le fond génétique permet de tamponner ou non l'effet d'un variant à faible impact. Figure adaptée de Bourgeron, 2015

d. Catégorie des gènes mutés et voies biologiques associées

D'après la base de données élaborée par la SFARI (Simons foundation autism research initiative), on dénombre aujourd'hui 913 gènes potentiellement impliqués dans les TSA et classés dans 4 groupes illustrant le degré de pertinence scientifique qui leur est accordé. L'analyse de la fonction de tous ces gènes et de la façon dont ils interagissent ensemble a permis de voir émerger certaines catégories de gènes assurant des rôles similaires ou complémentaires et participant à des voies cellulaires et fonctionnelles communes.

i/ Gènes synaptiques

Un grand nombre de mutations identifiées chez les patients avec TSA sont localisées dans des gènes exprimés au niveau de la synapse et, plus particulièrement, au niveau de la densité post-synaptique (Pinto *et al*, 2014; De Rubeis *et al*, 2014).

Les premières mutations suggérant un rôle de la synapse dans les TSA ont été identifiées au laboratoire dans les gènes codant la Neuroligine 3 et 4 (Jamain *et al*, 2003). D'autres mutations dans ces gènes ont été détectés par différentes équipes (Laumonier *et al*, 2004; Yan *et al*, 2005). Les gènes codant les Neurexine 1, 2 et 3 ont par la suite été ajoutés à la liste des gènes synaptiques à risque pour les TSA, grâce à l'identification de mutations chez différents patients issus de familles indépendantes (Kim *et al*, 2008; Wang *et al*, 2018). Neuroligine et Neurexine interagissent au niveau des synapses afin d'assurer la liaison entre deux cellules adjacentes. Lorsque ces protéines sont mutées sur des modèles de souris, ces dernières développent des altérations de leur comportement social ce qui consolide leur rôle dans l'apparition des TSA. D'un point de vue fonctionnel, les Neurexines et Neuroligines sont importantes pour la balance E/I. La Neuroligine 2 semble intervenir, plus particulièrement, dans la composante inhibitrice. En effet, une baisse des protéines exprimées dans les synapses inhibitrices ainsi qu'une diminution des courants inhibiteurs ont été observés chez des souris invalidées pour ce gène (Chubykin *et al*, 2007; Gibson *et al*, 2009; Jedlicka *et al*, 2011). Les effets inverses sont obtenus lorsque la Neuroligine 2 est surexprimée (Hines *et al*, 2008; Kohl *et al*, 2013).

Une autre famille de protéines d'adhésion cellulaire intéressante est celle des Contactines composées de 6 membres. Une étude génétique menée au laboratoire a montré que les mutations retrouvées dans les gènes *CNTN5* et *CNTN6* sont plus fréquentes chez les patients avec TSA que dans la population générale (Mercati *et al*, 2016). D'autre part, sur le plan clinique, les patients porteurs de mutations au sein du gène *CNTN6* développent plus souvent des hypersensibilités auditives de type hyperacousies (Mercati *et al*, 2016). Ces protéines jouent un rôle sur différents aspects de la neuritogenèse. Ainsi, la surexpression des *CNTN4* et *CNTN6* induit une augmentation de la longueur des neurites tandis que celle des *CNTN5* augmente l'arborisation des neurites (Mercati *et al*, 2013).

De façon attendue, une grande diversité de récepteurs est également représentée dans les facteurs de risques pour les TSA. A titre d'exemple, le gène *GRIN2B* codant une sous-unité d'un récepteur glutamatergique fait partie des gènes les plus fréquemment associés au TSA d'après la base de données de la SFARI. Plusieurs études portant sur ce gène suggèrent qu'il serait impliqué dans la formation des dendrites (Üner *et al*, 2015; Sceniak *et al*, 2019). Un autre gène souvent détecté lors des analyses génétiques est *CACNA1C* (Lu *et al*, 2012; Jiang *et al*, 2013). Ce dernier code une sous-unité des canaux calciques de type L et jouerait un rôle dans la plasticité synaptique et la prolifération cellulaire (Moosmang *et al*, 2005; Striessnig *et al*, 2006; Völkening *et al*, 2017). De plus, lorsque des souris portent des mutations dans ce gène, elles présentent des déficits de communication et d'interactions sociales (Bader *et al*, 2011). Ces deux gènes cités font partie d'un groupe beaucoup plus large de gènes codant

des récepteurs à risque pour les TSA parmi lesquels on retrouve : *GABRA3* (Piton *et al*, 2013), *GABRB3* (Cook *et al*, 1998; Satterstrom *et al*, 2020), codant deux sous-unités de récepteurs GABAergiques, *CACNA2D3* codant une autre sous-unité de récepteurs calciques (Iossifov *et al*, 2012; De Rubeis *et al*, 2014; Satterstrom *et al*, 2020), ainsi que *SCN1A* codant une sous-unité de récepteurs sodiques voltage-dépendants (Weiss *et al*, 2003; Satterstrom *et al*, 2020).

Un lien a également été établi entre les protéines synaptiques régulées par la protéine FMR1 et la vulnérabilité des TSA (Ronemus *et al*, 2014). Cette protéine est impliquée dans la régulation de plusieurs centaines de gènes synaptiques en réponse à l'activité des récepteurs mGluR5 (Aschrafi *et al*, 2005). Lorsqu'elle est absente, une augmentation de l'expression de ces gènes est observée dont la plupart sont des facteurs de risque pour les TSA (Darnell *et al*, 2011). Cela induit de plus des anomalies des propriétés électriques des neurones dont une altération de leur excitabilité (Deng *et al*, 2013).

Dans cette catégorie figurent également des gènes codant des protéines d'échafaudage dont la famille des gènes *SHANK*. Pour plus de détails, la partie 2 de ce manuscrit leur sera consacrée.

ii/ Remodelage de la chromatine

Afin d'identifier de nouvelles fonctions biologiques impliquées dans les TSA, plusieurs équipes ont entrepris des tests d'enrichissement. Ce type d'analyse permet d'évaluer le taux d'agrégation de certains groupes de gènes parmi les facteurs génétiques à risque pour les TSA, précédemment mis en évidence lors des études génétiques.

Grâce à cette méthodologie, il a été possible de découvrir un enrichissement de gènes codant des protéines liées au remodelage de la chromatine (Ronemus *et al*, 2014; De Rubeis *et al*, 2014). Notamment, les modificateurs d'histone assurant une activité de transfert de méthyle sur les lysines des histones apparaissent significativement enrichis (De Rubeis *et al*, 2014).

D'autre type de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine ont attiré l'attention de certaines équipes. Le gène *CHD8*, par exemple, code une protéine capable de lire les marques épigénétiques déposées par les modificateurs d'histones, ce qui entraîne une ouverture de la chromatine suggérant un rôle prépondérant de cette protéine dans l'expression génique. Des mutations de type non-sens ou de décalage du code de lecture ont été retrouvées dans ce gène chez 0,2% des patients avec TSA. Ces mutations ont été identifiées par plusieurs études génétiques indépendantes (Roak *et al*, 2012; De Rubeis *et al*, 2014). La suppression de *CHD8* s'accompagne d'une diminution de l'expression de nombreux gènes appartenant aux voies développementales et connus pour augmenter le risque de développer un TSA (Sugathan *et al*, 2014). Chez le poisson zèbre, cela induit également une augmentation de la taille du cerveau, une caractéristique fréquemment observée chez les patients avec TSA et de façon plus marquée chez ceux porteurs de mutations dans *CHD8* (Roak *et al*, 2012; Sugathan *et al*, 2014).

En raison de leur rôle dans la régulation de l'expression génique, ces protéines sont importantes lors de différents aspects du développement dont la croissance du cerveau ainsi que dans l'apparition de certaines maladies neuropsychiatriques (Kuehner *et al*, 2019).

iii/ Autres voies biologiques associées aux TSA

D'autres voies ont été associées aux TSA comme la voie mTOR impliquée dans la traduction protéique, les voies liées à la dégradation des protéines ainsi que la voie sérotoninergique (Huguet *et al*, 2016).

Des facteurs de risque génétiques codant des protéines appartenant à chacune de ces voies ont été identifiés lors de différentes études génétiques : *PTEN* pour la voie mTOR (Butler *et al*, 2005; De Rubeis & Buxbaum, 2015; Satterstrom *et al*, 2020), *UBE3A* pour les voies liées aux dégradations des protéines (Glessner *et al*, 2009; Yuen *et al*, 2015) et *ASMT* pour la voie sérotoninergique (Cai *et al*, 2008; Nava *et al*, 2014).

2- Facteurs environnementaux

Comme cela a été précédemment expliqué, les TSA possèdent une forte composante génétique mais leurs développements reposent également sur la présence de facteurs environnementaux non négligeables. La contribution de ces facteurs peut être démontrée par les études de jumeaux dont les taux de concordance entre jumeaux monozygotes n'atteignent pas les 100%. La recherche reliée à l'étude des interactions gènes – environnement s'est accrue ces dernières années du fait de l'observation d'une augmentation des cas de TSA.

Les TSA étant des troubles neurodéveloppementaux, l'environnement peut agir dès la période prénatale. Il a par exemple été montré que la survenue d'infection pendant la grossesse est associée à un risque plus élevé d'apparition de TSA chez l'enfant (Atladóttir *et al*, 2012; Lee *et al*, 2015a). Ces résultats sont très controversés car beaucoup d'études ont relevé, une absence d'association entre une infection prénatale et les TSA (Zerbo *et al*, 2017; Mahic *et al*, 2017). Il s'avère, en fait, que ce risque dépend de la nature de l'infection, de sa durée et de sa sévérité (Jiang *et al*, 2016). Ce risque pourrait être lié au système immunitaire de la mère ainsi qu'à celui du fœtus (Grabrucker, 2013). En effet, lors d'une infection il peut y avoir des modifications du taux circulant de certaines cytokines, capables de s'introduire dans le système nerveux central et causer des altérations de la plasticité synaptique. Il a notamment été observé que l'interleukine 1 agit sur les récepteurs α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisoazol-4-Propionate-Acide (AMPA) et les récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) (Liu *et al*, 2013b; Taoro-González *et al*, 2019) ainsi que sur le niveau de glutamate relargué en pré-synaptique (Gonzalez *et al*, 2013). Des taux anormalement élevés de lymphocytes T ont également été récemment détectés sur

des coupes de cerveaux post-mortem de patients avec TSA (DiStasio *et al*, 2019). Ces observations s'accompagnent d'un endommagement de la barrière hématoencéphalique et des astrocytes localisés près des vaisseaux sanguins probablement causé par une action des lymphocytes T accumulés dans le cerveau des patients (DiStasio *et al*, 2019).

Un autre facteur environnemental important à prendre en compte est l'apport en zinc (Grabrucker, 2013). Une baisse en ion zinc favoriserait la survenue de crises épileptiques fréquemment associées aux TSA (Kheradmand *et al*, 2014; Chen *et al*, 2019), et serait associé à une baisse de la synthèse de la mélatonine à l'origine des perturbations du sommeil souvent observées chez les patients avec TSA (Bediz *et al*, 2003). Le zinc est de plus étroitement lié à certaines protéines impliquées dans les TSA. C'est notamment le cas de SHANK2 et SHANK3 se liant au zinc par l'intermédiaire de leur domaine SAM (Baron *et al*, 2006). Ces protéines sont régulées par le zinc et ce dernier est aussi nécessaire pour certaines de leurs fonctions. Il intervient, par exemple, dans leur adressage et leur assemblage à la synapse (Baron *et al*, 2006), et participe à la signalisation trans-synaptique dépendante des protéines SHANK (Arons *et al*, 2016). D'un point de vue cellulaire, le zinc provoquerait des altérations de la différenciation et de la maturation neuronale (Pfaender *et al*, 2017). Le zinc n'est pas le seul élément minéral impliqué dans l'augmentation du risque d'apparition des TSA. Le fer s'ajoute à la liste des facteurs de risques de par son rôle dans le développement cérébral (Schmidt *et al*, 2014). Ces nutriments étant diminués chez la mère pendant plusieurs mois après une naissance, une deuxième grossesse arrivant trop rapidement pourrait entraîner un environnement néfaste pour le développement du fœtus (Cheslack Postava & Winter, 2015).

L'âge des parents au moment de la conception constitue un autre facteur de risque pour le développement des TSA. Lorsque le père est à un âge avancé au moment de la conception, il y a en effet un risque plus fort d'apparition de SNV ou de CNV *de novo*. L'âge de la mère est également associé à un risque de TSA mais ce dernier est plus faible par rapport à l'âge du père et existe aussi lorsque la mère est trop jeune (Sandin *et al*, 2013, 2016). La présence de certaines pathologies maternelles comme le diabète ou l'hypertension a aussi été mise en cause dans les TSA (Wan *et al*, 2018; Maher *et al*, 2018). Ces pathologies, plus fréquentes chez les femmes âgées de plus de 40 ans, pourraient ainsi expliquer l'association établie entre l'âge avancé de la mère et les TSA (Modabbernia *et al*, 2017).

D'autres facteurs de risque pour le développement de TSA sont la présence de toxines dans l'environnement, la survenue de stress prénatal ainsi que la prise de certains médicaments pendant la grossesse (Grabrucker, 2013). L'effet du valproate, une molécule principalement prescrite pour ses propriétés anticonvulsantes a particulièrement été beaucoup étudié dans le cadre des TSA. Plusieurs analyses d'association ont révélé que ce traitement augmente le risque de développer un TSA (Christensen *et al*, 2014; Bromley *et al*, 2014). Le valproate a également une incidence négative sur les

fonctions cognitives (Meador *et al*, 2009). De plus, lorsque des souris sont exposées au valproate pendant la période de gestation, celles-ci donnent naissance à des souriceaux développant des comportements caractéristiques des TSA, comme des problèmes d'interactions sociales et des stéréotypies (Moldrich *et al*, 2013; Kataoka *et al*, 2013). Ces résultats sont reproduits chez le singe qui présente en outre une attention plus prononcée lors de stimuli non sociaux (Zhao *et al*, 2019). Le valproate est un inhibiteur de l'histone désacétylase HDAC et pourrait ainsi agir en altérant le statut épigénétique de nombreux gènes impliqués dans le neurodéveloppement (Phiel *et al*, 2001). L'analyse du profil d'acétylation observé sur des cerveaux post-mortem de patients avec TSA va dans ce sens (Sun *et al*, 2016). D'autres études ont, par ailleurs, mis en évidence que deux voies de signalisation sont profondément impactées suite à une exposition au valproate : la voie Wnt impliquée dans la différenciation des neurones corticaux (Wiltse, 2005) et la régionalisation du cortex, ainsi que la voie β -Caténine/Ras/ERK intervenant dans la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices neurales (Jung *et al*, 2008).

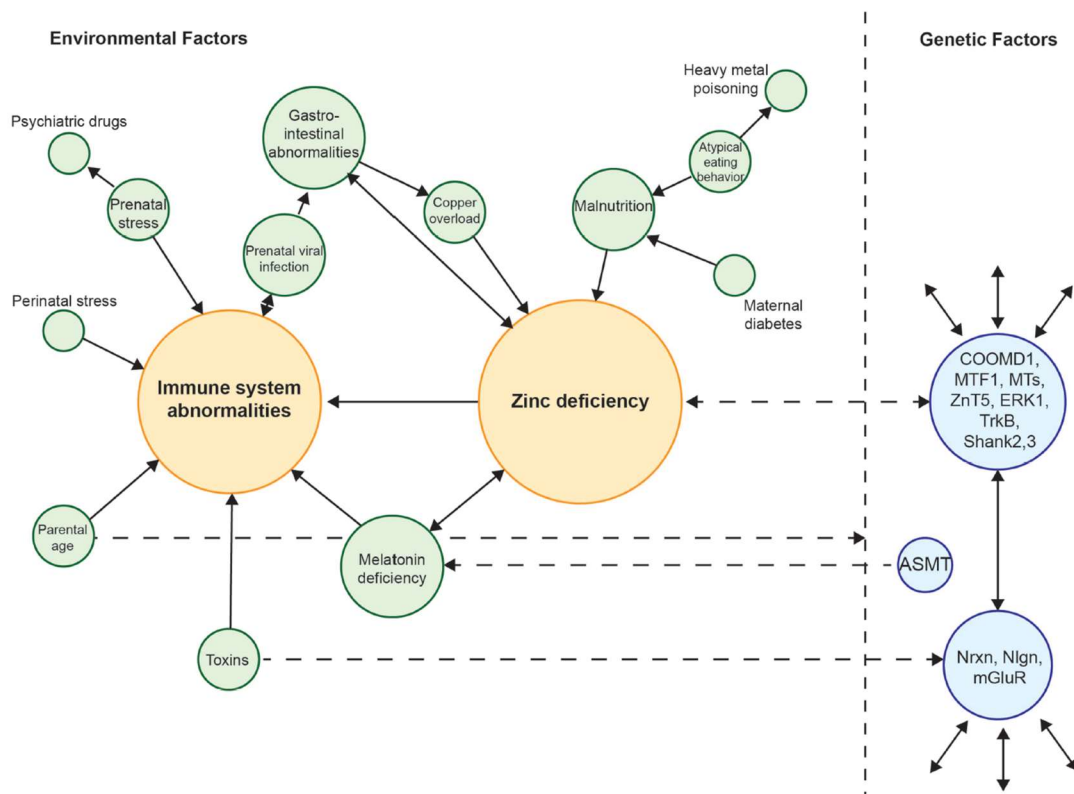


Figure 6 : Facteurs environnementaux impliqués dans les TSA

De nombreux facteurs environnementaux augmentent le risque de développer un TSA. Deux catégories particulièrement étudiées concernent les anomalies du système immunitaire et les carences en zinc. Ces dernières sont susceptibles d'agir sur d'autres facteurs environnementaux exerçant un risque additionnel pour les TSA. Ce schéma illustre également l'interaction existant entre les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques. Figure issue de Grubruker, 2013

Il est également important de noter que tous ces facteurs s'auto influencent. Ainsi, un niveau bas en zinc favorise les réponses inflammatoires suite aux infections et induit un déséquilibre du système

immunitaire, en altérant la production et le relargage des molécules médiatrices du SI comme les cytokines (Summersgill *et al*, 2014; Wong *et al*, 2017). Au niveau cellulaire, cela peut s'accompagner d'une baisse du développement des macrophages ainsi que des lymphocytes B et T (Grabrucker, 2013). De plus, les cas de déficit en zinc peuvent être causés par des événements de malnutrition, qui à leur tour peuvent être générés par diverses situations, telles que la présence d'un diabète maternel ou de troubles de l'alimentation (Grabrucker, 2013). Le système immunitaire est aussi impacté par les taux de mélatonine et par la présence de toxines dans l'environnement (Xia *et al*, 2012; Stølevik *et al*, 2013). Enfin, un lien évident existe également entre les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques. Par exemple, parmi les gènes à risque pour les TSA, on peut citer ceux codant des protéines impliquées dans la synthèse de la mélatonine et ceux codant des protéines intervenant dans les voies de signalisations liées au zinc (Arons *et al*, 2016; Benabou *et al*, 2017). D'autres exemples de ces interactions entre facteurs sont illustrés dans la figure 6.

Bien souvent, les facteurs environnementaux décrits ci-dessus ne sont pas suffisants pour initier à eux seuls le développement de TSA. Lorsqu'ils apparaissent de façon unique, ils apportent un risque pour le développement d'un TSA et lorsqu'ils agissent ensemble ou s'expriment dans un contexte génétique particulier, ce risque augmente. C'est ainsi la combinaison et l'interaction des facteurs génétique et environnementaux qui favorisent le développement d'un TSA.

III SHANK3 et épines dendritiques

A) Présentation de la famille SHANK

SHANK3 appartient à la famille des gènes *SHANK* comportant aussi *SHANK1* et *SHANK2*. Cette famille de gènes code des protéines d'échafaudages exprimées au niveau de la densité post-synaptique (PSD) des synapses excitatrices glutamatergiques (Boeckers *et al*, 2002). Ces protéines participent à l'organisation d'une centaine de protéines à la synapse. En particulier, elles permettent de connecter des protéines synaptiques tel que des récepteurs ou des canaux à la fois entre elles, mais également au cytosquelette d'actine (Boeckers *et al*, 2002). Ces interactions peuvent être directes ou bien s'établir grâce à des protéines adaptatrices. Les protéines SHANK sont également reliées à certaines molécules signalisatrices.

Ce sont des protéines de taille importante. Elles sont formées par plus de 200 AA et leur poids moléculaire dépasse les 200 KDa (Sheng & Kim, 2000). Leur forme longue partage 5 domaines protéiques : le domaine de répétition d'ankyrines (ANK), le domaine « SRC homology 3 » SH3, le domaine PSD-95/DLG/ZO1 (PDZ), un domaine riche en proline (Pro) ainsi que le domaine Steril Alpha Motif (SAM) (Naisbitt *et al*, 1999). Chacun de ces domaines est nécessaire pour assurer les différentes

fonctions des protéines SHANK (figure 7). Ils sont notamment impliqués dans les interactions protéines-protéines et permettent ainsi aux protéines SHANK3 d'interagir avec plus de 30 protéines synaptiques (Jiang & Ehlers, 2013).

- Le domaine de répétition ANK est composé de 6 répétitions de 30 acides aminés organisés en hélices et séparées par des boucles d'environ 4 acides aminés (d'après <https://www.uniprot.org/>). Les domaines ANK des protéines SHANK interagissent avec certaines protéines régulatrices du cytosquelette d'actine comme, par exemple, la protéine α -Fodrin (Böckers *et al*, 2001) et pourraient avoir un rôle, par ce biais, sur le développement et la maturation des épines dendritiques. Les protéines Sharpines se lient également aux protéines SHANK grâce à une interaction entre leur extrémité N-terminale et le domaine ANK (Lim *et al*, 2001). Ces protéines ont, de plus, la possibilité de se dimériser par le biais de leur extrémité C-terminal et pourraient de ce fait permettre la formation d'un réseau de protéines SHANK au niveau de la synapse (Lim *et al*, 2001).
- Le domaine SH3 est constitué d'environ 50 à 60 acides aminés organisés en 2 feuillets béta (l'un constitué de 2 brins antiparallèles et l'autre constitué de 3 brins antiparallèles) perpendiculaires (d'après <https://www.ebi.ac.uk/interpro>). Les protéines SHANK sont en interaction grâce à ce domaine avec les protéines GRIP (Glutamate receptor interacting protein) et permettent ainsi la concentration et la stabilité des récepteurs glutamatergiques à la synapse. Les protéines GRIP sont, en effet, elles-mêmes en interaction avec la sous-unité GluR2 des récepteurs glutamatergiques AMPA (Dong *et al*, 1997).
- Le domaine PDZ se lie à un grand nombre de protéines synaptiques. L'interaction se fait via une séquence consensus X-S/T-S-L présente dans les protéines cibles (Im *et al*, 2003). Ce dernier permet notamment aux protéines SHANK de se lier aux protéines de la famille GKAP (Guanylate kinase-associated protein) (Naisbitt *et al*, 1999). Les protéines GKAP servent ainsi d'intermédiaire entre les protéines SHANK, et les protéines PSD95 et Stargazine qui interagissent respectivement avec les récepteurs NMDA et AMPA (Naisbitt *et al*, 1999; Chen *et al*, 2000; Bats *et al*, 2007). Les protéines PSD95 contribuent, de plus, à la stabilisation de la synapse en se liant avec les Neuroligines (Irie *et al*, 1997). Une interaction directe entre les récepteurs AMPA et le domaine PDZ de SHANK3 a aussi été mise en évidence (Uchino *et al*, 2006). En outre, les protéines SHANK peuvent utiliser leur domaine PDZ pour se lier entre elles et former des multimères (Im *et al*, 2003).
- Le domaine Pro est un domaine de grande taille comportant deux régions situées à ses extrémités riches en résidus proline et résidus sérine. Ce domaine interagit, d'une part, avec la protéine

HOMER qui permet d'assurer une interaction indirecte entre les protéines SHANK et les récepteurs glutamatergiques métabotropiques 1 et 5 (Brakeman *et al*, 1997; Tu *et al*, 1999). D'autre part, le domaine se lie également avec la Cortactine, une protéine connue pour se fixer sur les filaments d'actine et exprimée au niveau des cônes de croissance, ainsi que dans les lamellipodes (Macgillavry *et al*, 2016).

-
- Le domaine SAM est composé d'environ 70 acides aminés organisés en hélice alpha (d'après <https://www.ebi.ac.uk/interpro>). C'est grâce à ce domaine qu'une auto-dimérisation zinc dépendante des protéines SHANK est possible (Naisbitt *et al*, 1999). Il est également essentiel pour leur adressage à la synapse (Boeckers *et al*, 2005).
-

SHANK3 et ses domaines protéiques



SHANK3 et organisation de la synapse glutamatergique

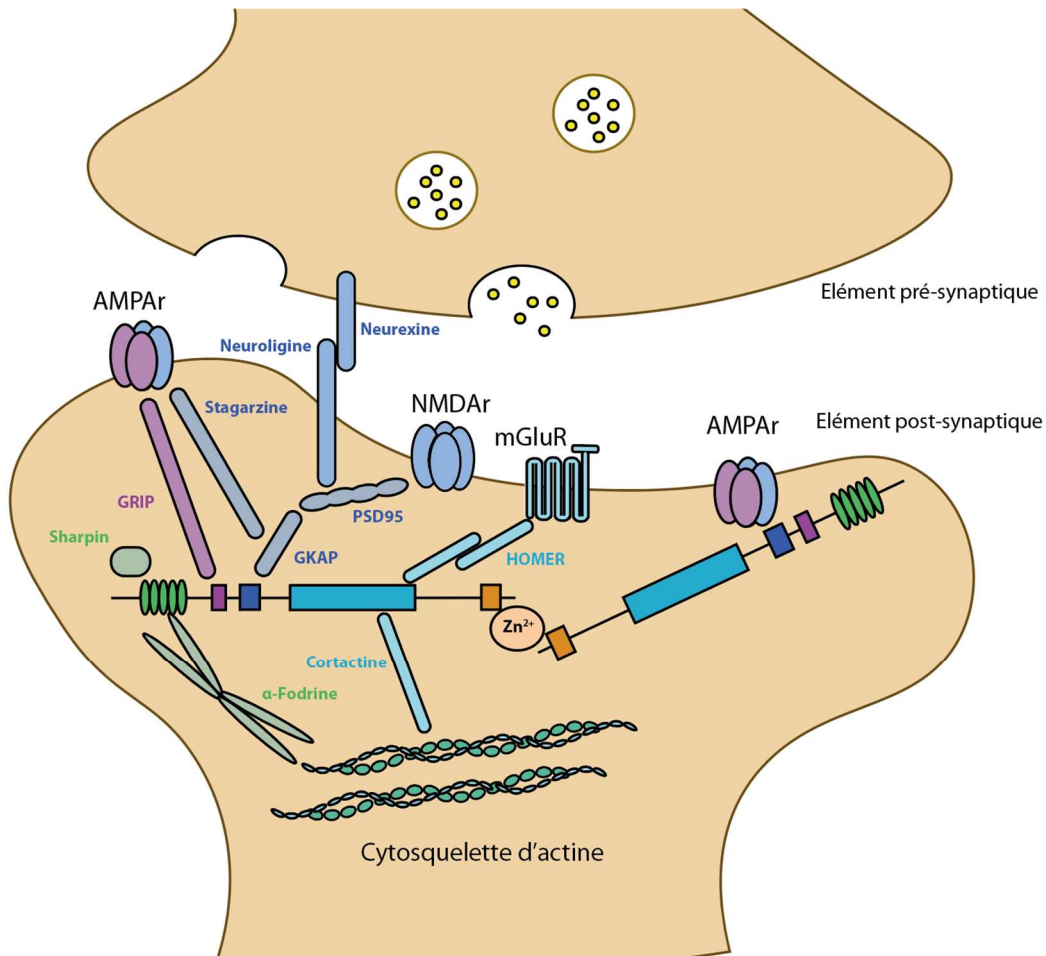


Figure 7 : SHANK3 et organisation de la synapse

En tant que protéine d'échafaudage, SHANK3 interagit avec un grand nombre de protéines synaptiques. Ces interactions font intervenir les différents domaines de SHANK3 qui se lient de façon spécifique aux protéines synaptiques dont certaines autres protéines d'échafaudage comme les protéines GRIP, HOMER, GKAP ou encore PSD95. Celles-ci permettent une interaction indirecte entre SHANK3 et les divers récepteurs, bien que des interactions directes entre SHANK3 et certains récepteurs soient parfois possibles. La spécificité des interactions est représentée par un code couleur reliant les domaines de SHANK3 avec les protéines se liant à ces derniers. SHANK3 se lie également à des protéines du cytosquelette ainsi qu'à des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette.

B) Expression des protéines SHANK

1- Expression spatiale au niveau tissulaire

Peu d'informations existe sur la localisation des protéines SHANK chez l'humain. L'essentielle de cette partie repose donc sur les données obtenues sur le modèle de rongeurs.

L'ensemble des membres de la famille Shank est exprimé au niveau du cerveau. On les retrouve en particulier au niveau du cortex, du thalamus et de l'hippocampe (Lim *et al*, 1999; Böckers *et al*, 2004). Les trois protéines sont également présentes dans le cervelet, plus particulièrement dans les cellules de Purkinje pour Shank1 et Shank2, et dans les cellules granulaires pour Shank3 (Böckers *et al*, 2004). Shank1 est également exprimé au niveau de l'amygdale, de l'hypothalamus et de la substance noire tandis que Shank2 apparaît exprimé au niveau du bulbe olfactif et de la substance grise (Böckers *et al*, 2004). Concernant Shank3, une expression a également été mise en évidence au niveau du striatum (Böckers *et al*, 2004; Peça *et al*, 2011). Alors que Shank1 est spécifiquement exprimé dans le cerveau (Lim *et al*, 1999), Shank2 et Shank3 ont été détectés dans divers autres organes périphériques. Shank3 est retrouvé dans toutes les régions de l'organisme notamment de manière abondante au niveau du cœur et de façon moindre dans la rate tandis que Shank2 peut être détecté dans les reins et le foie (Lim *et al*, 1999).

Quelques données relatives à l'expression des protéines SHANK chez l'humain sont fournies par des bases de données comme « Uniprot » ou « The human protein atlas ». Cette dernière indique notamment une expression prépondérante de SHANK3 au niveau du cerveau ainsi qu'une détection plus ou moins forte dans les autres tissus périphériques (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000251322-SHANK3/tissue>).

2- Régulation de l'expression des gènes SHANK

La famille des gènes *SHANK* possède une très grande variabilité au niveau de ses transcrits. L'étude de ces transcrits et des protéines associées est de ce fait complexe. Cette complexité réside dans l'existence de promoteurs alternatifs et de la présence d'un épissage alternatif élevé. Il existe ainsi plusieurs isoformes pour chacun des membres de cette famille. Chez la souris, 6 promoteurs alternatifs

ont été mis en évidence dans la séquence du gène *Shank3* et 8 exons sont concernés par l'épissage alternatif (Wang *et al*, 2014). Ainsi, 6 isoformes principales pour *Shank3* sont décrites chez la souris dans la littérature tandis que chez l'humain il est encore difficile de les appréhender. Selon une étude, la forme humaine de *SHANK3* comporterait 6 promoteurs alternatifs ainsi que 4 exons pouvant être épissés (Zhu *et al*, 2014). Les isoformes de *SHANK3* portent pour chacune d'entre elles une combinaison spécifique des domaines protéiques exprimés (Jiang & Ehlers, 2013). Une isoforme supplémentaire de *SHANK3* a été détectée par spectrométrie de masse dans des lignées cellulaires de cancer du colon (Benthani *et al*, 2015). Néanmoins aucune autre étude n'en a fait mention depuis.

En outre, il a été montré que chez l'humain, *SHANK3* est soumis à une forte régulation épigénétique se traduisant par la méthylation de certaines portions de l'ADN appelés îlots CpG. Il s'agit de régions marquées par une forte occurrence du dinucléotide CpG par rapport au reste du génome. L'expression différentielle de *SHANK3* entre les différents tissus est ainsi due à la présence de ces îlots CpG dans sa séquence nucléotidique, localisés plus particulièrement au niveau des promoteurs et de certains exons (Beri *et al*, 2007; Maunakea *et al*, 2010). L'analyse des séquences des gènes de la famille *SHANK* a permis de mettre en évidence 7 îlot CpG dans les séquences *SHANK1* et *SHANK2* humain et 5 pour les séquences de *SHANK3* humain (figure 8). Chez *SHANK3* chaque îlot est associé à un domaine différent et ne présente pas le même degré de méthylation en fonction des tissus (figure 8, Ching *et al*, 2005; Beri *et al*, 2007). Des observations similaires ont été effectuées chez la souris. Par exemple, les isoformes A et E de *Shank3* sont exprimés dans la majorité des structures cérébrale à l'exception du cervelet où leur expression est plus modérée. L'expression des isoformes *Shank3c* et *Shank3d* est complémentaire avec une forte expression dans le cervelet qui diminue dans les autres structures (Wang *et al*, 2014). Il est alors très probable que *SHANK3* ait un rôle spécifique au tissu dans lequel il est exprimé, qui dépendrait des domaines présents sur la protéine. Depuis les travaux de Wang *et al*, peu d'avancées ont été faites dans l'étude des isoformes de *SHANK3*.

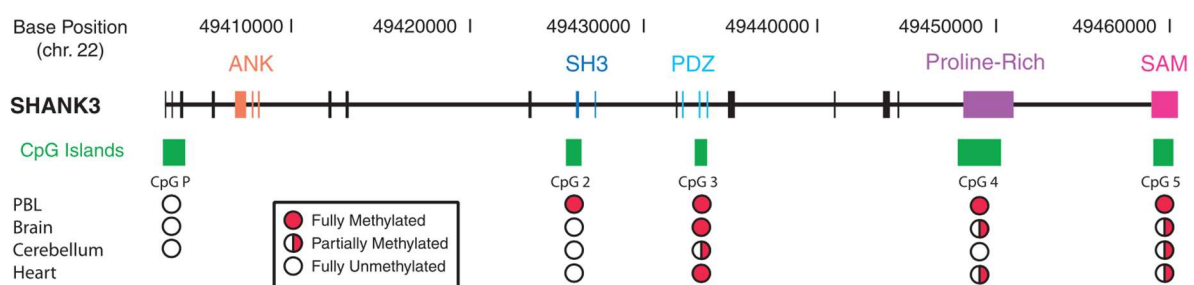


Figure 8 : Profil des îlots CpG et du niveau de méthylation sur le gène *SHANK3*

Le gène *SHANK3* est caractérisé par la présence de 5 îlots CpG répartis en amont du domaine ankyrines et chevauchant les 4 autres domaines de *SHANK3*. Ces derniers sont différemment méthylés selon les régions cérébrales et participent ainsi à la régulation spatiale de la transcription de *SHANK3*. Figure issue de Beri *et al*, 2007.

L'expression de Shank3 est également modulée par d'autres mécanismes dont celui impliquant l'intervention de micro ARNs (miARN). Il s'agit de petites molécules d'ARN capables de s'apparier avec une séquence d'ARN messenger puis, soit de bloquer sa traduction, soit de le détruire. Dans le cas de *Shank3*, une équipe a identifié trois miARN capables de se fixer sur la région 3'UTR de sa séquence et de réduire son expression : miR-7, miR-34a, et miR-504 (Choi *et al*, 2015). Pour le moment, très peu d'études ont porté sur les modes d'action impliqués dans la répression de Shank3 via les miARN, mais une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait à l'avenir ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques pour les patients avec TSA porteurs de mutations dans SHANK3.

Une régulation de SHANK3 existe aussi au niveau post-traductionnelle et est liée aux processus de dégradations protéiques médiées par les réactions d'ubiquitinations. Un acteur de ce type de modulation est la protéine USP8 capable d'enlever les motifs d'ubiquitination des protéines SHANK3 afin de stabiliser leur expression à la synapse (Campbell & Sheng, 2018).

3- Expression spatiale au niveau cellulaire

Au niveau cellulaire, comme précédemment décrit, les protéines SHANK sont majoritairement exprimées au niveau de la PSD. Toutefois, diverses études ont mis en évidence une distribution de Shank3 plus étendue. Ainsi Shank3 peut de surcroît être retrouvé au niveau du cône de croissance, au niveau duquel il interagit avec les filaments d'actine pour assurer leur polymérisation et la mobilité du cône (Durand *et al*, 2012). Une présence de Shank3 a aussi été détectée au niveau du soma et de l'axone des neurones (Halbedl *et al*, 2016). Concernant la localisation nucléaire de Shank3, les travaux de Wang *et al* ont démontré qu'elle était spécifique à l'isoforme Shank3b (Wang *et al*, 2014). Une étude publiée récemment a également mis en évidence une expression de SHANK3 au niveau de la jonction neuromusculaire et des sarcomères des muscles squelettiques striés (Lutz *et al*, 2020).

4- Expression temporelle

L'expression des protéines SHANK évolue au cours du développement. Selon les données accessibles sur le site de BrainSpan, SHANK3 est très peu exprimé lors des premières étapes de l'embryogenèse, son expression commençant à augmenter aux alentours des 37 semaines post-conception (figure 9). Elle reste relativement stable au cours du développement pré et post-natal et persiste à l'âge adulte. La cinétique d'expression de Shank3 est variable en fonction des isoformes. Celle-ci a été analysée sur une période de 12 mois chez la souris. Les profils d'expression des isoformes Shank3a et Shank3e révèlent ainsi un pic d'expression en plateau à partir de 10 jours qui se maintient pendant 4 semaines, tandis que l'expression des isoformes Shank3b, Shank3c et Shank3d augmente plus progressivement, leur valeur maximale étant toutes atteintes au bout de 4 semaines (Wang *et al*, 2014).

L'expression des 5 isoformes diminue ensuite aux alentours des 4 semaines post-conception (Wang *et al*, 2014).

Il a également été observé que l'expression de SHANK3 oscille lors du cycle circadien dans certaines régions du cerveau (striatum et hippocampe) et qu'elle était corrélée aux taux de mélatonine (Sarowar *et al*, 2016). Une autre étude a montré que SHANK3 participe à la régulation des facteurs de transcription de gènes impliqués dans le cycle circadien comme *PER3* ou *Nr1d1* avec lequel il est capable d'interagir (Ingiosi *et al*, 2019). Les auteurs de cette étude ont aussi constaté que les patients atteints du syndrome de Phelan McDerimid (PMDS) portant une délétion de SHANK3 ainsi que des souris, pour lesquelles l'exon 21 de Shank3 est délété, présentent des altérations de leur sommeil (Ingiosi *et al*, 2019). Ces observations suggèrent ainsi fortement que SHANK3 pourrait participer aux mécanismes moléculaires du cycle circadien ainsi qu'au développement des troubles du sommeil fréquemment observés chez les patients avec TSA.

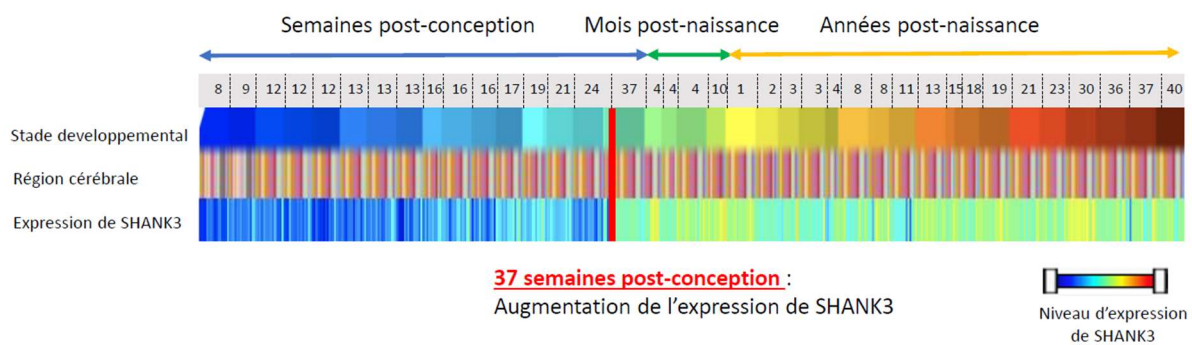


Figure 9 : Expression de SHANK3 au cours du développement chez l'humain

L'expression de SHANK3 varie pendant la période fœtale d'un individu. Celle-ci a été mesurée par le séquençage d'ARN extraits à partir de coupes de cerveaux post-mortem. Au total, 13 périodes du développement et 16 régions cérébrales ont été analysées. Le niveau d'expression de SHANK3 est indiqué par un code couleur et correspond aux valeurs RPKM. Ces résultats montrent que l'expression de SHANK3 est très faible lors des premières semaines suivant la conception et commence à augmenter à partir de la 37^{ème} semaine. Elle reste stable après la naissance. Données issues du site BrainSpan (<https://www.brainspan.org/rnaseq>)

C) SHANK et leur implication dans les troubles neuropsychiatriques

1- TSA et PMDS

Le gène *SHANK1*, composé de 24 exons, se situe au niveau du chromosome 19 et plus précisément dans la région 19q.13.33. Les mutations dans ce gène sont très rares dans le cadre de des TSA, puisque seulement 0,05% de patients sont porteurs de mutations dans *SHANK1* (Leblond *et al*, 2014).

Le gène *SHANK2* est retrouvé sur le chromosome 11 au niveau de la région 11q13.4. Il est composé de 25 exons et ses mutations sont retrouvées dans 0,2% des patients diagnostiqués autistes (Leblond *et al*, 2014).

Le gène *SHANK3* est localisé sur le chromosome 22 au sein de la région 22q13.3. Composé de 22 exons, il est muté chez environ 0,7% des patients avec TSA et jusqu'à 2% lorsque s'ajoutent des traits de déficiences intellectuelles (Leblond *et al*, 2014). Toutefois, ce chiffre est probablement fortement sous-estimé car le séquençage de ce gène est difficile. C'est en effet l'un des plus riche en bases G-C, il est donc souvent mal couvert lors des séquençages d'exomes et de génomes entiers. Les techniques de puce et de séquençage en Sanger sont alors privilégiées pour détecter ces mutations mais demandent un certain nombre d'optimisations (Leblond *et al*, 2014).

Selon les données de la SFARI, *SHANK3* fait partie des gènes dont le niveau de confiance est le plus élevé en raison de la significativité des résultats obtenus au cours de différentes analyses et de sa réplication dans diverses études. Il apparaît en particulier dans plus de 40 études génétiques appliquées aux TSA (<https://gene.sfari.org/database/human-gene/SHANK3>).

Depuis la découverte des premières mutations dans *SHANK3* au laboratoire en 2007 chez des patients avec TSA, de nombreuses nouvelles variations génétiques ont été et sont encore actuellement identifiées dans *SHANK3* (Leblond *et al*, 2014; Husson *et al*, 2020). Au total, la SFARI rapporte l'existence de 249 variants rares différents détectés dans la séquence de *SHANK3* auxquels s'ajoutent 9 variants communs (<https://gene.sfari.org/database/human-gene/SHANK3>).

Du fait du caractère délétère des mutations dans *SHANK3*, celles-ci apparaissent principalement *de novo*. Elles incluent des variants de type CNV, SNV non-sens/faux-sens ou encore de type insertions/délétions entraînant l'apparition d'un codon STOP prématuré (Leblond *et al*, 2014). Certaines mutations retrouvées dans *SHANK3* chez des patients avec TSA touchent également des sites d'épissage ou des îlots CpG (Boccutto *et al*, 2013).

Les études génétiques ont permis de révéler que les trois gènes de la famille *SHANK* sont retrouvés mutés chez les patients avec TSA. La sévérité du phénotype engendré n'est toutefois pas équivalente entre les différents membres de la famille *SHANK*. En effet, les patients mutés sur *SHANK3* sont caractérisés par une déficience intellectuelle très sévère, tandis que les patients mutés sur *SHANK1* présentent que peu voire pas de déficiences intellectuelles. Les aptitudes cognitives des patients mutés sur *SHANK2* sont intermédiaires avec des déficiences intellectuelles plus modérées (Leblond *et al*, 2014). Les protéines codées par les gènes de la famille *SHANK* possèdent de nombreuses isoformes, dont le profil d'expression varie en fonction des tissus du cerveau. Partageant un certain nombre de domaines, ces isoformes pourraient, dans certains cas, se compenser mutuellement afin de moduler le degré de sévérité de certains symptômes.

Le cas d'une famille composée d'un garçon porteur d'une délétion de *SHANK3* et d'une fille porteuse d'une duplication de *SHANK3* a pointé l'importance du dosage de *SHANK3* dans l'établissement du phénotype. En effet, pour le garçon possédant une copie en moins du gène *SHANK3*, le trouble se caractérise par une déficience intellectuelle sévère associée à un retard de langage, tandis

qu'une copie supplémentaire du gène *SHANK3* chez sa sœur est associée au syndrome d'Asperger et à un langage développé (Durand *et al*, 2007).

De par sa localisation chromosomique, *SHANK3* a également été très étudié dans le cadre du syndrome PMDS dont la cause est une délétion localisée dans la région 22q13 (Phelan *et al*, 2001). Les délétions impliquées dans ce syndrome sont causées par diverses anomalies structurales du chromosome 22 apparaissant dans la région 22q13 : délétions simple, formation d'anneaux et translocations (Bonaglia *et al*, 2011). Bien que les délétions à l'origine du syndrome PMDS soient de nature très variable, *SHANK3* est absent chez la plupart des patients avec PMDS. Il contribue ainsi de façon non négligeable au développement des symptômes associés à ce syndrome.

Les patients avec TSA mutés sur *SHANK3* et ceux atteints du syndrome PMDS partagent généralement les signes suivants : un retard développemental, un langage appauvri voire absent, une hypotonie, des déficiences intellectuelles, un fort risque d'épilepsies sans oublier les traits autistiques caractéristiques des TSA (Harony-Nicolas *et al*, 2015).

Le cas d'une mère sans TSA et sans déficience intellectuelle, porteuse d'une délétion comprenant *SHANK3* suggère, néanmoins, l'existence de mécanismes ou autres loci, capables de compenser les effets délétères induits par l'absence de *SHANK3* (Tabet *et al*, 2017). De plus, plusieurs études ont montré que la taille de la délétion portée par les patients PMDS, pouvant varier de quelques centaines de kilobases jusqu'à plus de 9 mégabases, corrèle positivement avec la sévérité de leurs phénotypes (Sarasua *et al*, 2014; Soorya *et al*, 2013a; Tabet *et al*, 2017; Ponson *et al*, 2018).

2- Autres troubles neuropsychiatriques

En plus de leur implication dans l'émergence des TSA et des troubles qui leur sont associés, les gènes de la famille *SHANK* interviennent également dans le développement d'autres troubles neuropsychiatriques incluant les troubles bipolaires, la schizophrénie, et la maladie d'Alzheimer (Guilmatre *et al*, 2014). En particulier, il a été montré que l'expression de *SHANK3* était réduite dans chacune de ces pathologies (Alexandrov *et al*, 2017). A l'instar des TSA, ces 3 affectations neurologiques arborent une étiologie complexe et seraient le résultat d'une interaction entre des facteurs de vulnérabilité génétiques et des facteurs de risque environnementaux (Sullivan *et al*, 2003; Kieseppä *et al*, 2004; Gatz *et al*, 2006). Les TSA, les troubles bipolaires et la schizophrénie partageant certains traits comportementaux, il n'est pas étonnant de constater des voies biologiques (i.e. voie de la transmission synaptique, voies liées à la dopamine et la sérotonine) et des facteurs génétiques communs entre ces trois conditions (Khanzada *et al*, 2017). Les paragraphes suivants ont pour objectif de détailler le lien entre *SHANK3* et ces deux autres troubles neuropsychiatriques.

a. Troubles bipolaires

Les troubles bipolaires sont des troubles chroniques de l'humeur fréquents touchant environ 1,2% de la population adulte et dont les premières manifestations apparaissent chez les jeunes adultes, entre 18 et 24 ans. Ils se définissent par une succession anormalement élevée de phases de manies alternant avec des épisodes de dépression, ces deux événements possédant des traits comportementaux totalement opposés.

Une forte occurrence de cas de bipolarité parmi les patients atteints du syndrome 22q13 a été rapportée par plusieurs équipes (Denayer *et al*, 2012; Verhoeven *et al*, 2012). *SHANK3* étant compris dans les délétions portées par ces patients, l'hypothèse de *SHANK3* comme facteur de vulnérabilité pour le développement des troubles bipolaires a pu être proposée. Le cas d'un patient portant 3 micro délétions dans *SHANK3* apparues *de novo* diagnostiqué bipolaire sans signe de TSA soutien cette hypothèse (Vucurovic *et al*, 2012).

Il existe aussi des cas de bipolarité chez des patients porteurs de duplications dans la région de *SHANK3* (Han *et al*, 2013; Johannessen *et al*, 2019). De plus, lorsqu'une surexpression de *SHANK3* est induite chez la souris, cela résulte en l'apparition de comportements similaires à ceux observés chez les patients bipolaires (Han *et al*, 2013). Néanmoins, les études génétiques menées à ce jour n'ont pas encore permis de déceler une association génétique entre *SHANK3* et les troubles bipolaires (Zhang *et al*, 2016a). Un autre membre de la famille *SHANK* pourrait augmenter le risque de développer des troubles bipolaires. Il s'agit de *SHANK2* dont une duplication partielle a été retrouvée chez un patient bipolaire (Noor *et al*, 2014).

b. Schizophrénie

La schizophrénie est une maladie cérébrale affectant 1% de la population. Les premiers signes de schizophrénie peuvent être détectés au cours de l'adolescence, soit entre 15 et 25 ans. Il se caractérise par un grand nombre de symptômes de nature et de sévérité très variables pouvant être regroupés dans 3 catégories : les symptômes dits positifs correspondent à des expériences d'hallucination pouvant altérer les différents sens (vue, odorat, audition...), des crises de paranoïa ; les symptômes dits négatifs font référence à des comportement d'isolement et de dépression ; la troisième catégorie de symptômes se manifeste par des phases de désorganisations comportementales et cognitives rendant certaines démarches incompréhensibles.

Des mutations dans les trois gènes de la famille *SHANK* ont été détectées chez des patients atteints de schizophrénie. Un variant dans *SHANK1* retrouvé chez des patients schizophrènes a été associé à une altération de la mémoire de travail auditive fréquemment rapportée chez ces patients (Lennertz *et al*, 2012). Concernant *SHANK2*, une étude de criblage ciblée sur ce gène a mis en évidence des mutations faux-sens chez 2,7% des patients inclus dans l'étude (Peykov *et al*, 2015). Il est important de noter

qu'aucune de ces variations n'était présente chez les individus contrôles (Peykov *et al*, 2015). Également par criblage, les travaux de Gauthier *et al* ont permis d'identifier 2 mutations *de novo* dans *SHANK3* (Gauthier *et al*, 2010). Une de ces mutations est partagée par 3 adolescents de la même fratrie présentant tous un diagnostic de schizophrénie, accompagnée de déficiences intellectuelles modérées (Gauthier *et al*, 2010). La deuxième mutation a été identifiée dans une seconde étude indépendante (de Sena Cortabitarte *et al*, 2017). Une autre étude a mis en évidence un taux de mutations *de novo* dans *SHANK3* plus élevé dans un échantillon composé de 235 patients avec schizophrénie par rapport à un échantillon composé de 233 individus contrôles (Girard *et al*, 2015).

D) Études de l'effet de *SHANK3* dans les TSA

Divers modèles ont permis de mieux comprendre le rôle de *SHANK3* dans le développement des phénotypes associés aux TSA.

1- Les modèles *in vitro*

Les protéines Shank3 et leurs fonctions ont tout d'abord été étudiées dans des systèmes de culture *in vitro*. Grâce à ce type de modèle, il est possible d'évaluer l'effet de mutations dans Shank3, identifiées chez des patients avec des TSA, ou d'une modification de l'expression de ces protéines au niveau cellulaire.

Ces études ont permis de mettre en évidence le rôle des protéines Shank3 dans la formation et la maturation des épines dendritiques (Roussignol *et al*, 2005; Durand *et al*, 2012; Cochoy *et al*, 2015). En particulier, la transfection de Shank3 dans des neurones du cervelet et dépourvus d'épines dendritiques conduit à la formation d'épines dendritiques *de novo* (Roussignol *et al*, 2005). Les travaux de Durand *et al*, effectués au laboratoire, ont apporté des pistes sur les mécanismes à l'origine de ces anomalies en pointant un lien entre Shank3 et la polymérisation des filaments d'actine (Durand *et al*, 2012). Les résultats de cette étude suggèrent notamment l'intervention de protéines interagissant avec Shank3 et impliquées dans la régulation du cytosquelette comme β -Pix ou Abp1 (Durand *et al*, 2012). L'étude de Roussignol *et al* s'est également focalisée sur le rôle spécifique des différents domaines de Shank3 dans le développement de ces phénotypes. Ainsi, il a été montré que la partie C terminale de Shank3, comprenant le domaine SAM et les sites d'interaction avec Homer et la Cortactine, est impliquée dans l'induction des épines dendritiques (Roussignol *et al*, 2005). Le site d'interaction avec la Cortactine est, de plus, important pour la rétractation du cou des épines dendritiques ainsi que pour l'élargissement de la tête des épines dendritiques. Ces deux paramètres caractéristiques de la maturation des épines dendritiques semblent également être régulés par les domaines Ank et SH3 (élargissement de la tête) ainsi que par le domaine PDZ (rétractation du cou) des protéines Shank3 (Roussignol *et al*, 2005).

De plus, au cours du développement, Shank3 joue aussi un rôle dans la mobilité du cône de croissance comme cela a été démontré au laboratoire (Durand *et al*, 2012).

L'implication des protéines Shank3 dans la transmission synaptique a également été analysée *in vitro*. Un résultat intéressant est l'augmentation de l'expression de certaines sous-unités des récepteurs NMDA, AMPA et mGlu dans des neurones du cervelet en culture, suite à une transfection de Shank3 (Roussignol *et al*, 2005). Il en résulte une augmentation du nombre de synapses fonctionnelles dans ces neurones transfectés. L'enregistrement électrique de neurones hippocampaux sur coupes obtenues à partir de cerveaux de souris présentant une délétion dans l'exon 21 de shank3 a révélé des altérations de l'activité synaptique dont une baisse de la transmission synaptique médiée par les récepteurs NMDA entraînant une réduction des courants Mepsc (miniature Excitatory postsynaptic current) (Kouser *et al*, 2013; Duffney *et al*, 2015). La surexpression de formes tronquées de Shank3 dans des neurones hippocampaux en culture induit également une diminution de l'amplitude et de la fréquences des courants mEPSC (Durand *et al*, 2012). Ces résultats n'ont cependant pas été reproduits dans le cas d'une baisse de l'expression de Shank3 dans des neurones en culture et provenant de certains modèles de souris portant des délétions dans Shank3 (Wang *et al*, 2011b; Peça *et al*, 2011; Shi *et al*, 2017). Néanmoins, l'étude de Peça *et al* a montré une baisse des courants mEPSC lorsque les neurones analysés sont issus du striatum (Peça *et al*, 2011). Des anomalies de la transmission synaptique associées au striatum ont été visualisées dans d'autres modèles murins Shank3 (Wang *et al*, 2016, 2017). La variabilité des résultats publiés pourrait être liée aux stades développementaux étudiés, aux isoformes de Shank3 exprimées ainsi qu'aux protocoles utilisés (Kouser *et al*, 2013).

Plusieurs études ont également mis en évidence une accumulation des protéines Shank3, portant des mutations tronquantes, au niveau du soma associée à une absence de ces protéines au niveau synaptique (Durand *et al*, 2012; Grabrucker *et al*, 2014; Cochoy *et al*, 2015). Ces observations ont été confirmées récemment par l'étude de Hassani Nia *et al* et démontrent à nouveau le rôle de la partie C terminale de Shank3 dans l'adressage de ces protéines à la synapse (Hassani Nia *et al*, 2020). Cette dernière étude suggère, en outre, une participation de Shank3 dans la régulation de la voie de signalisation Wnt. En effet, Shank3, en interagissant via son domaine PDZ avec la β -caténine, un facteur de transcription de la voie Wnt, induit une séquestration de cette dernière dans les épines dendritiques. Ainsi, lorsque Shank3 ou que ses domaines PDZ et d'adressage à la synapse sont absents, cela entraîne une accumulation de la β -caténine dans le noyau et une activation de ses gènes cibles (Hassani Nia *et al*, 2020). Ces données dévoilent de nouvelles fonctions attribuables à Shank3 et rejoignent certaines récentes observations obtenues chez la souris (Qin *et al*, 2018).

Ces études ont montré que Shank3 assure différentes fonctions au cours du développement et que celles-ci sont médiées par des domaines distincts de Shank3. En particulier, Shank3 joue un rôle majeur dans le développement et la maturation des épines dendritiques et est donc essentiel à la transmission synaptique. De plus, l'altération de son expression ou de sa séquence entraîne des anomalies spécifiques à certains stades développementaux ainsi qu'à certaines régions du cerveau.

2- Le modèle murin

Le modèle murin a largement été utilisé dans les études portant sur SHANK3. Les premiers modèles correspondent à des souris portant des délétions ciblant des régions distinctes de Shank3. Selon les portions de la protéine délétées, les phénotypes observés sont différents en raison de la spécificité fonctionnelle des isoformes restantes et de leur capacité d'interactions via les domaines présents (Jiang & Ehlers, 2013). A ce jour, une dizaine de lignées de souris différentes portant des délétions dans le gène *Shank3* ont été établies par plusieurs équipes.

Parmi ces modèles, on retrouve des souris porteuses de délétions dans les régions suivantes : exons 4-9, exons (Bozdagi *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011b; Yang *et al*, 2012; Bozdagi *et al*, 2013; Drapeau *et al*, 2014; Jaramillo *et al*, 2015, 2016), 4-7 exons (Peça *et al*, 2011), exon 9 (Lee *et al*, 2015b), exon 11 (Reim *et al*, 2017), exons 13-16 (Peça *et al*, 2011), exon 21 (Kouser *et al*, 2013) et exons 4-22 (Wang *et al*, 2016; Drapeau *et al*, 2018), cette dernière aboutissant à une absence complète de Shank3 à l'état homozygote. La figure 10 permet de visualiser quels domaines protéiques sont touchés par ces délétions et quelles sont les isoformes restantes (figure 10).

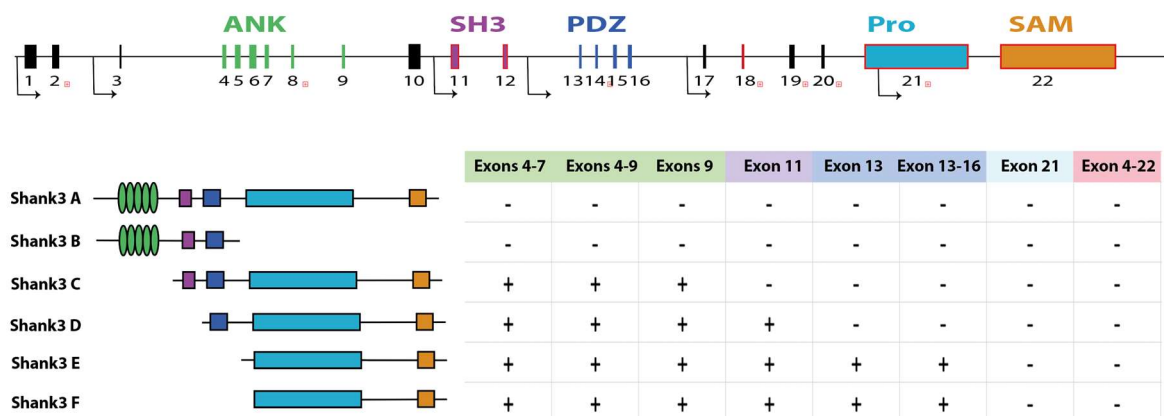


Figure 10 : Illustration des isoformes présentes dans les différents modèles de délétions de *Shank3*

Représentation schématique du gène *Shank3* murin indiquant la localisation des divers promoteurs alternatifs et des différents exons soumis à un épissage alternatif. Le rôle de SHANK3 a été très étudié grâce aux modèles murins délétés sur différentes régions de *Shank3*. Le tableau indique les isoformes de *Shank3* théoriquement exprimées suite à la délétion de certains exons. Figure adaptée selon Jiang & Ehlers, 2013.

Un des premiers modèles de souris *Shank3* a ciblé le domaine ANK en délétant les exons 4 à 9 de *Shank3*. Les isoformes sauvages restantes sont les isoformes c, d et e (Wang *et al*, 2011b). Chez ces souris, la plasticité synaptique est altérée (Bozdagi *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011b; Yang *et al*, 2012; Jaramillo *et al*, 2015). Cela se traduit par une mauvaise stabilité de la potentialisation à long terme et de l'expansion des épines dendritiques induites (Bozdagi *et al*, 2010). Des modifications de la densité des épines synaptiques et de leur morphologie peuvent également être observées chez des souris homozygotes âgées de 4 semaines (Wang *et al*, 2011b). Bien que non répliquée par d'autres groupes, il a également été mis en évidence une diminution de la transmission basale glutamatergique (Bozdagi *et al*, 2010; Yang *et al*, 2012). Ces anomalies de l'activité synaptique peuvent être reliées aux récepteurs AMPA, dont certaines sous-unités sont moins exprimées chez les souris mutantes (Bozdagi *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011b). La délétion du domaine ANK peut également s'accompagner d'une diminution de l'expression des protéines synaptiques suivantes : Homer, GKAP et NR2A, une sous-unité des récepteurs NMDA (Wang *et al*, 2011a). Sur le plan comportemental, certains aspects des interactions et de la communication sociales sont également altérées mais de façon modérée (Bozdagi *et al*, 2010; Wang *et al*, 2011a; Yang *et al*, 2012). Ces souris présentent, de plus, une augmentation de leur comportements stéréotypiques ainsi que dans certains cas des déficits cognitifs et moteurs, ces derniers étant plus marqués chez les mâles (Wang *et al*, 2011a; Yang *et al*, 2012).

Un intérêt s'est également porté sur le domaine PDZ. Par rapport au modèle précédent, ces souris expriment une isoforme de moins et pourraient de ce fait présenter des phénotypes plus sévères. Cela a été démontré dans l'étude de Peça *et al* qui a comparé le comportement de souris portant des délétions dans le domaine ankyrine (souris^{Δ4-7}) et des souris portant des délétions dans le domaine PDZ (souris^{Δ13-16}). En particulier, les souris ^{Δ13-16} présentent des stéréotypies sévères à l'origine de lésions (Peça *et al*, 2011; Balaan *et al*, 2019) et des troubles de l'anxiété qui ne sont pas visibles chez les souris ^{Δ4-7} (Peça *et al*, 2011). Concernant les comportements sociaux, les souris ^{Δ4-7} développent plus d'aptitudes que les souris ^{Δ13-16} (Peça *et al*, 2011). De plus, bien que des souris ^{Δ13-16} femelles, incluses dans l'étude de Balaan, marquent une préférence pour le compartiment social dans le test des 3 chambres, celles-ci affichent un désintérêt pour le stimulus social. A nouveau, cette étude met en avant des déficiences plus prononcées chez les souris males (Balaan *et al*, 2019).

En utilisant deux autres modèles murins délétés sur les exons 4-7 (souris^{Δ4-7}) et sur les exons 13-16 (souris^{Δ13-16}), une autre équipe s'est intéressée aux effets de *Shank3* sur les courants I_h de neurones thalamocorticaux (Zhu *et al*, 2018). L'amplitude de ces courants est diminuée chez les souris^{Δ13-16}. Cela s'accompagne par une baisse de l'expression des récepteurs HCN (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel) qui véhiculent ces courants et par des altérations de certaines propriétés électriques dépendantes des récepteurs HCN : diminution du potentiel de membrane, augmentation de la résistance cellulaire, diminution des PA émis de façon tonique, ainsi qu'une augmentation de leur seuil d'activation, mais aussi diminution du nombre de PA générés en « bouffées ». De façon intéressante,

les profils électriques relatifs aux courants I_h enregistrés chez les souris^{Δ13-16} sont reproduits de façon similaire chez des souris invalidées pour les récepteurs HCN, tandis que les souris^{Δ4-7} présentent une activité électrique I_h normale sur les paramètres testés. Ces deux résultats suggèrent que les récepteurs HCN pourraient jouer un rôle majeur dans les dysfonctionnements neuronaux induits en réponse à une déficience en *Shank3* et que le domaine PDZ apparaît nécessaire à leur fonction. Les récepteurs HCN étant exprimés au niveau somatique et dendritique, cela élargit les fonctions associées à *Shank3* habituellement connues pour ses fonctions essentiellement synaptiques (Zhu *et al*, 2018).

Des études ont aussi été réalisées sur des souris invalidées pour le gène *Shank3* par délétion des exons 4 à 22. Ces dernières développent des comportements répétés à nouveau très sévères comme le témoignent les lésions observées sur les animaux mutés (Wang *et al*, 2016). Concernant le niveau d'interaction sociale de ces souris, des déficits sont observés dans quelques domaines mais là encore de façon peu prononcée (Wang *et al*, 2016; Drapeau *et al*, 2018). Les phénotypes comorbides mis en évidence dans les précédents modèles tels que les troubles cognitifs, les troubles de l'anxiété et les troubles moteurs sont également altérés. (Wang *et al*, 2016; Drapeau *et al*, 2018). Au niveau synaptique, l'absence de *Shank3* introduit un déséquilibre de multiples protéines telles que Homer et mGluR5 (Wang *et al*, 2016). Ces souris présentent de plus des anomalies de leur connectivité fonctionnelle et structurale dans diverses régions cérébrales (Wang *et al*, 2016).

La présence de mutations ponctuelles de type faux sens est, au même titre que les autres modèles, suffisante pour le développement de certains traits autistiques chez les souris. C'est particulièrement le cas lorsqu'elles touchent des acides aminés très conservés. Par exemple, l'introduction d'une mutation changeant la serine 685 de *Shank3* en isoleucine induit chez la souris une baisse de la communication sociale (Wang *et al*, 2019b). Moléculairement, cette mutation empêche la phosphorylation de l'acide aminé concerné par la mutation, cette réaction étant nécessaire pour l'interaction entre *Shank3* et un complexe impliqué dans le développement des épines dendritiques (Wang *et al*, 2019b).

Les équipes travaillant sur *Shank3* ont tour à tour analysé différentes structures du cerveau parmi lesquelles figurent : l'hippocampe (Jaramillo *et al*, 2015), le cortex préfrontal (Duffney *et al*, 2015), le cervelet (Kloth *et al*, 2015) et le thalamus (Zhu *et al*, 2018). Néanmoins, une région demeure plus étudiée que les autres. Il s'agit du striatum correspondant à la région du cerveau murin où *Shank3* est le plus exprimé (Peça *et al*, 2011). L'expression des protéines synaptiques y est profondément altérée. Sont notamment concernées des protéines d'échafaudage telles que PSD93, PSD95, SAPAP3 et Homer1b/c et les sous-unités GluA2, GluA3, NR2A et NR2B des récepteurs AMPA et NMDA (Peça *et al*, 2011; Jaramillo *et al*, 2015).

Une analyse protéomique comparative entre le striatum et l'hippocampe a par ailleurs révélé que les voies cellulaires impactées par les mutations sur *Shank3* étaient spécifiques à une structure donnée.

Concernant le striatum, les données montrent que les protéines dont l'expression est altérée sont enrichies dans les catégories liées aux récepteurs ionotropiques et à la transmission synaptique (Reim *et al*, 2017). De plus, par rapport à celles de l'hippocampe, ces protéines correspondent significativement plus souvent à des facteurs de vulnérabilité pour les TSA (Reim *et al*, 2017).

Au niveau cellulaire, les neurones MSM du striatum de souris mutées sur Shank3 présentent une arborisation dendritique plus complexe, s'accompagnant d'une augmentation de la taille des dendrites et de la surface neuronale (Peça *et al*, 2011). Il en résulte une hypertrophie du striatum. De plus les épines dendritiques des neurones MSN sont moins nombreuses et leur densité post-synaptique (PSD) est à la fois plus fine et plus courte (Peça *et al*, 2011; Wang *et al*, 2016). Ces données se complètent par une activité électrique défaillante dont l'origine pourrait dépendre des domaines présents sur Shank3 (Peça *et al*, 2011; Jaramillo *et al*, 2015). Ainsi, lorsque le domaine ANK est ciblé, une baisse de la fonctionnalité des récepteurs AMPA est observée (Jaramillo *et al*, 2015), tandis que lorsqu'il s'agit du domaine PDZ, ce sont les réponses médiées par les récepteurs NMDA qui sont réduites (Peça *et al*, 2011). D'autre part, des anomalies de la connectivité ont également été reportées dans le striatum de souris Shank3, plus particulièrement au niveau du nucleus accumbens qui est plus actif en absence de stimulus social et moins actif quand un stimulus social est présent (Wang *et al*, 2016). Les déficits observés au niveau du striatum pourraient s'expliquer par une absence de compensation des protéines Shank1 et Shank2, qui ne sont pas exprimées dans le striatum (Böckers *et al*, 2004; Peça *et al*, 2011).

Certaines anomalies présentées par ces différents modèles peuvent être rétablies par la réexpression de la protéine Shank3 sauvage. Un nombre grandissant d'outils génétiques et de méthodologies ont été développés dans ce but.

Une stratégie fréquemment utilisée fait appel à des constructions génétiques pour lesquelles une région d'intérêt est encadrée par des sites loxP positionnés tête bêche (figure 11), pouvant être inversée en présence d'une enzyme spécifique, la Cré recombinase. En croisant des souris portant ce type de constructions avec des souris exprimant la Cré recombinase sous le contrôle d'un promoteur inductible, il est alors possible d'activer de façon conditionnelle l'inversion de la région « floxée ».

Cette méthode est applicable aux modèles de souris Shank3. Ainsi, en générant des souris portant une inversion du domaine PDZ, il a été possible de créer un modèle similaire au souris délétées pour ce domaine. Mei *et al* ont ensuite pu observer chez ces souris traitées au Tamoxifène (un agent permettant d'activer le promoteur de la Cré recombinase), à l'âge adulte, une correction des phénotypes cellulaires (densité des épines dendritiques et expression des protéines synaptiques) électrique (fréquence des courants post-synaptiques excitateurs) et comportementaux (interaction sociale et stéréotypies) altérés par la mutation ciblant le domaine PDZ (Mei *et al*, 2016). A l'inverse, les altérations motrices et les troubles de l'anxiété de ces souris ne sont corrigés que lorsque l'expression de Shank3 est rétablie en début de développement (Mei *et al*, 2016).

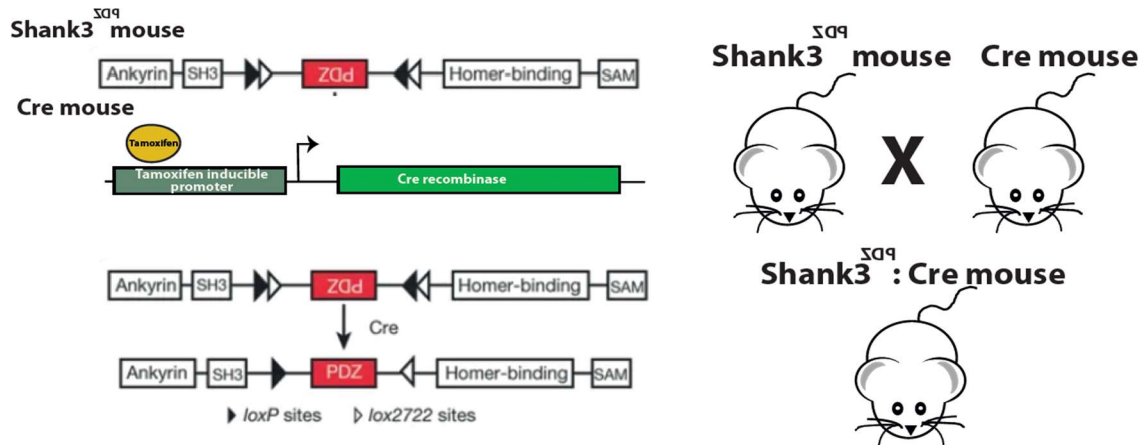


Figure 11: Illustration du système de mutation conditionnelle Cre-LoxP

Dans ce système de mutation, une cassette contenant le domaine PDZ est insérée à l'envers dans la séquence de Shank3 d'une lignée de souris. Cette cassette est entourée de sites LoxP orientés de façon inverse. Une construction contenant la séquence de la cré-recombinase sous le contrôle d'un promoteur inducible au Tamoxifen est inséré dans le génome d'une seconde lignée de souris. Les souris issues du croisement de ces deux lignées contiennent les deux constructions et il est alors possible d'induire le rétablissement de la forme sauvage de Shank3 chez ces souris grâce à l'ajout de Tamoxifen. Figure adaptée de Mei *et al*, 2016

Ces expériences de réversion apportent des preuves supplémentaires concernant l'implication de SHANK3 dans le développement des phénotypes observés en conditions pathologiques. Ils démontrent également l'existence d'une plasticité post développementale, qui apporte de nouveaux espoirs sur la possibilité de traiter ces anomalies neurologiques chez l'adulte.

Néanmoins, des données publiées récemment remettent en cause ces résultats, en suggérant un biais de la méthodologie utilisée par Mei *et al* (Speed *et al*, 2019). Cette même approche a été utilisée pour corriger le phénotype de souris Shank3^G porteuses de mutations tronquantes dans l'exon 21. Dans cette étude, les phénotypes de 6 lignées de souris traitées par le Tamoxifen ou par une solution contrôle ont été comparées. Tout comme dans l'étude de Mei *et al*, le traitement au Tamoxifen a permis de restaurer certains phénotypes altérés chez les souris Shank3^{G/G}-CreTam⁺. Cependant un rétablissement de certaines fonctions a également été observé sur ces souris traitées par la solution contrôle rendant les résultats obtenus précédemment ininterprétables (Speed *et al*, 2019). Cette étude rappelle l'importance des contrôles à effectuer dans le cadre de ces essais de sauvetages phénotypiques.

Les connaissances acquises sur la biologie de Shank3 ont poussé certaines équipes à chercher d'autres moyens de rétablir des phénotypes normaux chez des souris Shank3, le but étant d'essayer de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques pour les patients avec TSA portant des mutations sur SHANK3.

Ainsi, après avoir mis en évidence des perturbations des niveaux de l'acétylation de l'ADN chez des souris hétérozygotes portant une délétion de la partie C terminale de Shank3, associés à une baisse

des récepteurs NMDAR, une équipe a testé l'effet d'un traitement à la Romidepsine, un inhibiteur des protéines désacétylases, sur ces souris (Duffney *et al*, 2015; Qin *et al*, 2018). Ces derniers ont ainsi observé que ce composé, en plus de rétablir le niveau de récepteurs NMDA à des taux normaux, était aussi capable d'améliorer les capacités sociales des souris mutées. Les comportements répétés ne sont par contre pas atténués par ce traitement (Qin *et al*, 2018), suggérant que leur développement est déclenché via une voie biologique différente. En traitant ce même modèle de souris avec le composé MS-275, un autre inhibiteur des protéines désacétylase, Ma *et al* ont publié des résultats similaires (Ma *et al*, 2018).

Les voies cellulaires liées aux filaments d'actine ont également été l'objet d'un certain nombre de recherches. Plusieurs études ont en effet montré qu'il existait un lien unissant Shank3, les récepteurs NMDA et le cytosquelette d'actine ce qui a permis à une équipe d'orienter ses recherches vers un acteur de la voie Rac : le composé cofilin dont le rôle est d'induire une dépolymérisation des filaments d'actines et qui est activé chez des souris portant une délétion dans Shank3 (Duffney *et al*, 2015). Ainsi, en traitant des souris portant une délétion dans la partie C terminale de Shank3 avec un inhibiteur de ce composé, cette équipe a pu noter un rétablissement des comportement sociaux ainsi qu'une diminution des stéréotypies observées sur ce modèle de souris (Duffney *et al*, 2015).

Une stratégie similaire fondée sur des informations obtenues lors de précédentes études a permis d'identifier deux autres composés, le gaboxadol et le 7,8-DHF, agissant sur les récepteurs GABA et Trkb respectivement, capables de réduire des comportements autistiques de souris mutées sur SHANK3 (Rhine *et al*, 2019).

Une réversion de certains phénotypes autistiques a aussi été obtenue par d'autres approches comme l'activation de certains neurones par optogénétique lors de sessions d'entraînement des souris (Luo *et al*, 2017) ou grâce à des régimes basés sur un apport de compléments riches en zinc (Fourie *et al*, 2018).

3- Autres modèles animaux

Les modèles murins ont apporté de larges connaissances sur les causes de l'autisme et sur l'implication du gène *Shank3* dans le développement des TSA. Néanmoins, même si les rongeurs partagent de grandes similitudes avec l'humain, leur séparation au cours de l'évolution il y a plus de 70 millions d'années a engendré des divergences sur le plan structural et comportemental rendant certaines observations difficilement extrapolables à la situation chez l'homme. Le modèle primate non humain, est le modèle animal le plus proche et est de ce fait le plus pertinent scientifiquement parlant.

Tout comme chez la souris, lorsque des exons de *Shank3* sont délétés dans le cortex de singe, il y a un déséquilibre de certaines protéines synaptiques : PSD95 et mGluR5 sont moins exprimés tandis que l'expression de Homer augmente (Zhao *et al*, 2017). Une modification de la balance cellulaire est également observée avec une diminution du nombre de neurones associée à une augmentation du nombre

d'astrocytes en début de développement (Zhao *et al*, 2017). En plus de la diminution du nombre de neurones, la taille des soma et les densité en épines dendritiques sont également réduites (Zhao *et al*, 2017).

Au niveau comportemental, cette même équipe a reporté un retard de vocalisation chez un singe porteur d'une délétion de 2 paires de bases, mosaïque au sein de son cerveau, dans *Shank3* ainsi que des épisodes d'anxiété et des comportements stéréotypés associés à un déficit dans ses interactions sociales (Tu *et al*, 2019). Toutes ces anomalies sont améliorées après traitement à la fluoxétine (Tu *et al*, 2019). Ce singe récapitule donc l'essentiel des caractéristiques associées aux TSA. Les phénotypes identifiés chez ce singe ont été répliqué par la suite dans une autre étude ayant analysé 5 macaques (Zhou *et al*, 2019). Ces derniers présentent, en plus, des perturbations du sommeil, des signes d'hypotonie ainsi qu'une altération de leur connectivité cérébrale. En particulier, une réduction de la connectivité locale dans les régions thalamiques et striatales ainsi que de la connectivité de type longue distance au niveau du cortex moteur, du cortex cingulaire et des régions préfrontales a été observée. A l'inverse, localement, ces singes montrent une hyperconnectivité locale au niveau du cortex somatosensoriel (Zhou *et al*, 2019).

L'essentiel des manifestations des TSA détectable chez les patients est retrouvé chez les singes. Malheureusement, les règles éthiques étant très strictes dans le cas des modèles simiens, peu d'études ont pu voir le jour jusqu'à aujourd'hui, et les résultats obtenus sur ces modèles sont très peu répliqués.

4- Étude de patients

L'étude de cohorte de patients porteurs de délétions au sein de la région 22q13, incluant *SHANK3*, a permis de récolter des informations concernant l'anatomie cérébrale de ces patients. Les données de neuro-imagerie indiquent, chez certains d'entre eux, une diminution du volume de diverses structures telles que le striatum et le corps calleux (Srivastava *et al*, 2019), ainsi que des malformations affectant le cervelet et les ventricules (Soorya *et al*, 2013). Le cervelet est connu pour son rôle dans les fonctions motrices et son altération pourrait expliquer les cas d'hypotonie, fréquemment observés chez les patients atteints du syndrome de PMD. Cette structure est également impliquée dans certaines tâches cognitives, notamment dans la régulation des émotions mais aussi dans certaines voies sensorielles. Concernant le striatum, la combinaison de ces données à celles obtenues grâce au modèle murin permet de suggérer un rôle dans les stéréotypies caractéristiques des patients avec TSA. La substance blanche de ces patients est également profondément endommagée, en particulier au niveau des faisceaux de fibres axonales uncinés et du fascicule occipito-frontal inférieur (Jesse *et al*, 2020). Un retard de myélinisation de certaines fibres est de plus suspectée. Dans cette étude les altérations observées sont davantage marquées chez les individus les plus jeunes, ce qui est également le cas lorsque des souris de 4 et 9 semaines sont soumises à la même procédure (Jesse *et al*, 2020).

Un autre type d'analyse utilisant des données issues d'individus humains consiste en l'analyse de cerveaux *post-mortem*. A ce jour, peu d'analyses de ce type ont été réalisées chez les patients porteurs

de mutations dans *SHANK3*. Néanmoins, l'une d'entre elles a permis de mettre en évidence des anomalies épigénétiques, se traduisant par une augmentation de la méthylation des îlots CpG présents sur les différents promoteurs de *SHANK3* et entraînant, par la suite, une altération de l'expression de *SHANK3* et de ses isoformes dans le cerveau de ces patients (Zhu *et al*, 2014). La hausse de méthylation de certains îlots CpG, mesurée dans une structure cérébrale donnée, peut être corrélée à des index de sévérité de certains traits autistiques. Par exemple, la méthylation de l'îlot CpG du deuxième promoteur dans le cervelet est plus importante chez les patients présentant des retards développementaux plus sévères et apparaissant plus précocement (Zhu *et al*, 2014).

Bien que ces études soient effectuées sur des individus humains et apportent ainsi des données sur les anomalies réellement présentes dans les cerveaux des patients, il est important de noter que la plupart d'entre elles sont en général réalisées sur des groupes de petite taille. Il est donc nécessaire de répliquer ces résultats sur des cohortes plus élargies.

Depuis les années 2010, un grand nombre de recherches se basant sur l'étude de neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ont été entreprises, afin d'évaluer l'impact de mutations dans *SHANK3* à l'échelle cellulaire. Les données obtenues à partir de neurones dérivés d'iPSC de patients porteurs de mutations dans *SHANK3* seront détaillées dans la partie dédiée à la présentation de ce modèle.

E) Epines dendritiques

1- Structure et caractéristiques des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont des protrusions membranaires de petite taille émergeant principalement des branches dendritiques (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970). Elles peuvent également naître à partir des somas neuronaux et dans quelques rare cas des axones (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970). Morphologiquement, une épine dendritique est constituée d'une tête plus ou moins sphérique connectée à la dendrite par une élongation plus fine appelée cou de l'épine.

Ces structures, observées pour la première fois par Cajal en 1888, forment des sites de contact (Gray, 1959) correspondant aux synapses entre les différents neurones. C'est au niveau de ces points de contacts que s'effectuent la transmission des signaux nerveux d'un neurone à un autre. Les épines dendritiques correspondent à la partie post-synaptique et font face à la partie pré-synaptique située au niveau du bouton axonal, ces deux compartiments étant séparés par une fente synaptique d'environ 20 nm (Schikorski & Stevens, 1997; Zuber *et al*, 2005).

Les synapses construites à partir d'épines dendritiques sont donc majoritairement de nature chimique, c'est-à-dire que la transmission s'effectue en faisant intervenir des composés chimiques, les neurotransmetteurs. Ces derniers, sont libérés dans la fente synaptique du côté pré-synaptique suite à l'arrivée d'un potentiel d'action (PA) dans le bouton axonal et via des mécanismes dépendant du calcium.

Les neurotransmetteurs se fixent sur, et activent des récepteurs pharmacologiques en post-synaptique. Selon la nature du neurotransmetteur et de son récepteur cela induit une entrée d'ions sodium et calcium déclenchant un potentiel post-synaptique excitateur (une dépolarisation de la membrane) ou alors une entrée d'ions chlore à l'origine d'un potentiel post-synaptique inhibiteur (une hyperpolarisation de la membrane). Dans le premier cas cela favorise l'apparition d'un PA propagé dans le neurone post-synaptique tandis que dans le second cas cela l'empêche.

La deuxième catégorie de synapses correspond à des synapses dites électriques. Les membranes pré et post-synaptiques de ces synapses sont accolées et sont reliées par l'intermédiaire de jonctions GAP qui permettent de former un pore entre les deux neurones. C'est au niveau de ce pore que sont véhiculés les messages nerveux qui diffusent d'un neurone à un autre sous forme de courants ioniques. A la différence des synapses chimiques, les neurotransmetteurs ne sont donc pas impliqués dans la transmission synaptique des synapses électriques.

D'après la classification établie par Peter et Kaiserman-Abramof en 1970, il existe trois catégories d'épines définies par des critères morphologiques dont longueur totale de l'épine et le rapport entre la largeur de la tête et du cou (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970). Les épines les plus classiques sont les épines de type « mushroom ». Elles possèdent une tête volumineuse et un cou. Les épines de type « long thin » possèdent un long cou et une tête de petite taille, tandis que les épines de type « stubby » sont courtes et sans cou. Une quatrième catégorie d'épines a été rajoutée ultérieurement et correspond à une fine extension membranaire dépourvue de tête. Il s'agit des « filopodia » dont la taille peut être deux fois supérieure à sa largeur. Cependant, selon certains scientifiques, cette structure ferait plutôt référence aux précurseurs des épines (Dailey & Smith, 1996; Ziv & Smith, 1996; Zuo *et al*, 2005). Les « filopodia » sont en effet enrichis en début de développement, leur nombre déclinant en fin de développement ainsi que dans le cerveau adulte, tandis que la quantité d'épines augmente progressivement (Dailey & Smith, 1996; Ziv & Smith, 1996; Zuo *et al*, 2005). Certaines études prennent en compte deux classes d'épines supplémentaires : les épines en forme de coupe appelées « cup » et les épines ramifiées appelées « branched spines » (Ebrahimi & Okabe, 2014). La figure 12 illustre la morphologie de ces différentes classes d'épines.

Malgré cet effort de classification, la variabilité observée entre les différentes morphologies est telle qu'il est parfois difficile de classer certaines formes intermédiaires. De plus, étant des structures plastiques, leur morphologie peut évoluer au cours du temps ce qui complexifie davantage cette typologie (Parnass *et al*, 2000). Il est ainsi plus juste de considérer les différentes formes d'épines comme un continuum de formes et non comme des classes distinctes. Bien que cela soit controversé, un stade de maturité a également été assigné à chaque type d'épines avec les « filopodia » ainsi que les « stubby » étant les moins matures et les « mushroom » correspondant aux épines les plus matures (Berry & Nedivi, 2017; Bourne & Harris, 2007; Jasinska *et al*, 2019). Cette notion est néanmoins appuyée par le

fait que les « filopodias » sont dépourvues de synapses, tandis que les « muschroom » arborent une PSD très riche en protéines synaptiques.

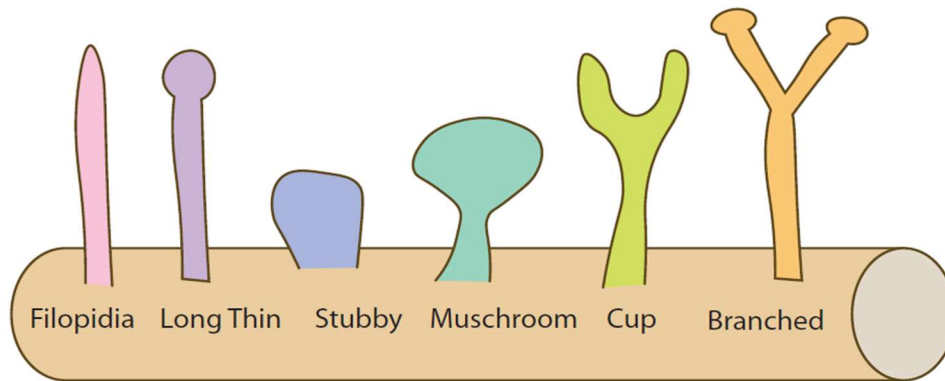


Figure 12 : Présentation des différentes classes d'épines dendritiques

Les différentes classes d'épines ne se distinguent pas seulement sur le plan morphologique. Une propriété importante des épines dendritiques est leur plasticité et leur capacité à se mouvoir. Ainsi, en réponse à divers stimuli, les épines peuvent modifier leur forme notamment en augmentant ou en diminuant leur volume. Cela permet d'ajuster la quantité de récepteurs nécessaire en fonction de l'activité neuronale. Il a en effet été observé en ME une corrélation positive entre la taille des épines et le nombre de récepteurs présents à leur surface (Harris & Stevens, 1989; Schikorski & Stevens, 1999; Takumi *et al*, 1999), ainsi qu'une augmentation des courants post-synaptiques proportionnelle à la taille des épines (Noguchi *et al*, 2005, 2011). Concernant, la mobilité des épines dendritiques, elle semble plus marquée pendant le développement. Elle permet, en particulier, aux « filopodia » de se déplacer à la recherche des boutons pré-synaptiques axonaux et est ainsi nécessaire à la formation des synapses (Ethell & Pasquale, 2005). Par opposition, la mobilité des épines est plus faible chez les épines de type « muschroom ». D'autres différences sont observables entre les différentes catégorie d'épines : les épines de type « stubby » et « long thin » sont très instables et peuvent apparaître ou disparaître dans des fenêtres de temps très courtes, tandis que les épines de type « muschroom » apparaissent beaucoup plus stables (Ziv & Smith, 1996; Holtmaat *et al*, 2005).

Ces caractéristiques ont un rapport direct avec les processus de mémorisation et cela a conduit à la formulation de l'idée selon laquelle les épines de type « long thin » correspondent aux épines engagées dans l'apprentissage et la mémorisation tandis que les épines de type « muschroom » sont associées aux épines de mémoire pour lesquelles les souvenirs sont déjà encodés (Bourne & Harris, 2007).

2- Organisation des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont répandues dans divers sous-type neuronaux mais sont majoritairement impliquées dans les synapses excitatrices, au niveau desquelles est libéré le glutamate.

Ces épines dendritiques abritent différents organites et sont caractérisées par l'expression de plus d'une centaine de protéines impliquées dans la transmission des signaux excitateurs. Ces dernières sont concentrées dans une zone restreinte correspondant à la PSD, une région apparaissant dense aux électrons en microscopie électronique (ME). Une particularité des synapses excitatrices est leur aspect asymétrique en raison de l'épaisseur élevée de leur PSD.

Diverses classes de protéines y sont représentées : récepteurs pharmacologiques, protéines d'adhésion cellulaire, protéines d'échafaudage, protéines adaptatrices ou de jonction, protéines signalisatrices et protéines du cytosquelette. Leur organisation est cruciale pour les fonctions qu'elles assurent et repose sur un agencement précis de chaque protéine.

a. Récepteurs

Les récepteurs exprimés par les synapses glutamatergique sont répartis dans différentes catégories : les récepteurs ionotropiques (iGluR) et les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR).

Les récepteurs iGluR se répertorient dans 4 groupes dont les noms indiquent le composé qui les active de façon sélective : les récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA, les récepteurs Kainate et les récepteurs Delta (Bowie, 2008). Ils sont tous composés de 4 ou 5 sous-unités formant un canal transmembranaire perméables à certains cations (Na^+ , K^+ et/ou Ca^{2+}) et se différencient par leur cinétique d'ouverture.

Les canaux des récepteurs AMPA sont les plus rapides à s'ouvrir, avec un délai de l'ordre de la milliseconde suite à la fixation de glutamate. Leur ouverture permet une entrée d'ion Na^+ dans la cellule, ce qui induit une dépolarisation locale de la membrane ou potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). L'activation des récepteurs NMDA est plus lente car la fixation du glutamate ne suffit pas pour provoquer leur ouverture (Forsythe & Westbrook, 1988; Stern *et al*, 1992). En effet, au repos, le canal de ce récepteur est bloqué par la présence d'ions Mg^{2+} . Pour éliminer les ions obstruant le pore et empêchant la possibilité de mouvements ioniques, une dépolarisation de la membrane est nécessaire (Kleckner & Dingledine, 1988; Johnson & Ascher, 1990). Il faut ainsi une fixation répétée du glutamate sur les récepteurs AMPA pour pouvoir ouvrir les canaux des récepteurs NMDA qui, lorsqu'ils sont activés permettent le passage d'ions Na^+ mais aussi d'ions Ca^{2+} dans la cellule. Ce dernier peut agir en tant que second messenger pour activer différentes cascades de signalisation cellulaire. Les récepteurs AMPA et NMDA sont les principaux acteurs de la plasticité synaptique dont les mécanismes seront explicités ultérieurement. Les deux autres catégories de récepteurs sont beaucoup moins étudiées. Une particularité des récepteurs Kainate est, cependant, de pouvoir directement participer aux voies de signalisation liées aux protéines G (Rodríguez-Moreno & Lerma, 1998).

Découverts au milieu des années 80, les récepteurs mGluR sont des récepteurs couplés aux protéines G composés de 7 domaines transmembranaires (Sugiyama *et al*, 1987). Cette classe est elle-même subdivisée en 3 groupes. Les récepteurs du premier sous-groupe (mGluR1 et mGluR5) sont couplés à la protéine Gq (Abe *et al*, 1992). La fixation du glutamate sur ces récepteurs entraîne, par changement de conformation, une activation de la phospholipase C associée à une augmentation de la concentration du second messenger Inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) dans la cellule, ainsi qu'une libération des ions Ca^{2+} stockés dans le réticulum endoplasmique (Abe *et al*, 1992). Les récepteurs du deuxième sous-groupe (mGluR2 et mGluR3) et du troisième sous-groupe (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8) sont quant à eux couplés à la protéine Gi inhibant l'adénylate cyclase, ce qui conduit à une diminution du second messenger AMPc (Tanabe *et al*, 1992, 1993). La présence en quantité suffisante (ou non) des seconds messagers IP3 et AMPc entraîne une initiation (ou une absence d'initiation respectivement) des voies de signalisations cellulaires qui leur sont associées, ces voies aboutissant aux mouvements d'ions ioniques à l'origine des courants post-synaptiques. Leur rôle est donc de réguler la transmission excitatrice en permettant ou non l'ouverture des canaux ioniques.

b. Protéines d'adhésion cellulaire

Les protéines d'adhésion cellulaire sont exprimées à la surface des membranes pré et post-synaptiques. Leur rôle principal est d'assurer le maintien de la structure des synapses. Pour cela, elles vont s'associer par paires, ces paires étant composées d'une protéine pré-synaptique et d'une protéine post-synaptique interagissant ensemble ainsi qu'avec d'autres protéines intracellulaires. Il existe une grande variété de protéines d'adhésion cellulaire se distinguant par les domaines d'interaction présents dans leur séquence. Leurs possibilités d'interaction sont nombreuses, puisqu'elles peuvent être aussi bien de nature homophile que de nature hétérophile. En termes de structure, ces protéines arborent un long segment extracellulaire portant de multiples domaines d'interaction, une portion transmembranaire et une partie intracellulaire plus petite.

Le couple le plus documenté au niveau synaptique est celui formé par la Neurexine en pré-synaptique et de son ligand, la Neuroligine en post-synaptique (Berninghausen *et al*, 2007). La partie extracellulaire de la Neurexine est caractérisée par la présence de 6 domaines LNS et de 3 domaines EGF like dans le cas de la Neurexine α ou d'1 domaine LNS dans le cas de la Neurexine β , tandis que la Neuroligine ne contient qu'un long domaine lui permettant de se dimériser (Südhof, 2008). Elles ont pour point commun la présence d'une courte séquence en C-terminal, porteuse de site de liaison aux domaines PDZ en intracellulaire leur permettant d'interagir avec d'autres molécules synaptiques. La Neuroligine 1 est recrutée à la synapse par ce biais par PSD95 (Jeong *et al*, 2019).

c. Protéines d'échafaudage

Les protéines d'échafaudage sont exprimées au cœur du domaine post-synaptique où elles y jouent un rôle central. Elles permettent l'agencement très précis de chaque acteur de la transmission synaptique. Structuralement, ce sont en général des protéines possédant un grand nombre de domaines, essentiels pour interagir avec les autres protéines synaptiques et ainsi établir l'architecture de la synapse.

Il existe plusieurs familles de protéines assurant ces fonctions, une des plus connues étant la super famille des MAGUK (membrane-associated guanylate kinase proteins). Les protéines MAGUK, présentes au niveau des synapses glutamatergiques, se définissent par la présence d'un à trois domaines PDZ et d'une séquence homologue à la guanylate cyclase (GK), pourtant inactive (Cho *et al*, 1992; Anderson, 1996; Kuhlendahl *et al*, 1998). Cette séquence est alors, soit précédée d'un domaine SH3, soit suivie d'un motif WW. PSD95, un représentant de cette famille, interagit avec de nombreuses protéines synaptiques, notamment avec les Neuroligines et les protéines GKAP une autre famille de protéines d'échafaudage (Irie *et al*, 1997; Kim *et al*, 1997). Ces dernières se lient aux protéines SHANK qui elles même se connectent aux protéines HOMER. Tout cet assemblage forme la charpente, autour de laquelle s'organise toute la synapse, et permet ainsi le rapprochement et la stabilisation des complexes formés par les récepteurs à la membrane et les protéines de signalisation intra-cellulaire qui leur sont associées. Par exemple, les protéines HOMER assurent une liaison entre les récepteurs métabotropiques et les protéines signalisatrices qui sont activées suite à la fixation du glutamate (Mao *et al*, 2005).

Les récepteurs AMPA sont quant à eux maintenus à la membrane plasmique des épines dendritiques grâce à l'intervention d'une autre famille de protéines d'échafaudage, les protéines GRIP (Dong *et al*, 1997), tandis que pour les récepteurs NMDA, ce sont les protéines GKAP et PSD95 qui assurent cette fonction (Niethammer *et al*, 1996; Kim *et al*, 1997). Selon une étude plus récente, les protéines PSD95 participeraient également à l'ancrage des récepteurs AMPA à la membrane des épines dendritiques (Chen *et al*, 2015).

Les protéines d'échafaudage contribuent également à la régulation de l'activité électrique des récepteurs avec lesquels elles interagissent. Ainsi, en plus d'assurer le rassemblement des récepteurs NMDA à la membrane, la liaison des protéines PSD95 avec le domaine C terminal de ces récepteurs entraîne une baisse de la sensibilité au glutamate de ces derniers (Yamada *et al*, 1999). Les protéines PSD95 induisent, en outre, une inhibition de la potentialisation des récepteurs NMDA dépendante des protéines kinases C (Yamada *et al*, 1999). Ces deux fonctions supplémentaires des protéines PSD95 permettent d'éviter le passage des neurones glutamatergiques dans un état de surexcitation. Enfin, selon une autre étude, les protéines PSD95 joueraient aussi un rôle dans la stabilisation des épines dendritiques (Ehrlich *et al*, 2007).

d. Protéines du cytosquelette

Les épines dendritiques sont également très enrichies en filament d'actine et ce dès le début de leur formation. (Landis & Reese, 1983). Les filaments d'actine (actine F) se composent de deux polymères enroulés et formés d'actine G globulaires. Ils occupent l'espace du cou et de la tête de l'épine dendritique tout restant à l'extérieur de la PSD au niveau de laquelle elles interagissent avec les protéines synaptiques (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). En effet, elles sont liées à des protéines qui assurent leur régulation. Leur agencement est particulier avec une orientation longitudinale au niveau de la partie interne du cou et un aspect branché au niveau de la tête de l'épine (Korobova & Svitkina, 2010). Un autre type d'organisation a récemment été identifié au niveau de la partie externe du cou de l'épine (Bär *et al*, 2016). Il s'agit de filaments d'actine formant des anneaux entre la base de l'épine et sa tête. En générant ces structures dites périodiques, les filaments d'actine permettent de stabiliser le cou de l'épine tout en lui apportant un caractère flexible (Bär *et al*, 2016; Miermans *et al*, 2017).

Les rôles des filaments d'actine sont multiples. En premier lieu, ils participent activement à la formation et la maturation des épines dendritiques. En se polymérisant au niveau des futurs filopodia, les filaments d'actine exercent une tension mécanique sur la membrane plasmique (Borisov & Svitkina, 2000). Cela induit une déformation de la membrane qui permet la formation du filopodium puis des épines dendritiques. Pour cela, plusieurs protéines associées au cytosquelette sont nécessaires, dont les protéines du complexe Arp2/3 impliquées dans l'initiation de la polymérisation des filaments d'actine. Ce dernier est notamment responsable de l'organisation de type branché des filaments d'actine (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Il permet ainsi aux filaments d'actine de se ramifier et de se polymériser dans différentes directions ce qui induit l'expansion de la tête des épines dendritiques. Des expériences d'inactivation des protéines appartenant à ce complexe compromettent la formation de la tête des épines dendritiques mais n'affectent pas la formation des filopodia (Hotulainen *et al*, 2009). Ceux-ci sont générés par d'autres mécanismes dont un impliquant l'action des protéines formines, une autre classe de protéines régulatrices du cytosquelette qui, en s'associant à une extrémité des filaments d'actine, permettent leur polymérisation (Hotulainen *et al*, 2009).

Une autre propriété importante de l'actine est de pouvoir se polymériser et se dépolymériser de façon très fréquente et rapide. Cette caractéristique confère aux épines dendritiques une forte mobilité essentielle pour assurer la plasticité synaptique. On a ainsi des réarrangements des réseaux de filaments d'actines, qui peuvent se produire dans des intervalles de temps brefs pendant la plasticité synaptique ce qui permet un changement de morphologie dynamique (Bosch *et al*, 2014; Hlushchenko *et al*, 2016).

Malgré un important turn-over des épines dendritiques pouvant atteindre 20% par jour, certaines d'entre elles peuvent demeurer stables sur de très longues périodes (Trachtenberg *et al*, 2002; Zuo *et al*, 2005). Cette caractéristique est importante pour le maintien de la mémoire à long terme et fait intervenir, là encore, les filaments du cytosquelette d'actine et les protéines qui leurs sont associées. En particulier,

PFN2, l'isoforme 2 de la profiline, permet de séquestrer les monomères d'actine F et empêche ainsi la polymérisation des filaments d'actine (Michaelsen-Preusse *et al*, 2016).

e. Protéines de signalisation

Les épines dendritiques abritent également de nombreuses protéines de signalisation. Elles ont un rôle important dans la réorganisation des filaments d'actine et la croissance des épines dendritiques. Une de ces voies fait intervenir la famille des Rho GTPase contenant les protéines CDC42 et Rac1 qui ont pour but d'induire la polymérisation des filaments d'actine et la protéine RhoA qui au contraire induit une dépolymérisation de l'actine (Nakayama *et al*, 2000). L'activation de ces protéines est corrélée avec l'augmentation du volume des épines dendritiques se tenant place pendant les événements de plasticité synaptique (Murakoshi *et al*, 2011).

La voie des Rho GTPase est dépendante du calcium et fait ainsi intervenir les protéines CAMKI et CAMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I et II) qui sont activées suite à l'ouverture des récepteurs-canaux NMDA et l'entrée de calcium qui en découle (Murakoshi *et al*, 2011).

Le fonctionnement de cette voie de signalisation intra-cellulaire se base également sur une succession de réactions de phosphorylations et déphosphorylations du GDP/GTP interagissant avec les effecteurs de la voie. Celles-ci sont ainsi médiées par des protéines qui transforment un GDP en GTP (protéines GEF) pour activer leurs cibles ou réaliser la réaction inverse (protéines GAP) pour inactiver leurs cibles (Tada & Sheng, 2006). Tiam1, β PIX et Kalirin sont des exemples de protéines GEF qui activent les protéines CDC42 et Rac qui à leurs tours activent par réactions de déphosphorylations un panel de molécules effectrices dont WAVE, WASP, Pak et LIMK1 (Tada & Sheng, 2006). Ces dernières agissent directement sur des protéines se liant à l'actine pour induire leur polymérisation. Ainsi, lorsque les protéines WASP sont inhibées, il s'ensuit une réduction de la formation des épines dendritiques (Wegner *et al*, 2008). La voie des Rho GTPase agit en synergie avec d'autres voies comme la voie des Ras GTPase et la voie des MAP kinases (Tada & Sheng, 2006).

3- Formation des épines dendritiques

Les premières épines dendritiques apparaissent, chez l'homme, après 6 à 8 semaines de développement embryonnaire (Bourgeois, 2008). A ce stade, leur développement est endogène et n'est donc pas dicté par l'environnement extra-cortical. Plusieurs modèles de spinogénèse ont été proposés dès la fin du XX^{ème} siècle (Yuste & Bonhoeffer, 2004; Kanjhan *et al*, 2016).

Le premier modèle établi par Sotelo, se base sur des observations réalisées sur des échantillons de cervelets prélevés sur diverses lignées de souris mutantes. En conditions normales, les cellules de Purkinje établissent leurs synapses au niveau des fibres parallèles des cellules granulaires. Néanmoins,

lorsque ces dernières sont absentes, il y a tout de même formation d'épine dendritiques. Cela a conduit Sotelo à formuler l'hypothèse que les épines dendritiques se développent de manière autonome et donc indépendante de la composante pré-synaptique (figure 13, Sotelo, 1990). Ce modèle contredit celui énoncé par Miller et Peters selon lequel les épines dendritiques des cellules pyramidales du cortex commencent à se former suite à un contact initié par un axone au niveau dendritique (figure 13, Miller & Peters, 1981). Dans ce modèle, le rapprochement d'une terminaison axonale induit la formation d'une protrusion membranaire de morphologie semblable aux « stubby » puis une élongation membranaire progressive qui aboutit à la formation d'une épine dendritique. Le dernier modèle suggère que les épines sont formées à partir des filopodias dont la nature mobile leur permet de se déplacer à la recherche d'un bouton axonal (figure 13, Vaughn, 1989). Dans ce cas, c'est la composante post-synaptique qui est à l'origine de la formation de la synapse et de l'épine dendritique.

Ces trois modèles pourraient en fait co-exister et se dérouler spécifiquement dans une région donnée ou à un stade développemental précis (García-López *et al*, 2010; Kanjhan *et al*, 2016).

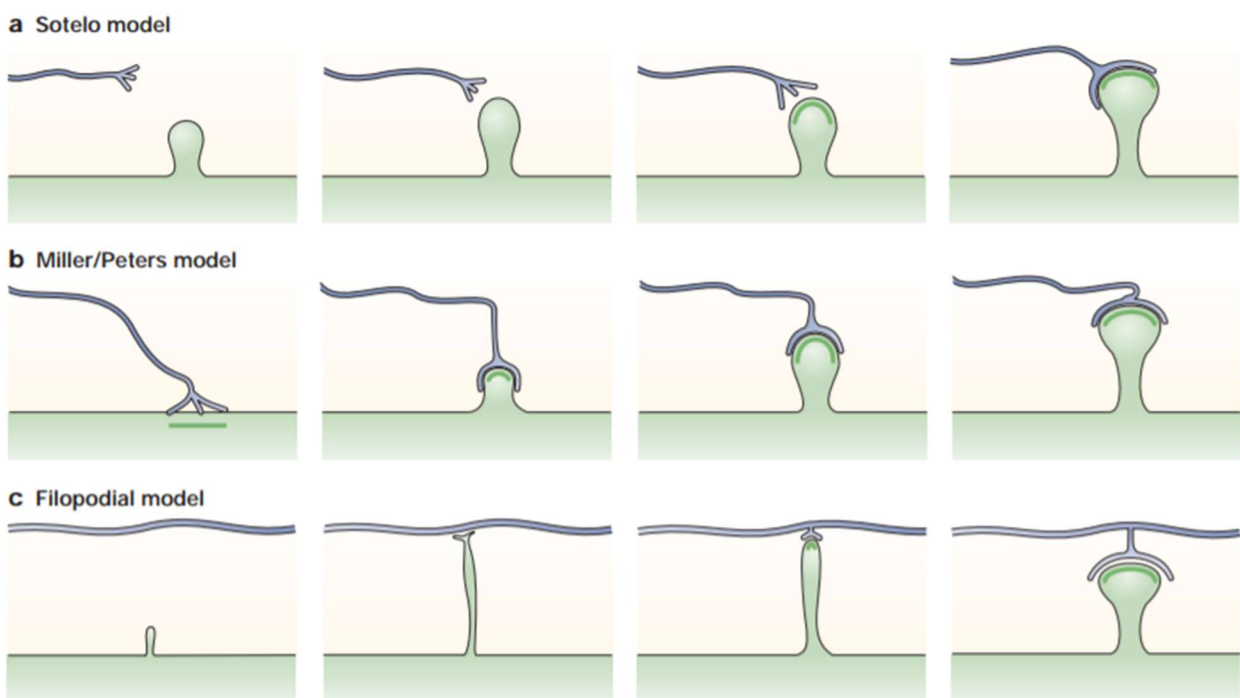


Figure 13 : Illustration des différents modèles de spinogénèse

Figure issue de Yuste & Bonhoeffer, 2004

Au niveau moléculaire, les protéines CAMKII jouent un rôle central dans la régulation de la formation des épines dendritiques (Fink *et al*, 2003; Sugawara *et al*, 2017). La surexpression de leur isoforme β dans des neurones hippocampaux et du cervelet entraîne une élévation du nombre de synapses (Fink *et al*, 2003; Sugawara *et al*, 2017). D'autres études ont montré une implication des récepteurs NMDA et de la PKA dans la formation des épines durant les étapes précoces du développement cérébral

lorsque l'activité électrique cortical est encore spontanée (Kwon & Sabatini, 2011). Les astrocytes participent également à la formation des épines dendritiques en sécrétant des protéines agissant indirectement sur les protéines Rac1 en post-synaptique induisant ainsi la polymérisation des filaments d'actine (Risher *et al*, 2018). Plus récemment, un lien a été établi entre la voie mTORC1 et la kinase DGK capable d'induire la formation d'épine dendritique (Nakai *et al*, 2020). Ces travaux suggèrent que le substrat phosphorylé par la DGK active la voie mTORC1 ce qui a pour effet l'induction de la synthèse de protéines entraînant par la suite la croissance synaptique (Nakai *et al*, 2020).

Après plusieurs phases de production importantes d'épines dendritiques, il s'ensuit une période survenant pendant la puberté et durant laquelle un grand nombre d'entre elles sont éliminées. Ces mécanismes d'élagages des synapses sont dépendants de l'activité électrique et d'intensité variable selon les régions cérébrales (Elston & Fujita, 2014; Oga *et al*, 2017).

4- Rôles des épines dendritiques

Suite à leur découverte, plusieurs rôles ont été attribués aux épines dendritiques. Etant des excroissances de la membrane plasmique, il a initialement été suggéré que les épines avaient pour fonction d'augmenter les zones de contacts entre les neurones et de permettre le contact entre des neurones éloignés physiquement (Yuste, 2015). Depuis, on a une meilleure connaissance de leurs fonctions et on sait qu'elles jouent également un rôle majeur dans la transmission synaptique et la plasticité synaptique.

Concernant la transmission synaptique, les épines dendritiques permettent de compartimenter les fonctions liées à la réception des neurotransmetteurs provenant de multiples afférences neuronales. Ainsi, chaque activation synaptique peut être traitée localement et régulée de façon individuelle et indépendante dans une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde (Ebrahimi & Okabe, 2014; Tønnesen & Nägerl, 2016). La morphologie des épines contribue largement à cette activation locale car elles permettent de cloisonner dans un espace isolé du reste du neurone tous les acteurs essentiels à la transmission synaptique comme cela a été décrit dans la partie précédente. Le cou de l'épine est essentiel à cette fonction, car sa présence permet de réduire la diffusion latérale des récepteurs pharmacologiques à la membrane et favorise donc leur concentration face au compartiment pré synaptique (Ashby *et al*, 2006). La longueur ainsi que le diamètre de cette partie de l'épine participent également à la compartimentalisation des ions Ca^{2+} et des protéines de signalisation intracellulaire (Ebrahimi & Okabe, 2014). Les épines dont le cou est plus long et plus étroit ont ainsi tendance à retenir plus d'ions calcium au niveau de la tête des épines que les épines au cou plus petit et plus large (Noguchi *et al*, 2005).

Les épines dendritiques correspondent également au lieu où se passe l'essentiel des événements de la plasticité synaptique. La plasticité synaptique est à la base de multiples fonctions cognitives telles

que l'apprentissage et la mémoire et est principalement médiée par un processus, découvert dans les années 70, connu sous le nom de potentialisation à long terme (LTP) (Bliss & Lomo, 1973).

Lorsqu'un neurone reçoit des stimuli de hautes fréquences du neurone pré-synaptique, il s'ensuit une réponse de la synapse du neurone post-synaptique qui se renforce en augmentant sa quantité de récepteurs exprimés à sa surface (Liao *et al*, 1995; Lu *et al*, 2001; Rumpel *et al*, 2005). Au niveau cellulaire cela se reflète par un élargissement de la tête des épines et de la PSD (Matsuzaki *et al*, 2004; Nägerl *et al*, 2004; Okamoto *et al*, 2004). Ces modifications se produisent rapidement (quelques secondes après l'initiation de la LTP) ce qui est rendu possible par l'important dynamisme des réseaux d'actine évoqué précédemment (Yang *et al*, 2009). Cela entraîne une augmentation de la réponse synaptique du neurone suite à de nouvelles activations, comme si la synapse se souvenait avoir déjà été stimulée. Une autre conséquence de la LTP est l'apparition de nouvelles épines capables de persister plusieurs mois (Yang *et al*, 2009). Ces épines nouvellement formées sont induites dans des conditions spécifiques telles que l'apprentissage d'une nouvelle compétence et correspondent à l'unité de stockage de la mémoire à long terme (Yang *et al*, 2009). Du fait de leur nature plus mobile et de leur morphologie, ce sont en général au niveau des épines de type « long thin » que s'initient les événements de LTP (Matsuzaki *et al*, 2004).

La LTP fait intervenir de nombreux acteurs et se déroule comme suit. Les stimulations à haute fréquence du neurone pré-synaptique se traduisent par une libération importante de glutamate qui se fixe alors de façon accrue au récepteurs AMPA du neurone post-synaptique. Ces derniers restant ainsi ouverts plus longtemps, cela engendre une forte dépolarisation de la membrane ce qui permet d'activer l'ouverture des récepteurs NMDA. Cette étape est requise pour l'initiation de la LTP, et l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA entraîne sa suppression (Collingridge *et al*, 1983). Il y a ainsi une entrée de calcium importante ce qui a pour effet d'activer les voies de signalisations intra-cellulaires dépendantes du calcium. Il a été montré que l'activation de la protéine CAMKII est nécessaire et suffisante pour déclencher les mécanismes de la LTP (Pettit *et al*, 1994; Lledo *et al*, 1995; Herring & Nicoll, 2016). Les voies cellulaires dépendantes du calcium sont à l'origine de cascades de phosphorylation qui vont permettre d'acheminer encore plus de récepteurs AMPA à la membrane plasmique post-synaptique et de les activer davantage en augmentant leur temps d'ouverture (Benke *et al*, 1998; Lu *et al*, 2001; Rumpel *et al*, 2005). D'autres réactions de phosphorylation apparaissent ultérieurement et aboutissent à l'activation de gènes importants pour la croissance synaptique. En réponse à la LTP il y a alors une induction des réactions de polymérisation des filaments d'actine (Lin *et al*, 2005). De plus, l'absence de certaines protéines régulatrices du cytosquelette comme la n-Cofilin ou l'Arp2/3 engendre des perturbations des mécanismes d'apprentissage et de mémorisation (Rust *et al*, 2010).

A l'inverse lorsqu'un neurone reçoit une activation sous de faibles fréquences, il y a induction de la dépotentialisation à long terme ou LTD qui se caractérise par une diminution de la taille et du nombre de synapses (Nägerl *et al*, 2004; Okamoto *et al*, 2004; Zhou *et al*, 2004).

Ainsi, en réponse à diverses fréquences des stimuli extérieurs, les épines dendritiques sont capables de modifier leur morphologie, et renforcer ou affaiblir leurs contacts synaptiques, voire les éliminer.

5- Épines dendritiques et TSA

Les TSA comme cela a été évoqué précédemment sont caractérisés par des problèmes de connectivité neuronale suggérant des anomalies synaptiques. Nous savons, de plus, que les mutations génétiques affectant les gènes codant pour certaines protéines synaptiques adressées vers les épines dendritiques présentent des facteurs de risque pour les TSA. Il n'est donc pas surprenant que ces structures essentielles pour la communication neuronale soient altérées lors du développement des TSA et des troubles qui leurs sont associés.

Quelques informations sur la densité en épines dendritiques ont été apportées par l'analyse de cerveaux post-mortem de patients avec TSA. La plupart d'entre elles ont mis en évidence une plus forte densité d'épines dendritiques chez les patients avec TSA au niveau des aires corticales temporales, frontales et pariétales, qui sont des aires de haut niveau associationnel, servant des fonctions cognitives très intégrées (Hutsler & Zhang, 2010; Tang *et al*, 2014, Weir *et al*, 2018). Cet excès d'épines dendritiques pourrait s'expliquer par une synaptogenèse trop active chez les patients ou bien par une altération des mécanismes impliqués dans les événements d'élagages des synapses ayant lieu au cours de l'enfance. Cette deuxième option a été suggérée par l'étude de Tang *et al* qui ont constaté une diminution moins forte du nombre d'épines dendritiques entre l'enfance et l'adolescence chez les patients (Tang *et al*, 2014). Une autre étude a reporté des résultats opposés avec le cas de deux adolescents et d'un adulte présentant une densité d'épines dendritiques plus basse que la normale (Williams *et al*, 1980).

De nombreuses données ont également été obtenues grâce aux modèles murins mutés sur des gènes synaptiques susceptibles d'agir sur le développement et la morphologie des épines dendritiques. Dans la majorité des études, il s'agit de gènes codant des protéines associées au cytosquelette, des protéines d'échafaudage ou encore des protéines de signalisation intracellulaire. Ainsi, lorsque ACTN4 ou la myosineIXb, deux protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette sont mutées, cela induit une augmentation de la densité d'épine dendritique de type Long Thin (Hlushchenko *et al*, 2018). Dans le cas des protéines d'échafaudage, un certain nombre d'exemples ont déjà été présentés dans la partie dédiée à SHANK3 et ont mis en évidence une diminution de la densité en épines dendritiques (Bozdagi *et al*, 2010; Peça *et al*, 2011). En plus de ces modèles animaux, des analyses *in vitro* ont également été réalisées (Roussignol *et al*, 2005; Durand *et al*, 2012). Ainsi, l'inhibition de SHANK3 induit une baisse de la quantité d'épines tandis qu'une surexpression de SHANK3 est à l'origine d'une augmentation du

nombre d'épines. Lorsque des formes mutées de SHANK3 sont surexprimées, l'induction d'épines dendritique est d'autant plus affaiblie que la mutation est sévère (Durand *et al*, 2012). Là encore, la situation inverse peut être observée comme c'est le cas pour les modèles de souris invalidées pour *Syngap1* ou *Pten* qui présentent une augmentation de la densité d'épines dendritiques (Vazquez *et al*, 2004; Kwon *et al*, 2005).

La variation des résultats observée dépend des régions cérébrales analysées ainsi que de l'âge des souris et reflètent l'hétérogénéité des phénotypes observés chez les patients avec TSA. La complexité de l'étiologie génétique pourrait également être l'origine des différences observée dans les études menées à ce jour. Ainsi, lorsque la cause génétique est plus restreinte comme c'est le cas pour les syndromes génétiques, les anomalies synaptiques sont plus spécifiques et une signature phénotypique de ces anomalies peut être attribuée à chacun de ces syndromes (figure 14).

Par exemple les patients atteints du syndrome de l'X fragile sont en général caractérisés par la présence prépondérante d'épines longues et ondulées (Hinton *et al*, 1991; Irwin *et al*, 2000). Cette morphologie est également retrouvée dans le cerveau de souris mutées FMRP, le gène en cause dans le syndrome de l'X fragile (FXS), en particulier au niveau du cortex (Comery *et al*, 1997). Ces observations suggèrent des déficits de la maturation synaptique. De plus, lors de la phase de synaptogenèse, les souris mutées présentent une densité en épines plus élevée qui tends à se normaliser à des stades développementaux plus tardifs (Nimchinsky *et al*, 2001). Par contre, l'analyse de la densité chez l'adulte montre que celle-ci est plus forte chez les souris mutées tout comme chez les patients (Comery *et al*, 1997; Irwin *et al*, 2000; Pan *et al*, 2010). Un phénotype supplémentaire concerne la nature instable des épines dendritiques chez les souris mutées. Un turn-over anormalement élevé a en effet été détecté chez ces souris (Cruz-Martín *et al*, 2010; Pan *et al*, 2010; Padmashri *et al*, 2013).

La situation opposée est retrouvée chez les souris mutées sur *Tsc1* et *Tsc2*, deux gènes impliqués dans le syndrome de la sclérose tubéreuse. En effet, en début de développement, la densité en épines dendritiques de ces souris est inférieure à celle observée chez les souris sauvages et devient supérieure lorsqu'elle est analysée chez des souris plus âgées (Tavazoie *et al*, 2005; Tang *et al*, 2014). L'augmentation de la densité des épines dendritiques serait due à une altération des voies autophagiques engagées dans l'élagage des synapses (Tang *et al*, 2014).

Concernant le syndrome de Rett, les analyses sur des cerveaux post-mortem de patients ont montré une diminution de la densité en épines dendritiques au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Chapleau *et al*, 2009). Ces résultats sont reproduits dans différents modèles de souris mutées dans *Mecp2* (Chao *et al*, 2008; Baj *et al*, 2014) ainsi qu'à partir de neurones dérivés d'iPSC de patients avec le syndrome de Rett (Marchetto *et al*, 2010). Dans les neurones de souris, la baisse en densité d'épines n'est observable qu'en début de développement, un rétablissement du nombre d'épines apparaissant plus tardivement (Chao *et al*, 2008; Chapleau *et al*, 2012; Baj *et al*, 2014). De plus, il a été montré que ces neurones développent moins d'épines matures (Baj *et al*, 2014). Ce syndrome se caractérise donc par un

défaut de formation des synapses aux stades précoces du développement mais qui semble être compensé aux stades plus tardifs.

Dans le cas du syndrome d'Angelman, les neurones des patients et souris déficientes pour la copie maternelle de Ube3a, développent moins d'épines dendritiques et ces dernières sont plus immatures (Jay *et al*, 1991; Kim *et al*, 2016). Ces anomalies sont visibles dans diverses structures cérébrales dont l'hippocampe, le cervelet et le cortex (Dindot *et al*, 2008) et n'apparaissent qu'après plusieurs semaines de développement suggérant une formation normale des synapses (Kim *et al*, 2016).

Les patients atteints de trisomie 21 partagent également des propriétés similaires par rapport aux densités et à la morphologie des épines dendritiques. Plusieurs études réalisées sur des cerveaux post-mortem de patients trisomiques ont ainsi montré une réduction de la densité d'épines dendritiques (Marin-Padilla, 1976; Suetsugu & Mehraein, 1980; Takashima *et al*, 1981). Ces résultats ont été confirmés dans des modèles de souris pour la trisomie 21. Un élargissement de la tête des épines a également été décrit par plusieurs équipes (Belichenko *et al*, 2007; Haas *et al*, 2013)

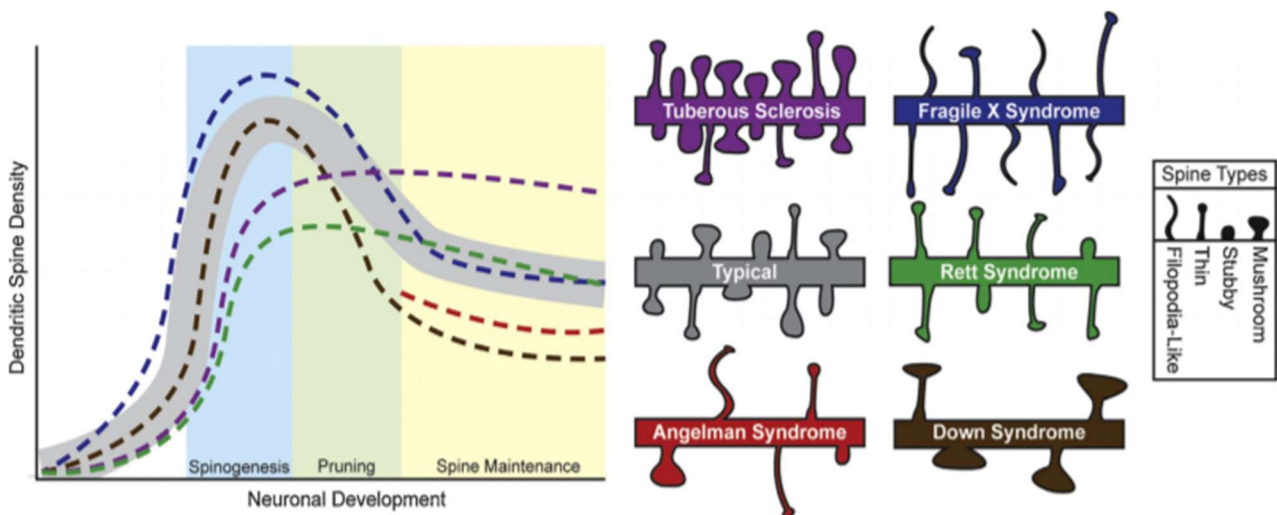


Figure 14 : Profil des anomalies retrouvées au niveau des épines dendritiques dans les différents troubles liés aux TSA.

Certains troubles liés aux TSA sont caractérisés par des altérations des épines dendritiques pouvant s'exprimer par une densité ou une morphologie anormale. Les anomalies ainsi que leur origine sont spécifiques à chacun de ces troubles. La variation de la densité en épines dendritiques peut résulter d'un dysfonctionnement des mécanismes suivants : spinogénèse, élagage des synapses et maintenance des synapses. Figure issue de Phillips & Pozzo-Miller, 2015

III] Modèle d'étude

A) Présentation du modèle iPSC

1- Définitions des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules non différenciées capables de s'auto-renouveler et de se différencier en un ou différents types cellulaires donnés. On dénombre quatre catégories de cellules souches selon leur capacité de différenciation possible (figure 15).

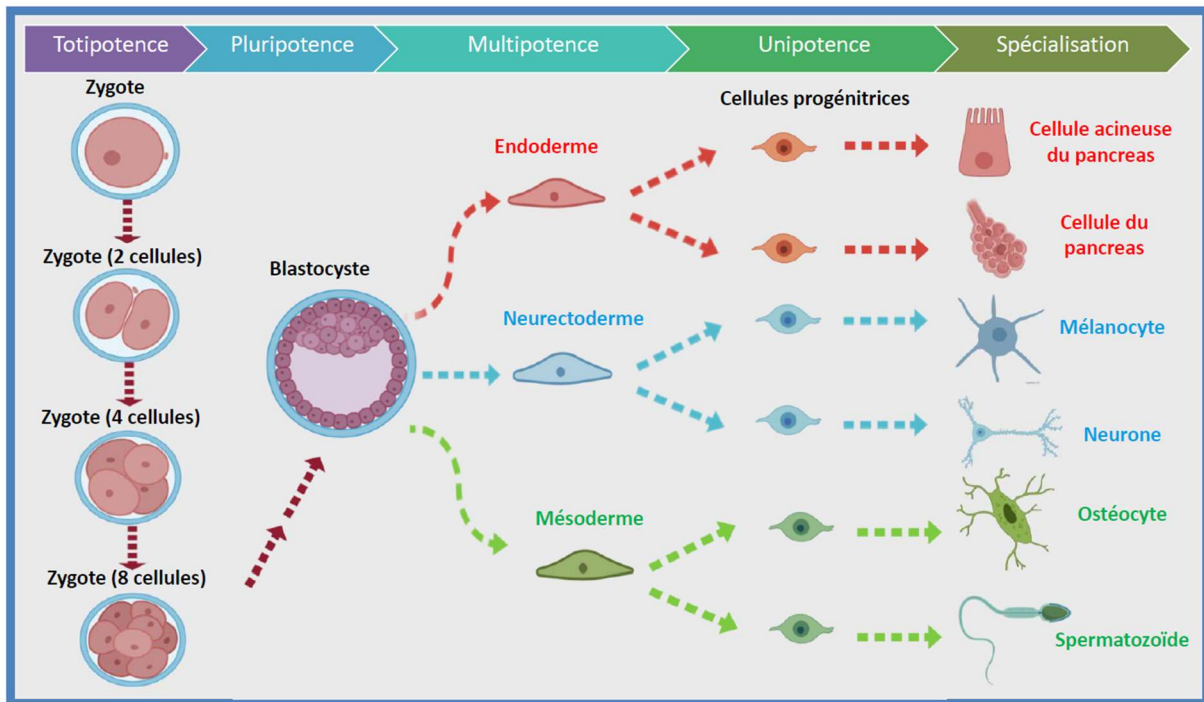


Figure 15 : Cellules souches et leurs niveaux de différenciation possibles

Au cours de l'embryogenèse le niveau de différenciation des cellules embryonnaires évolue et devient de plus en plus limité. Au départ, les cellules sont totipotentes et peuvent se différencier dans tous les types cellulaires. A partir du stade blastocyste, les cellules deviennent multipotentes et ne peuvent donner naissance qu'aux trois lignées germinales. Plus tard, les cellules se spécialisent dans une des trois lignées germinales et se tournent vers un statut pluripotent. Le niveau le plus restreint correspond au stade d'unipotence. Lorsque ces cellules perdent leur capacité à se diviser, celles-ci ne sont plus considérées comme des cellules souches et correspondent alors aux cellules somatiques de l'organisme. (Figure réalisée avec biorender.com)

- Les cellules souches totipotentes sont les cellules dont la capacité de différenciation est la plus élevée. Elles peuvent ainsi redonner tous les types cellulaires retrouvés dans un organisme. Cela comprend les cellules dérivant des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme et neurectoderme) et les cellules dérivant des lignages extra-embryonnaires tels que le placenta et le cordon ombilical.
- Les cellules souches pluripotentes peuvent donner naissance à toutes les cellules issues des trois feuillets embryonnaires ainsi qu'aux cellules germinales mais ne permettent pas l'obtention des annexes embryonnaires comme le placenta.
- Les cellules souches multipotentes se trouvent à un stade plus avancé de différenciation. Elles sont dites déterminées, ce qui signifie qu'elles donnent naissance à un nombre plus

limité de types cellulaires. Un exemple de cellules souches multipotentes est représenté par les cellules souches neurales capables de se différencier aussi bien en neurones qu'en astrocytes.

- Les cellules souches unipotentes ne peuvent générer qu'un type cellulaire mais conservent leur capacité de s'auto-renouveler.

En plus des cellules souches embryonnaires (ESC), il existe d'autres types cellulaires partageant ces propriétés : les cellules souches adultes ainsi que les cellules souches pluripotentes induites (iPSC).

a. Les cellules souches embryonnaires

L'étude *in vitro* des cellules souches embryonnaires s'est déployée suite à des observations réalisées sur des cellules souches issues de tératocarcinome, un type de tumeurs se développant naturellement dans les testicules de jeunes souris de lignée 129 ou lorsque des cellules embryonnaires sont prélevées sur un embryon, puis greffées de façon ectopique sur un autre embryon (Stevens & Little, 1954; Stevens, 1970). Leur analyse a permis de remarquer un comportement typique de celui adopté par les cellules souches embryonnaires. Elles sont notamment capables de proliférer *in vitro* de façon autonome et de se différencier *in vitro* ou *in vivo*, après réinjection dans un embryon, dans les différents types cellulaires des trois feuillets embryonnaires : endoderme, mésoderme et ectoderme (Kleinsmith & Jr, 1964).

En se basant sur ces travaux et en testant différents facteurs, deux équipes sont parvenues, en 1981, à isoler puis à maintenir en culture des cellules prélevées dans la masse interne de blastocystes de souris. Les recherches de Evans et Kaufman ont démontré que le prélèvement des cellules sur des embryons de 5 jours et demi permettaient d'obtenir des lignées de cellules souches embryonnaires capables d'être maintenues *in vitro* (Evans & Kaufman, 1981). Parallèlement, le professeur Martin a trouvé d'autres conditions de cultures adéquates, en réalisant des co-cultures de cellules souches embryonnaires avec des cellules souches issues de tératocarcinome sur tapis de fibroblastes (Martin, 1981). En utilisant la même technique, l'équipe de Thomson a isolé les premières cellules souches embryonnaires humaines en 1998 (Thomson *et al*, 1998). Elles sont extraites entre le 5^{ième} et 7^{ième} jour à partir de blastocystes au niveau de la masse cellulaire interne.

Ces cellules souches maintenues en cultures ont fait l'objet de nombreuses études. En particulier, elles ont été utilisées pour la modélisation de pathologies grâce aux prélèvements de cellules souches sur des embryons portant des anomalies génétiques (Verlinsky *et al*, 2005). Elles ont également été exploitées dans le cadre de criblages de molécules thérapeutiques et d'essais cliniques. La majorité d'entre eux se sont orientés vers le traitement de maladies oculaires, dont les dégénérescences maculaires

liées à l'âge. Une équipe est ainsi parvenue à améliorer les capacités visuelles de plus de la moitié des patients ayant reçu une transplantation d'épithélium pigmentaire rétinien dérivé d'ESC (Schwartz *et al*, 2015).

Néanmoins, depuis la mise à jour des lois de bioéthique françaises en 2016 condamnant la destruction d'embryons viables et plus particulièrement depuis la mise en place de l'article L. 2151-5, leur prélèvement est soumis à une réglementation très stricte. Seuls les embryons obtenus dans le cadre d'aide à la procréation par le biais de fécondation *in vitro* et ne faisant plus l'objet d'un projet parental ne peuvent être retenus pour y prélever des cellules souches embryonnaires. Cela inclut également les embryons qu'il n'est pas possible de réimplanter, ainsi que les embryons porteurs d'anomalies génétiques. De plus, l'agence de biomédecine doit au préalable évaluer et accepter le projet de recherche et s'assurer que le projet respecte les 4 critères suivants : 1) Pertinence scientifique du projet, 2) Projet répondant à des questions de santé publique, 3) Pas de modèle alternatif pour mener le projet 4) Respect de la réglementation instaurée par les lois de bioéthique (d'après legifrance.gouv.fr).

b. Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes constituent un autre type de cellules souches que l'on peut retrouver dans un organisme à l'âge adulte. Elles possèdent les mêmes caractéristiques d'auto-renouvellement que les cellules souches embryonnaire précédemment décrites.

Leur fonction principale est de maintenir l'homéostasie d'un organisme mais elles interviennent en outre dans le remplacement de cellules perdues dans des conditions physiologiques (turnover des cellules d'un tissu), pathologiques (maladie neurodégénératives) ou lors de situations accidentelles (lésions cérébrales). Elles peuvent ainsi demeurer dans un état quiescent pendant de longues périodes et reprendre les divisions en cas de besoin. Elles sont alors recrutées par le tissu grâce à la réactivation de leur cycle cellulaire.

Il en a été identifié dans un grand nombre de tissus différenciés. On en observe par exemple dans la moelle osseuse abritant deux types de cellules souches adultes : les cellules souches mésenchymateuse qui pourront donner naissance à de nouvelles cellules osseuses, cartilagineuses et musculaires et les cellules souches hématopoïétiques qui pourront être à l'origine de nouvelles cellules du lignage sanguin (Serakinci & Keith, 2006). Les cellules souches adultes peuvent être plus restreintes en terme de différenciation comme c'est le cas des cellules satellites localisées au niveau des myofibres du muscle squelettique strié. Ces dernières permettent, en cas de lésions, une régénération rapide du muscle squelettique (en seulement 2 à 3 semaines) mais sont limitées à une seule voie de différenciation (Relaix & Zammit, 2012; Dulak *et al*, 2015). Les cellules souches adultes sont en général déjà engagées dans une voie de différenciation cellulaire, mais certaines études ont montré qu'il était possible de les

détourner afin de donner naissance à d'autres types cellulaires (Hombach-klonisch *et al*, 2008; Uz *et al*, 2018).

Pendant longtemps, le dogme sur la fixité neuronale émis par Ramon et Cajal a prévalu. Il était en effet admis que le cerveau demeurait statique après la naissance et personne ne pensait que ce dernier puisse se remodeler et encore moins se régénérer suite à une perte de cellules neuronales à l'âge adulte. C'est à la faveur des observations des chercheurs Altman et Das que l'hypothèse stipulant l'existence de neurogenèse à l'âge adulte a été reconsidérée (Altman & Das, 1965).

Bien qu'existant dans certains cas à l'état dispersé dans le tissu, les cellules souches adultes s'organisent majoritairement au sein de territoires spécialisés appelés niches. Il s'agit de microenvironnement où siègent un ensemble de cellules et facteurs impliqués dans le maintien et la régulation des cellules souches adultes. Dans le cerveau, deux niches sont, à ce jour, bien documentées (Conover & Todd, 2017; Andreotti *et al*, 2019). Il s'agit des niches localisées au niveau de la zone sous-ventriculaire et de la zone granulaire du gyrus denté. Elles sont composées de cellules astrogliales, de cellules vasculaires et de cellules épendymales (García-Verdugo *et al*, 2002). Les cellules endothéliales du système vasculaire participent à la régulation des cellules souches neurales adultes en sécrétant des facteurs de croissance, comme l'EGF (endothelial growth factor), qui activent leur prolifération ou, au contraire, des facteurs, tels que la neurotrophin-3, qui favorisent leur maintenance dans un état quiescent (Delgado *et al*, 2014).

Au niveau de la zone sous-ventriculaire, les cellules souches neurales adultes se différencient en interneurons avant de migrer vers les bulbes olfactifs afin de repeupler ces derniers (Altman & Das, 1965; Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Au niveau de la zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe, les cellules souches neurales adulte se différencient en neurones excitateurs granulaires et migrent ensuite vers la zone granulaire (Altman & Das, 1965). Les neurones nouvellement formés par les cellules souches adultes sont capables de s'intégrer dans les circuits et de participer à certaines fonctions comme l'apprentissage et la mémoire. Ainsi, lorsque des souris sont placées dans des conditions qui stimulent la neurogenèse, de meilleures aptitudes de mémorisation sont observées (Monteiro *et al*, 2014).

2- Génération de cellules souches pluripotentes par reprogrammation

De par le potentiel thérapeutique des cellules souches, un effort considérable a été fourni par les scientifiques du monde entier pour produire en laboratoire des cellules possédant les caractéristiques d'auto-renouvellement et de pluripotence et ainsi s'affranchir des limitations liées à l'utilisation des ESC et des cellules souches adultes. Plusieurs approches ont été employées au cours des années pour atteindre

cet objectif. Les recherches se sont orientées vers une volonté de réinitialiser l'état transcriptionnel de la cellule pour un retour à un contexte génétique proche de celui des cellules souches embryonnaires (figure 16).

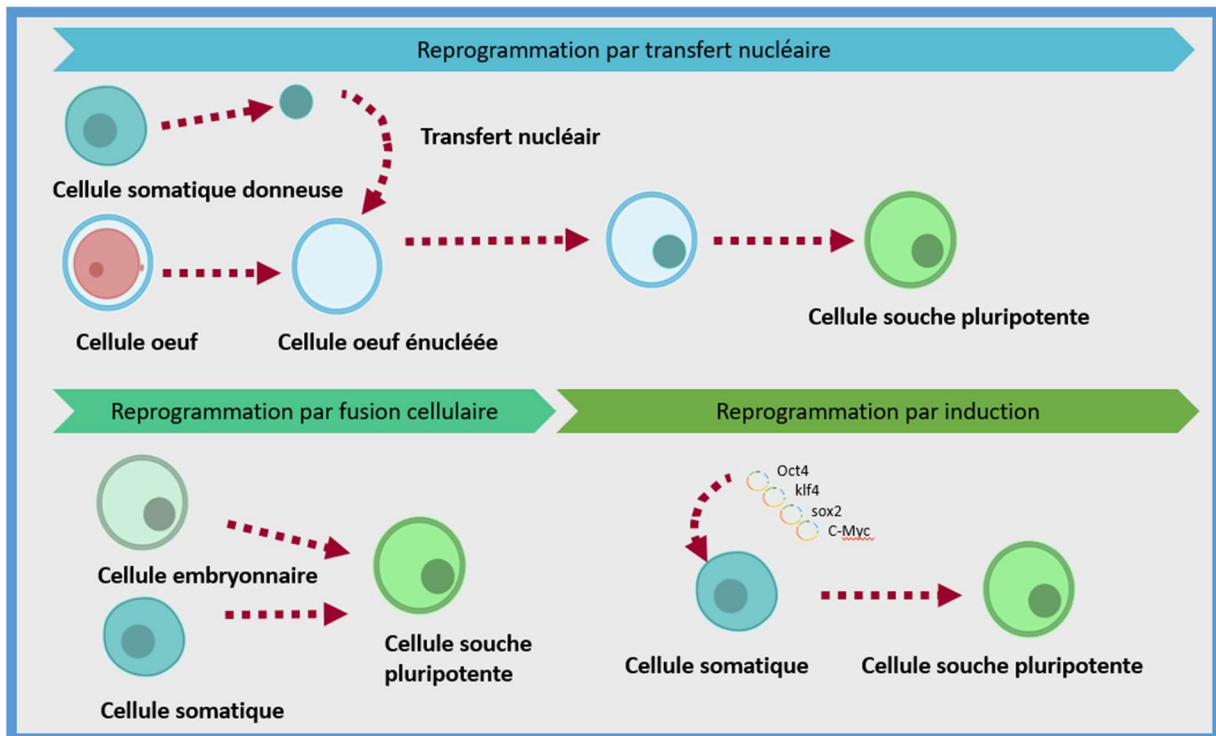


Figure 16 : Présentation des différentes techniques de reprogrammation
(Figure réalisée avec biorender.com)

a. Reprogrammation par transfert nucléaire

La technique de transfert nucléaire de cellules somatiques (SCNT) consiste à extraire le noyau d'une cellule somatique avant de l'insérer dans une cellule œuf dépourvue de noyau.

Mise au point par les chercheurs Briggs et Kings dans les années 50 (Briggs & King, 1952), ce n'est que dix ans plus tard que les premiers succès de reprogrammation via la technique de transfert nucléaire ont été obtenus. En utilisant le même procédé que ses prédécesseurs, Gurdon est parvenu à cloner le tout premier animal en transplantant le noyau de cellules épithéliales de l'intestin de Xénope dans une cellule œuf énucléée de la même espèce (Gurdon, 1962). Néanmoins, le taux de réussite de ses expériences est très faible et ne dépasse pas les 5%. En effet, seule la moitié des cellules œufs démarre le processus de clivage, et pour la plupart d'entre elles, il y a un arrêt précoce du développement de l'embryon qui s'ensuit, ou alors l'apparition d'anomalies développementales (Gurdon, 1962). Malgré cela, ses travaux ont permis de démontrer que les cellules différenciées conservaient dans leur ADN la capacité de former un embryon. Ces résultats suggèrent ainsi que l'information génétique contenue dans

les cellules embryonnaires ne se modifie pas au cours du développement et que les cellules somatiques sont capables, sous certaines conditions expérimentales, de revenir à un état pluripotent.

C'est grâce à cette technique que le premier mammifère, une chèvre nommée Dolly, est né par clonage c'est-à-dire sans passage par la reproduction sexuée (Wilmot *et al*, 1997). Depuis, cette technique a été adaptée et appliquée à une vingtaine d'espèces dont la souris (Wakayama *et al*, 1998), la chèvre (Baguisi *et al*, 1999), le cochon (Onishi *et al*, 2000; Polejaeva *et al*, 2000), le chat (Pryor *et al*, 2002), le lapin (Chesné *et al*, 2002), le cheval (Galli *et al*, 2003), le rat (Zhou *et al*, 2003), et le singe (Liu *et al*, 2018).

L'application de cette méthode pour la reprogrammation de cellules somatiques humaines a fait face à de grandes difficultés et un grand nombre d'ajustement a dû être apporté. Après plusieurs tentatives non fructueuses de transfert nucléaire de cellules somatiques aboutissant à l'arrêt prématuré du développement de l'embryon (Cibelli *et al*, 2001), les travaux de Noggle ont révélé la possibilité d'atteindre le stade blastocyste lorsque le génome de la cellule œuf est conservé (Noggle *et al*, 2011). Cette découverte pour le moins surprenante a engendré une étude plus approfondie de l'état méiotique des oocytes humains. Cela a permis à des chercheurs de l'Université de l'Oregon de remarquer que l'arrêt en métaphase II des oocytes, nécessaires à la réussite de la reprogrammation par transfert nucléaire, était instable (Tachibana *et al*, 2013). Grâce à ces observations, cette équipe est parvenue à optimiser les conditions expérimentales relatives aux étapes d'énucléation, du transfert nucléaire et de l'activation cytoplasmique des oocytes dans le but de synchroniser le nucléus somatique et le cytoplasme de la cellule œuf et permettre le bon développement de l'embryon (Tachibana *et al*, 2013). Les cellules de tels embryons expriment des marqueurs de cellules souches et sont capables de donner naissance aux trois lignées germinales ce qui démontre leur état pluripotent (Tachibana *et al*, 2013)

b. Reprogrammation par fusion cellulaire

Le génome d'une cellule peut également être reprogrammé par la fusion de deux cellules. Ce procédé, également connu sous le terme d'hybridation cellulaire, met en jeu l'union de deux cellules pouvant être phénotypiquement dissemblables (Green *et al*, 1966), voire provenir d'espèces différentes (Davidson *et al*, 1966). Au terme du processus, le contenu (cytoplasme et noyau) de chacune des deux cellules se mélange, ce qui engendre la formation d'une cellule hybride. Lorsque les noyaux des deux cellules parentales persistent dans la cellule hybride, on parle d'hétérocaryon. Les noyaux peuvent également s'assembler pour donner naissance à un syncaryon. Cet événement apparaît spontanément à divers moments de la vie d'un organisme. Il intervient notamment au cours de la formation des cellules musculaires et osseuses ou encore pendant la fécondation (Abmayr & Pavlath, 2012).

Toutefois, il est également possible de provoquer la fusion de deux cellules *in vitro*. Alors que dans certains cas, le phénotype de la cellule hybride correspond à un état intermédiaire de celui des cellules parentales (Que *et al*, 2004) avec l'expression des deux génomes, la fusion entre des cellules

souches embryonnaires et des cellules somatiques conduit à la formation de cellules phénotypiquement proches des cellules embryonnaires. Les cellules hybrides issues de ce type de fusion, arborent une morphologie caractéristique des cellules embryonnaires et expriment les facteurs spécifiques de pluripotence (Matveeva *et al*, 1998; Tada *et al*, 2001). De plus, lorsqu'elles sont réinjectées dans un embryon, ces cellules sont capables de donner naissance aux 3 lignées germinales (Matveeva *et al*, 1998; Tada *et al*, 2001). Néanmoins, certaines propriétés spécifiques à l'état somatique, comme l'empreinte parentale, ne sont pas toujours effacées lors de la reprogrammation par fusion cellulaire (Tada *et al*, 2001; Jang *et al*, 2016).

c. Reprogrammation par induction

Les deux premières méthodes de reprogrammation ont apporté les preuves qu'une cellule somatique pouvait être reformatée en cellules souches pluripotentes mais la nécessité d'utiliser des cellules souches embryonnaires ou de détruire des embryons a incité les chercheurs à repenser ces systèmes et à élaborer des solutions alternatives.

C'est en exploitant les données obtenues précédemment que Shinya Yamanaka, un chercheur japonais, a découvert en 2006 qu'il était possible de transformer une cellule somatique en cellules souches pluripotentes par induction moléculaire. Son hypothèse était qu'il existait des facteurs présents dans les œufs non fécondés, ainsi que dans les cellules souches embryonnaires, capables de modifier le profil transcriptionnel d'une cellule somatique afin de la conduire dans un état pluripotent.

Après avoir sélectionné 24 facteurs susceptibles de jouer ce rôle, ces derniers ont été surexprimés tout d'abord individuellement, puis de façon combinée, afin de déterminer précisément lesquels étaient nécessaires et suffisants pour l'induction de la pluripotence. Ces différents tests ont permis d'identifier une combinaison de 4 facteurs répondant à ce critère: Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4), Sox2 (SRV-box 2), Klf4 (Krüppel-like factor) et c-Myc (Myc proto-oncogene protein) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Ces travaux ont été récompensés par le prix Nobel de médecine qu'il a partagé avec Gurdon en 2012. Les cellules reprogrammées par cette méthodologie possèdent plusieurs signes de pluripotence. Elles sont notamment à l'origine de tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéficientes et peuvent se différencier dans les trois lignées germinales (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Le protocole de reprogrammation par induction moléculaire (Takahashi *et al*, 2007) a été appliqué aux cellules somatiques humaines l'année suivante et a permis d'obtenir des iPSC humaines aux caractéristiques similaires à celles des iPSC d'origine murines (Takahashi *et al*, 2007). Elles diffèrent néanmoins sur les mécanismes d'autorenouveau utilisés ainsi que sur le plan morphologique (Takahashi *et al*, 2007).

L'acquisition de l'état de pluripotence peut être contrôlée par l'observation de l'apparition ou de la disparition de certains antigènes spécifiques (Polo *et al*, 2012; Malley *et al*, 2014; Quintanilla *et al*, 2014). Pendant les étapes de reprogrammation, différents états intermédiaires coexistent. Ces marqueurs donnent ainsi la possibilité de différencier ces populations cellulaires et de sélectionner celles qui ont complètement finalisé le processus.

Les parties suivantes ont pour but de détailler ce modèle.

3- Mécanismes impliqués dans la formation des iPSC

a. Présentation des différentes étapes de reprogrammation

Le processus de reprogrammation s'effectue en plusieurs étapes se déroulant successivement mais dont la chronologie peut varier en fonction des espèces et des types cellulaires (Apostolou & Stadtfeld, 2018). Il peut se décomposer en trois phases distinctes (Samavarchi-Tehrani *et al*, 2010; Chen *et al*, 2016).

Cela débute par la phase d'initiation durant laquelle les gènes somatiques sont inhibés et des gènes normalement exprimés au stade embryonnaire tels que SSEA-1 ou l'Alcaline Phosphatase sont ré-activés (Brambrink *et al*, 2008). Ces derniers codent principalement des protéines impliquées dans les voies associées à la prolifération et au métabolisme (Polo *et al*, 2012). D'importants changements morphologiques ont également lieu pendant cette phase, comme le témoigne l'observation d'une réduction de la taille cellulaire se déclenchant peu de temps après l'ajout des facteurs de reprogrammation (Høffding & Hyttel, 2015).

L'initiation est suivie par la phase de maturation, marquée par l'apparition des marqueurs de pluripotences précoces tels que Nanog et Oct4 (Brambrink *et al*, 2008).

Enfin, la reprogrammation se termine par la phase de stabilisation correspondant au moment où la cellule est capable d'assurer ses fonctions pluripotentes de façon autonome, c'est-à-dire en l'absence de facteurs exogènes (Brambrink *et al*, 2008; Samavarchi-Tehrani *et al*, 2010). C'est au cours de cette dernière phase que débute l'expression des gènes de pluripotence tardifs comme Sox2, Utl1 et Lin28 (Brambrink *et al*, 2008; Samavarchi-Tehrani *et al*, 2010). Les cellules reprogrammées sont également caractérisées par (1) la réactivation du chromosome X éteint dans les cellules somatiques d'individus de sexe féminin, (2) une augmentation de l'expression de la télomérase ainsi que par (3) leur état immortel (Stadtfeld *et al*, 2008; Apostolou & Hochedlinger, 2013).

Durant toutes ces étapes, le passage à l'état de pluripotence s'accompagne de modifications épigénétiques complexes, le but étant de lever les barrières épigénétiques empêchant l'expression des gènes de pluripotence et d'inhiber l'expression des gènes somatiques. Ceci implique un remodelage de la chromatine du génome via des réactions de méthylation et d'acétylation de l'ADN et des histones, ainsi que des réarrangements de la structure tri-dimensionnelle de la chromatine. Ces événements

constituent des étapes limitantes, et seules quelques cellules seront capables de les passer (Polo *et al*, 2012).

b. Modification des histones

Une des principales différences entre l'état somatique et pluripotent d'une cellule est liée au niveau de condensation de sa chromatine. La chromatine compactée ou hétérochromatine est caractérisée par la présence de marques répressives correspondant, entre autres, à la présence de 3 groupements méthyles sur les lysines 9 et 27 de l'histone 3 (H3K9me3 et H3K27me3 respectivement) (Gaspar-Maia *et al*, 2011). Son accessibilité en est plus réduite et cela conduit à une diminution de la transcription des gènes qu'elle contient. Lorsqu'elle est dans un état plus relâché, la chromatine ou euchromatine est associée à des marques activatrices comme la présence de groupements méthyles sur la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me2) ou de groupement acétyles sur les lysines 27 de l'histone 3 (H3K27ac). Dans ce cas, la transcription des gènes contenus dans cette région est activée (Gaspar-Maia *et al*, 2011). Les histones peuvent aussi porter des marques dites bivalentes (présence simultanée de marques activatrices et répressives) (Bernstein *et al*, 2006). Les gènes portant ces marques sont peu, voire pas exprimés mais peuvent être réactivés très rapidement (Apostolou & Hochedlinger, 2013).

Pendant le processus de reprogrammation, un remaniement du profil de méthylation et d'acétylation est identifiable et survient peu de temps après l'introduction des facteurs de croissance (Koche *et al*, 2011). Cela aboutit à une décondensation globale de la chromatine (Knaupp *et al*, 2017). Les marques de type répressives telles que H3K9me et H3K27me se retrouvent plus dispersées sur le génome (Hawkins *et al*, 2010), et localisés au niveau des gènes somatiques. Ces changements épigénétiques entraînent une diminution de l'accessibilité de la chromatine ayant principalement lieu dans les séquences régulatrices de ces gènes (Li *et al*, 2017; Chen *et al*, 2016) et corrélient avec la baisse de leur transcription (Koche *et al*, 2011). Les gènes somatiques sont également inactivés par des réactions de désacétylations médiées indirectement par certains facteurs comme SAP30 (Li *et al*, 2017). Lorsque celui-ci est absent, moins d'iPSC sont formées (Li *et al*, 2017). A l'inverse, les gènes de pluripotence acquièrent au cours de la reprogrammation des marques de type activatrices (Koche *et al*, 2011), localisées à la fois dans leurs séquences régulatrices et leurs promoteurs (Chen *et al*, 2016). Un grand nombre de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire acquièrent, durant la reprogrammation, des marques bivalentes (Apostolou & Hochedlinger, 2013).

c. Modification épigénétique de l'ADN

A l'instar des histones, l'ADN peut également acquérir des modifications épigénétiques qui vont moduler l'expression génique (Gaspar-Maia *et al*, 2011). Ces modifications ont lieu directement sur la molécule d'ADN et correspondent à l'ajout d'un groupement méthyle au niveau de séquences di-

nucléotidiques composées, d'une base cytosine précédant une base guanine (motif CpG). Ces sites peuvent être surreprésentés dans certaines régions appelées îlots CpG. Ces îlots sont eux-mêmes enrichis dans les promoteurs et leur méthylation donne lieu à une répression de la transcription en empêchant les facteurs de transcription de se fixer sur leurs sites de liaison (Gaspar-Maia *et al*, 2011).

Dans les dernières phases de reprogrammation, les gènes impliqués dans les réactions d'élimination des groupements méthyles dont TET2 deviennent plus exprimées (Polo *et al*, 2012). Ces évènements sont primordiaux pour que la reprogrammation soit effective et les protéines TET jouent un rôle essentiel pour leur bon déroulement. Ces protéines interviennent, notamment, au niveau des gènes *Nanog*, *Oct4* et *Esrrb* et permettent l'activation leur transcription (Polo *et al*, 2012; Doege *et al*, 2016). Parallèlement, des méthylations dites *de novo* apparaissent sur les promoteurs de gènes ne devant pas être actifs dans les cellules reprogrammées (Polo *et al*, 2012), ce qui inhibe leur transcription. Les enzymes impliquées dans ces modifications épigénétiques comprennent Dnmt3a et Dnmt3b (Apostolou & Hochedlinger, 2013).

d. Modifications de la conformation tri-dimensionnelle de l'ADN

La conformation spatiale de l'ADN joue également un rôle essentiel dans la régulation de la transcription. Au sein du noyau, l'ADN est organisé via des boucles et des zones d'interactions permettant le contact entre des régions régulatrices distales et des promoteurs qui leur sont associés (Rao *et al*, 2014). Le rapprochement de ces séquences favorise une activation de la transcription ou au contraire une inhibition de la transcription si des facteurs répresseurs sont en jeu (Rao *et al*, 2014).

La comparaison de l'ADN entre les cellules somatiques et les cellules pluripotentes montre une organisation différente suggérant des évènements de repositionnement pendant le processus de reprogrammation. Alors que les gènes de pluripotence ont tendance à être localisés en périphérie du noyau dans les cellules somatiques, ils se retrouvent plus concentrés au centre pour les cellules pluripotentes où ils ont tendance à interagir exclusivement ensemble (Jost *et al*, 2011).

En particulier, dans les cellules pluripotentes, les séquences régulatrices des gènes *Oct4* et *Nanog*, normalement situées à des positions distales, se retrouvent à proximité de leurs promoteurs respectifs (Wei *et al*, 2013; Apostolou *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2013a). Ces rapprochements ont lieu juste avant l'activation de leur transcription (Wei *et al*, 2013; Apostolou *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2013a), ce qui met en évidence l'importance de la conformation pendant les étapes précoces de reprogrammation.

e. Rôle et mode d'action des facteurs de Yamanaka

Afin de mieux comprendre comment se déroulent les différentes étapes de reprogrammation, plusieurs analyses de ChipSeq ont été entreprises. Ces études ont mis en évidence une fixation accrue des facteurs OSKM, pendant les 48 premières heures de reprogrammation (Soufi *et al*, 2012) et que les

régions décondensées et porteuses de marques activatrices sont préférentiellement ciblées (Chen *et al*, 2016; Chronis *et al*, 2017). Ces événements de fixation ont lieu juste avant l’extinction des gènes somatiques. Il a aussi été montré que, contrairement aux autres facteurs, c-Myc n’est pas indispensable pour la reprogrammation. Sa présence augmente néanmoins considérablement son efficacité (Wernig *et al*, 2008; Nakagawa *et al*, 2010). Il favorise, notamment, l’expression de gènes impliqués dans les voies de prolifération et de survie cellulaire et facilite la liaison des autres facteurs de Yamanaka sur leurs cibles, ce qui augmente le succès de passage de certains événements stochastiques (Wernig *et al*, 2008). Il diffère également des autres facteurs sur le type de régions auxquelles il se fixe. Les facteurs OSK se lient majoritairement aux enhanceurs, tandis que le facteur c-Myc est plutôt retrouvé associés aux promoteurs au niveau desquels il régule l’activité de la RNA polymérase II (Rahl *et al*, 2011; Chronis *et al*, 2017). Il permet ainsi de maintenir la transcription des gènes activés par les facteurs OSK. Ces derniers peuvent également se fixer sur les promoteurs lorsqu’ils interagissent avec c-Myc (Chronis *et al*, 2017).

Concernant l’extinction des gènes somatiques, un mécanisme proposé suggère une fixation coopérative des facteurs OSK sur les séquences régulatrices de ces gènes induisant un déplacement des facteurs de transcription somatiques (figure 17). Une autre possibilité est la relocalisation des facteurs de transcription associés aux gènes somatiques vers de nouveaux sites devenus accessibles après les premières étapes de reprogrammation (figure 17). Les facteurs de Yamanaka agissent aussi en modulant l’expression de certains facteurs clés tels que des co-répresseurs ou des modificateurs d’histone, comme le témoigne l’observation d’une diminution de l’expression de l’acétyltransférase p3000, ainsi qu’une augmentation de SAP30 et de la déacétyltransférase HDAC1 entraînant une baisse de marques activatrices H3K27ac sur les enhanceurs des gènes somatiques (figure 17, Li *et al*, 2017; Chronis *et al*, 2017). Des co-répresseurs peuvent également être directement recrutés par les facteurs OSK au niveau des gènes somatiques (Chronis *et al*, 2017). Tous ces mécanismes participent conjointement à la baisse de l’expression des gènes somatiques (figure 17).

L’activation des gènes de pluripotence s’effectuerait en deux temps et serait permise par un remodelage préalable de la chromatine, afin de lui conférer une structure plus relâchée au niveau des gènes de pluripotence (figure 17). Oct4 pourrait jouer ce rôle en interagissant avec le complexe SWI-SNF capable d’agir sur l’organisation 3D de la chromatine (Singhal *et al*, 2010). Klf4, en recrutant la cohésine, participe également à cette étape. Il est en particulier à l’origine de la réorganisation spatiale de la chromatine au niveau des séquences régulatrices de Oct4 et contribue donc à l’activation de sa transcription (Wei *et al*, 2013). Les facteurs OSK permettent également l’élimination des marques répressives H3K27me grâce à leur interaction avec la protéine Utx (Mansour *et al*, 2012). Ainsi contrairement à ce qui est observé dans les études de Chen *et al* et de Chronis *et al*, les facteurs de Yamanaka sont capables de se fixer sur certaines régions condensées de l’ADN et ce dès le début de la

reprogrammation. Cela leur est possible grâce à l'existence de domaines spécifiques capables de reconnaître des séquences nucléosomiques (figure 17, Soufi *et al*, 2012, 2015). Cette étape intermédiaire est nécessaire pour préparer l'activation des gènes de pluripotence localisés au niveau de l'hétérochromatine, peu accessible aux autres facteurs de transcription et co-facteurs endogènes en début de reprogrammation. Cette phase, nécessitant le recrutement de nombreux facteurs autour d'une même région, permet d'expliquer pourquoi les gènes de pluripotence localisés dans des régions compactées de l'ADN sont exprimés tardivement.

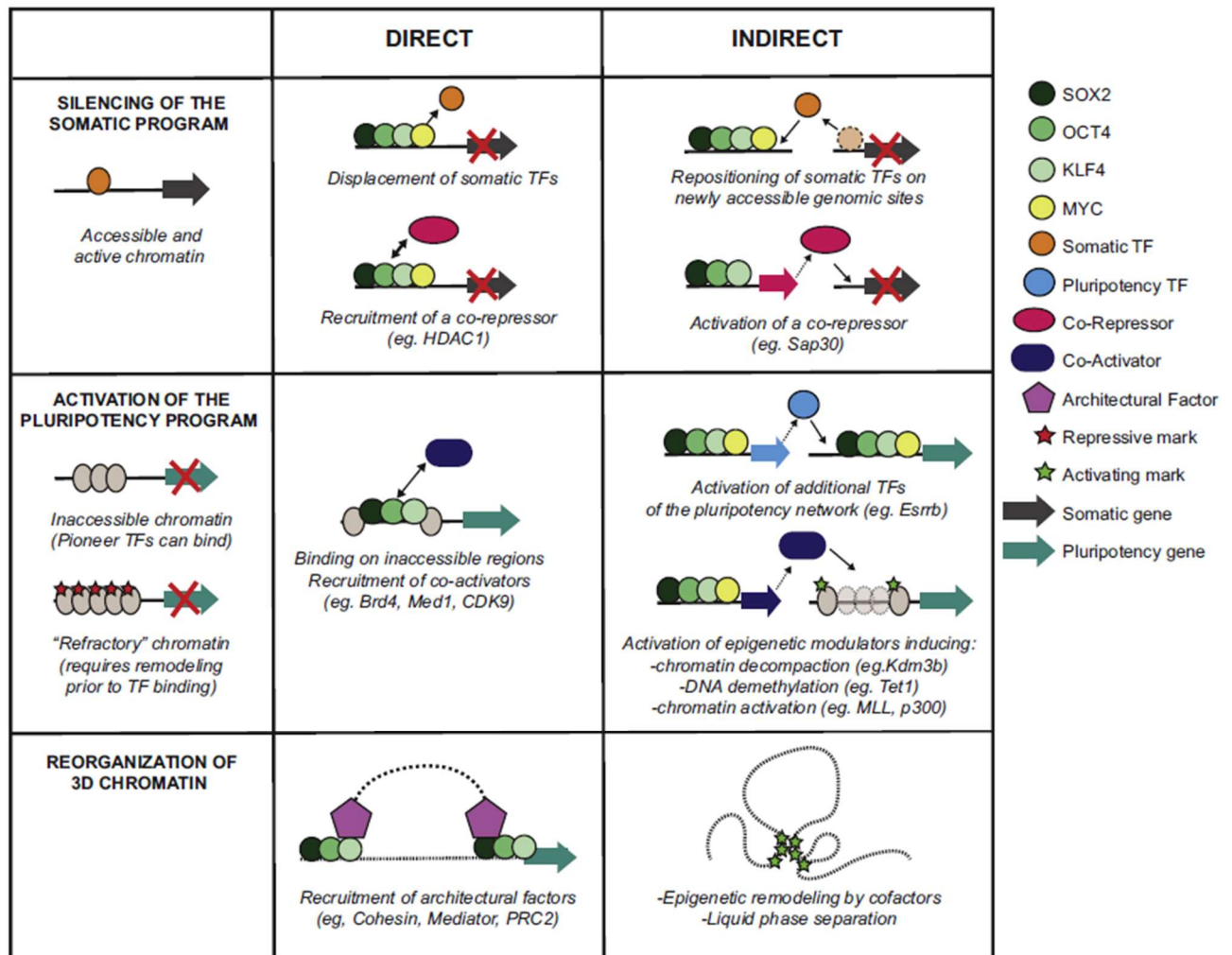


Figure 17 : Exemple de mécanismes impliqués dans les étapes de reprogrammation

Durant la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes de nombreux mécanismes impliquant les facteurs OSKM sont déclenchés et aboutissent à l'inhibition des gènes somatiques ainsi qu'à la réactivation des gènes de pluripotence. Pour certains de ces mécanismes, les facteurs OSKM agissent de manière directe tandis que pour d'autres leurs actions sont indirectes et sont la conséquence d'évènements impliquant d'autres facteurs. Figure issue de Apostolou & Stadtfeld, 2018.

Une fois la chromatine ouverte, il y aurait dans un premier temps, recrutement des facteur OSK au niveau des enhancers des gènes exprimés précocement (Chronis *et al*, 2017). Les gènes exprimés plus tardivement seraient, quant à eux, activés grâce à la co-liaison des facteurs OS sur les enhancers de ces

gènes (Chronis *et al*, 2017). Cette étape est facilitée par l'intervention de co-facteurs et par le fait que la plupart des gènes de pluripotence sont capables d'assurer leur propre transcription. Ils peuvent en effet se fixer sur leurs propres séquences régulatrices ou sur celles appartenant à d'autres facteurs de pluripotence (Boyer *et al*, 2005; Jiang *et al*, 2008). Ainsi, quand un gène de pluripotence commence à être exprimé cela déclenche une boucle d'autorégulation positive aboutissant à une augmentation autonome de leur transcription.

4- Dérivation des cellules iPSC en cellules souches neurales

Les cellules iPSC peuvent être dérivées en différents types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires i.e. l'endoderme, le mésoderme, et l'ectoderme. Plusieurs méthodologies permettent l'obtention de cellules appartenant à la voie neuronale. Le principe étant d'essayer de reproduire les conditions physiologiques se déroulant lors de l'embryogenèse et de récapituler les étapes successives retrouvées dans le cerveau au cours du développement et de la neurogenèse. Au total, trois phases vont se succéder pour aboutir à la naissance des cellules neurales. Dans un premier temps il y a une phase d'induction neurale, suivie par une phase de régionalisation puis d'une phase de différenciation (Mccaughey-Chapman & Connor, 2018). Il est à noter, que les différentes approches décrites ci-dessous ont d'abord été mises en place dans le cadre de l'induction neurale des cellules souches embryonnaires et ont ensuite été adaptées sur les cellules iPSC (Mccaughey-Chapman & Connor, 2018). Une propriété importante de l'induction de la lignée neurale est que, contrairement aux autres lignées germinales, celle-ci ne dépend pas de l'action de morphogènes. L'identité neurale apparaît spontanément et est favorisée lorsque des morphogènes particuliers sont inhibés (Ying *et al*, 2003; Gaspard *et al*, 2008).

- Les premiers protocoles d'induction neurale se sont basés sur la formation de structures tridimensionnelles appelés corps embryoïdes (EB) (Zhang *et al*, 2001). Ils débutent par la mise en suspension des cellules pluripotentes en absence de facteurs mitogéniques exogènes pendant une courte période. Favorisée lorsque les cellules sont à forte densité, cette étape conduit à la génération des corps embryoïdes. Ce sont des agrégats cellulaires ayant le potentiel de se différencier spontanément dans les différents lignages des trois feuillets embryonnaires. Les EB sont ensuite entretenus en condition adhérente dans un milieu supplémenté par des nutriments et facteurs, tels que le N2 et le bFGF. Cela induit la naissance de cellules neuroépithéliales qui se réorganisent en rosettes neurales (Zhang *et al*, 2001), une structure dont la morphologie et l'identité moléculaire rappelle le tube neural formé au cours de l'embryogenèse.
- Une autre méthode, couramment employée en laboratoire, consiste à cultiver les cellules en système monocouche. Une approche efficace repose sur l'inhibition simultanément de deux

voies de signalisation (Chambers *et al*, 2009): la voie de signalisation des BMP (par exposition des cellules avec la protéine Noggin) et celle des TGF- β (par exposition des cellules avec le composé SB431542). L'expression de ces deux facteurs, en conditions adhérentes et dans un milieu dépourvu de sérum, a pour effet de réduire l'expression de Oct4 et d'activer l'expression de Pax6 et permet ainsi l'obtention de culture composée d'environ 80% de cellules progénitrices neurales en seulement une semaine (Chambers *et al*, 2009). D'autres exemples d'induction spontanée existent et s'appuient sur le même principe : forcer les cellules à quitter leur statut pluripotent, en inhibant les voies de différenciation impliquées dans les lignées mésodermes et endodermes (Kim *et al*, 2010).

- On peut également citer les systèmes de co-culture avec une matrice de cellules nourricières stromales (Kawasaki *et al*, 2000; Perrier *et al*, 2004; Ideguchi *et al*, 2010). Les populations de cellules stromales sont composées de cellules souches multipotentes adultes. Il en existe plusieurs types dont PA6 et MS5. Les cellules stromales de type PA6 sécrètent des facteurs qui vont participer à l'induction neurale. Un ensemble d'études a permis de dresser une liste de facteurs candidats pouvant jouer ce rôle parmi lesquels on retrouve: Stromal cell-derived Factor 1 (SDF-1 (Vazin *et al*, 2009)), Pleiotrophin (PTN, (Vazin *et al*, 2009)), Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2, (Vazin *et al*, 2009)), Ephrin B1 (EFNB1, (Vazin *et al*, 2009)), Sonic Hedgehog (Shh, (Swistowska *et al*, 2010)) secreted Frizzled-Related protein 1 (sFRP1, (Schwartz *et al*, 2013)), et le facteur de croissance endothéliale F (VEGFD, (Schwartz *et al*, 2013)). L'ajout d'une combinaison de certains de ces facteurs dans le milieu de culture est suffisant pour induire une identité neurale (Vazin *et al*, 2009; Schwartz *et al*, 2013). Ce type d'approche favorise la différenciation en neurones dopaminergiques, mais plus de 3 semaines sont nécessaires (Perrier *et al*, 2004). Concernant les cellules stromales de type MS5, elles peuvent selon les conditions induire la production de neurones glutamatergiques ou dopaminergiques (Ideguchi *et al*, 2010; Lim *et al*, 2015).

Les étapes suivantes ont pour objectif d'affiner l'orientation neuronale vers la catégorie de neurones souhaitée. De nouveau, il s'agit de mimer les conditions existantes *in vivo*. Il est par exemple possible d'obtenir des identités cellulaires plus ou moins rostrales en jouant sur la concentration de morphogènes tels que l'acide rétinoïque, les protéines BMP ou le FGF (figure 18). Notamment, l'acide rétinoïque a une action caudalisante et présente donc de fortes concentrations en partie postérieure et de faibles concentrations en antérieur du tube neural. Si on traite des embryons avec des concentrations d'acide rétinoïque croissantes, cela induit une postériorisation de l'embryon (Durstun *et al*, 1989; Sive *et al*, 1990). Avec de très fortes doses, l'embryon ne développera pas de cerveau (Durstun *et al*, 1989; Sive *et al*, 1990).

Pendant l'embryogenèse, l'expression de ces facteurs est organisée en gradients au niveau du tube neural ce qui induit une régionalisation des structures (figure 18). Très rapidement au cours de la formation du tube neural, il apparaît différentes sous-régions appelées vésicules (figure 19). Au début, trois vésicules sont formées et correspondent au prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale. Plus tard au cours de l'embryogenèse, le processus se complexifie et certaines des vésicules précédemment formées se subdivisent. Le prosencéphale donne naissance au télencéphale et au diencéphale, alors que le rhombencéphale donne naissance au métencéphale et au myélocéphale. De la même façon, un gradient dorso/ventral se met en place au cours du développement du cerveau. Il fait intervenir les facteurs Wnt, BMP et Shh (figure 18).

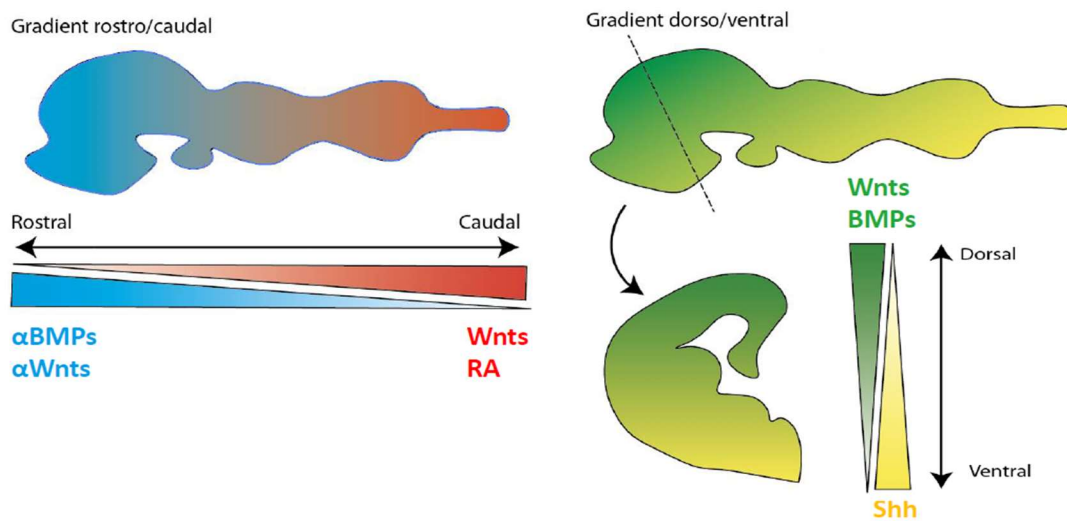


Figure 18 : Régionalisation du cerveau embryonnaire par les gradients de facteurs de croissance

La formation des différentes régions du cerveau repose sur l'existence de gradients de morphogènes se mettant en place sur les axes rostro/caudal et dorso/ventral pendant l'embryogenèse. Cela permet de générer différentes combinaisons de facteurs et ainsi de régionaliser le tube neural. Selon leur position sur ces différents axes, les cellules expriment donc des profils d'expression génique distincts qui vont participer à leur engagement dans une identité cellulaire particulière. Figure adaptée de Petros et al, 2011.

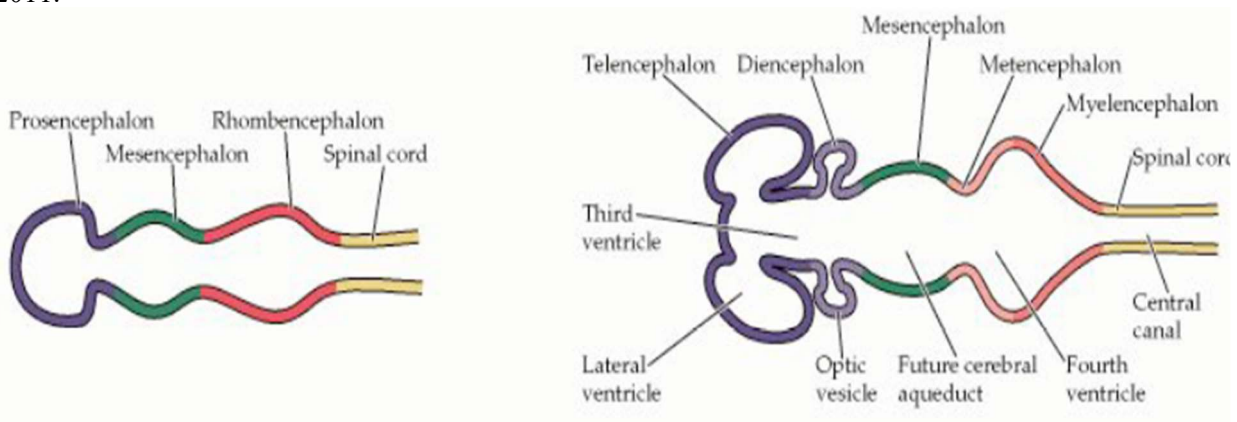


Figure 19 : Régionalisation du tube neural et illustration des différentes vésicules cérébrales

La régionalisation du tube neural se fait progressivement au cours de l'embryogenèse avec l'apparition de vésicules permettant de délimiter les futures structures cérébrales. Ainsi, le télencéphale est à l'origine du cortex, de l'hippocampe, de l'amygdale et du corp calleux. A partir du diencéphale se

forment l'hypothalamus, le thalamus et l'hypophyse. Le mésencéphale donne naissance aux tubercules quadrijumeaux et au pédoncule cérébrale tandis que le métencéphale donne naissance au cervelet. Enfin, le myélocéphale détermine le bulbe rachidien. Figure issue de : Neurosciences 3rd edition

Pendant la phase de différenciation les conditions sont donc affinées afin d'obtenir le type neuronal souhaité. Il est possible de dériver une grande variété de neurones comme des neurones excitateurs ou inhibiteurs ou encore des neurones appartenant à des régions cérébrales distinctes, telles que le cortex, le cervelet ou le striatum (Eiraku *et al*, 2008; Lin *et al*, 2015; Watson *et al*, 2018). De plus, au sein même de la catégorie des neurones corticaux, on peut également dériver les neurones vers des identités de couches superficielles ou de couches plus profondes (Boissart *et al*, 2013). C'est là encore, la combinaison de divers facteurs qui détermine le destin des cellules en différenciation (figure 20). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux neurones corticaux glutamatergiques. La partie suivante a ainsi pour objectif de présenter le cortex et son neurodéveloppement.

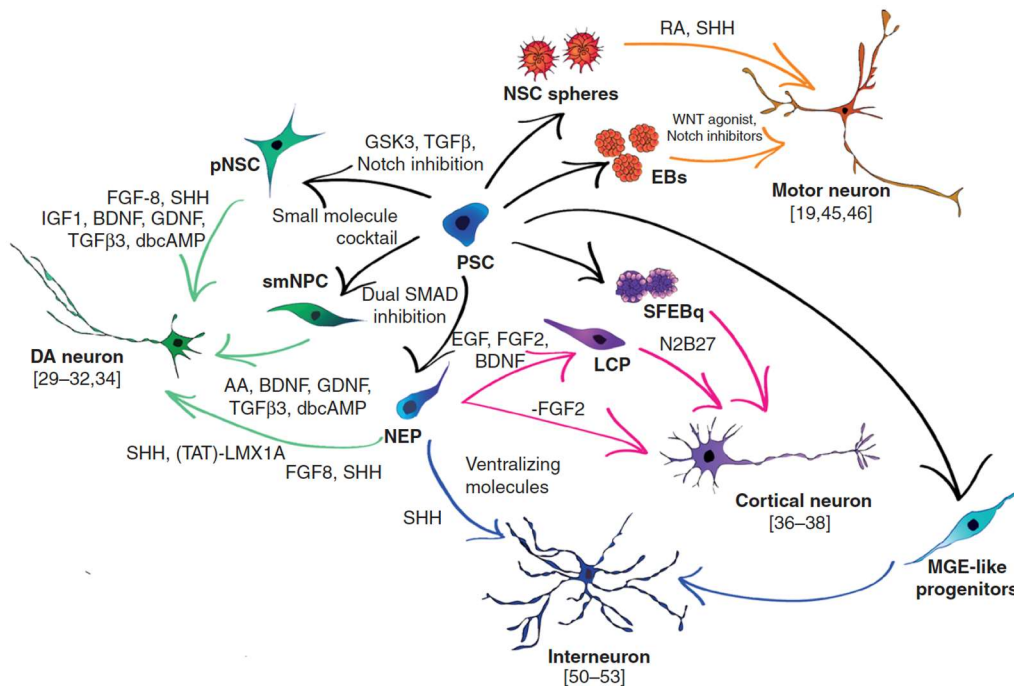


Figure 20 : Obtention expérimentale des différents sous-types neuronaux

Les cellules souches pluripotentes peuvent sous certaines conditions donner naissance aux différents sous-types neuronaux peuplant le cerveau : neurones dopaminergiques du striatum, neurones corticaux, interneurons, neurones moteurs. La figure illustre les divers protocoles établis pour orienter l'identité neuronale des cellules souches pluripotentes. Pour chacune des catégories représentées sur la figure, différentes trajectoires impliquant divers états intermédiaires sont possibles. Figure issue de Corti *et al* 2015

5- Développement cortical

a. Organisation du cortex

Le cortex est organisé en 6 couches horizontales superposées et subdivisé en 52 aires fonctionnelles différentes. Les couches corticales se distinguent par la densité et l'assortiment des

cellules qui les composent. Chez l'humain, le cortex présente un ensemble de repliements. Cela lui confère un aspect gyrencéphale. Les cellules de chaque couche cellulaire possèdent des identités biochimiques, électrophysiologiques et morphologiques spécifiques. De plus, ces cellules ne projettent pas au même endroit et ne reçoivent pas les connexions des mêmes régions selon la couche dans laquelle elles sont localisées.

On retrouve dans cet ordre (de la couche la plus superficielle à la plus profonde) :

- La couche de Cajal-Retzius cell ou couche moléculaire (couche I) : Il s'agit de la couche la plus superficielle. Elle est majoritairement constituée de cellules horizontales de Cajal. Les neurones qui constituent cette couche sont caractérisés par l'expression combinée de la Rééline, la Calrétinine, et de Tbr1 (Espuny-Camacho *et al*, 2013).
- Les couches superficielles subdivisées en trois couches :
 - La couche granulaire externe (couche II) : Cette couche est constituée de cellules étoilées et de petites cellules pyramidales. Elle reçoit des afférences cortico-corticales.
 - La couche pyramidale (couche III) : Dans cette couche, se trouvent des cellules pyramidales de taille moyenne, des interneurones ainsi que des connexions cortico-corticale efférentes.
 - La couche granulaire interne (couche IV) : Cette couche est très riche en cellules étoilées et abrite des afférences extérieures aux cortex.

Ces trois couches sont caractérisées par l'expression conjointe des marqueurs Stab2, Cux1, Cux2 et Brn2 (Espuny-Camacho *et al*, 2013).

- Les couches profondes répertorient deux couches :
 - La couche ganglionnaire ou pyramidale interne (couche V) : Cette couche est essentiellement constituée de neurones pyramidaux de grande taille et abrite des afférences extérieures au cortex, dont les afférences thalamiques
 - La couche polymorphe (couche VI) : Il s'agit de la couche la plus profonde. Elle abrite également des connexions efférentes extérieures au cortex.

Ces deux couches sont caractérisées par l'expression conjointe des marqueurs Tbr1, CTIP2, foxP2, Stab2 (Espuny-Camacho *et al*, 2013).

On retrouve une centaine de types différents de neurones caractérisés par leur morphologie, leurs fonctions, les facteurs qu'ils expriment mais aussi par leur localisation dans le cortex. La composition d'une même couche peut, de plus, varier en fonction des aires fonctionnelles (Astick & Vanderhaeghen, 2018). Néanmoins on retrouve globalement environ 80% de neurones glutamatergiques (Rubenstein, 2011). Ces neurones synthétisent du glutamate et sont excitateurs. Présents dans les 6 couches du cortex, ils arborent une morphologie pyramidale qui leur est spécifique. Ils se composent d'un corps cellulaire

de forme plus ou moins triangulaire, d'un axone de grande taille ainsi que de plusieurs dendrites basolatérales et d'une longue dendrite très branchée, localisée dans la partie apicale (Spruston, 2008). Le cortex est également composé d'environ 10 à 20% de neurones GABAergiques (Rubenstein, 2011). Essentiellement connu pour ses fonctions inhibitrices à l'âge adulte, il est important de noter qu'au début du développement embryonnaire ce neurotransmetteur est excitateur (Chen *et al*, 1996; Ben-Ari *et al*, 2012; Ben-Ari, 2014). Contrairement aux neurones glutamatergiques, ce sont des neurones qui ne projettent pas leurs axones en dehors du cortex. Différents types d'astrocytes sont également présents. Ces cellules ne sont pas excitables mais présentent une signalisation calcique qui est transmise d'une cellule à une autre par l'intermédiaire des jonctions communicantes (Scemes & Giaume, 2006).

b. Formation du cortex

Différentes phases se succèdent pour donner naissance au cortex et aux neurones qui le composent. La formation du cortex cérébral comporte ainsi trois étapes majeures débutant lors de l'embryogenèse : (1) la neurogenèse (génération des neurones) accompagnée de la gliogenèse (génération des cellules gliales), (2) l'odogenèse (la croissance et la navigation des axones) et (3) la synaptogenèse (la formation des contacts synaptiques entre les neurones). Ce processus commence par la formation du tube neural. La formation du cortex cérébral s'effectue, par la suite, au niveau du télencéphale situé en partie rostrale du tube neural. Les neurones excitateurs et inhibiteurs corticaux sont respectivement produits au niveau dorsal et ventral du tube neural. La suite de cette partie concerne la formation des neurones corticaux excitateurs. La deuxième étape correspond à une phase de prolifération oscillante des cellules neuroépithéliales se déroulant chez la souris au stade E9 (figure 21). Elle est suivie par la phase de neurogenèse au cours de laquelle, les cellules progénitrices vont donner naissance aux neurones et cellules gliales lors du stade E10 (figure 21). Enfin pendant le stade E12, il y a élargissement de la plaque corticale et migration des divers neurones formant les six différentes couches corticales.

i/ Phase de prolifération oscillante

Le cortex commence à se former à partir de la portion rostrale du tube neural. Les cellules le composant sont les cellules neuroépithéliales (cellules NE) ou cellules progénitrices (figure 21). Elles se divisent activement en suivant un schéma particulier d'oscillation verticale de leurs noyaux que les anglo-saxons appellent Interkinetic Nuclear Migration (Sauer, 1935; Sauer & Walker, 1959). Cela induit la formation d'un épithélium pseudo-stratifié correspondant à la zone ventriculaire. Les cellules NE qui le constituent sont à la fois attachées par un prolongement à la surface ventriculaire (pôle cellulaire apical), bordant la lumière du tube neural et par un autre prolongement à la surface externe, coté pie-mère (pôle cellulaire basal). Leurs noyaux migrent au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Sauer, 1935). En phase G1 du cycle cellulaire, le noyau des cellules NE se situe au pôle apical,

près du ventricule puis, pendant la phase S de synthèse d'ADN, le noyau remonte vers le pôle basal avant de redescendre en phase G2. Les cellules se divisent alors au niveau du ventricule. Toutes les cellules NE exécutent ce schéma pour chaque division. Elles se divisent de façon symétrique et donnent donc naissance à deux cellules NE identiques qui se divisent à leur tour. Ces cellules sont de plus caractérisées par l'expression de divers marqueurs moléculaires comme Sox2, Nestin et Notch.

ii/ Phase de neurogenèse

Après un certain nombre de divisions symétriques (au stade embryonnaire E14 chez la souris), les cellules NE divergent et se transforment en cellules de glie radiaire apicale (cellules aRGs). Ce sont des cellules similaires aux cellules NE mais qui expriment en plus des marqueurs de glie (figure 21). Toujours localisées dans la VZ, ces cellules mettent en place des divisions asymétriques (Miyata *et al*, 2004; Noctor *et al*, 2004). En se divisant, elles peuvent donner naissance à des neurones soit directement : une cellule de glie radiaire donne alors naissance à une cellule de glie radiaire et un neurone (Noctor *et al*, 2004); soit indirectement : en donnant d'abord naissance à un compartiment d'amplification composé de progéniteurs intermédiaires (IPC) qui donneront naissance, après un certain nombre de divisions, à des neurones (figure 21, Noctor *et al*, 2004).

Au stade embryonnaire E14, on a ainsi deux zones de prolifération : la zone ventriculaire (VZ) composée des cellules aRG et la zone sous-ventriculaire (SVZ) composée des cellules IPC (figure 21, Noctor *et al*, 2004). Ce compartiment d'amplification offre la possibilité de générer un plus grand nombre de neurones. Les divisions ne se font qu'au niveau de la VZ et de la SVZ, les neurones de la plaque corticale correspondant au futur cortex étant tous post-mitotiques.

Les SNP (Short neural precursors) représentent une autre classe de progéniteurs moins connus et positionnés au niveau de la VZ (figure 21, Custo Grei *et al*, 2013). De par leur localisation et leur morphologie, ces derniers pourraient correspondre à un état intermédiaire et transitoire entre les cellules aRG et les IPC (Custo Grei *et al*, 2013).

Une catégorie supplémentaire de progéniteurs a été découverte chez l'humain. Ces cellules sont des cellules de glie radiaire basales (bRG) (figure 21) et sont localisées dans une nouvelle région appelée zone sous-ventriculaire externe située au-dessus de la SVZ interne abritant les IPC (Lui *et al*, 2011). Les cellules bRG ont été repérées dans d'autres espèces caractérisées par un cortex gyrencéphale comme le furet (Lui *et al*, 2011). Ces dernières sont à l'origine de l'élargissement du cortex observé dans ces espèces de mammifères. Une autre cause de cet élargissement survenant plus précocement est l'allongement de la période de neurogenèse à mitoses symétriques (Suzuki & Vanderhaeghen, 2015). Les cellules bRG existent également chez certaines espèces lysencéphales mais ne représentent pas plus de 10% des cellules progénitrices (Wang *et al*, 2011c).

La phase de neurogenèse se déroule en 22 semaines chez l'homme alors qu'elle nécessite seulement 7 jours chez la souris (Lodato *et al*, 2015)

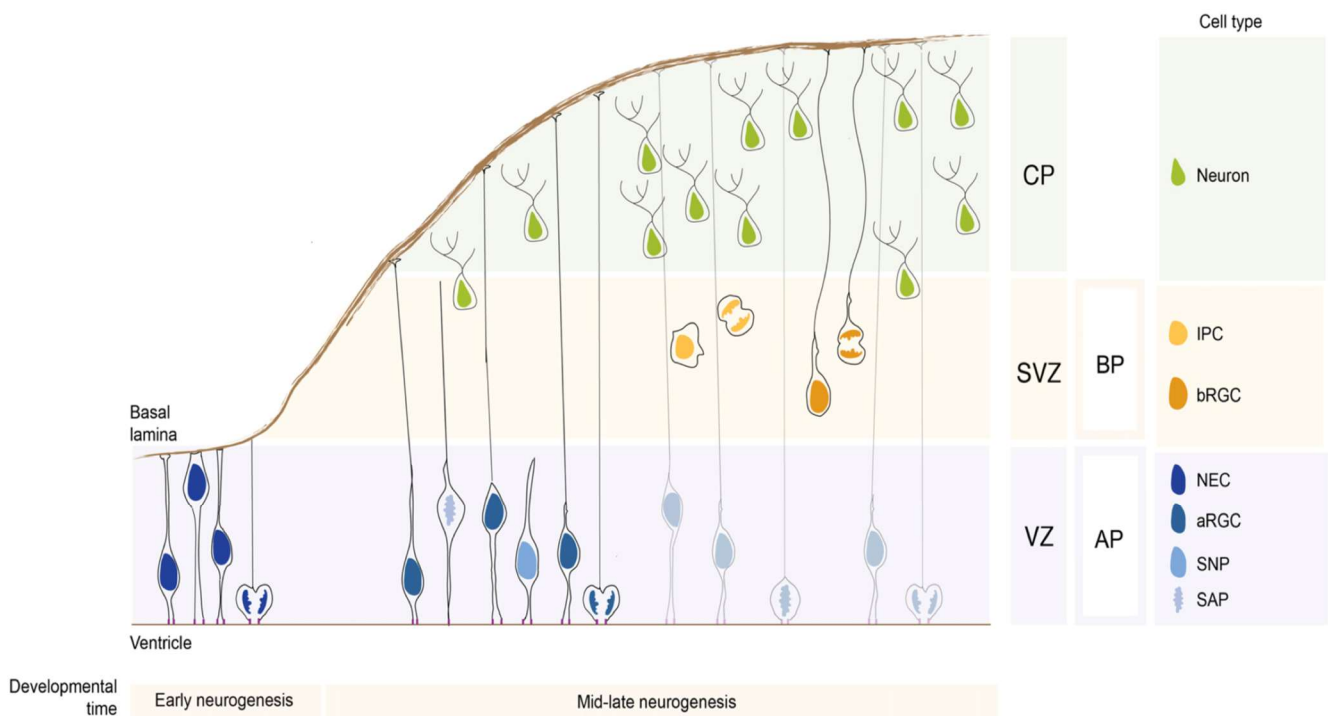


Figure 21 : Présentation des différentes étapes de la neurogenèse corticale

La corticogenèse se décompose en 3 étapes successives : la phase de prolifération oscillante, la phase de neurogenèse et la phase de migration. Elle fait intervenir un grand nombre de cellules intermédiaires localisées dans des compartiments spécifiques du tube neural. Les différents stades cellulaires et leur localisation sont représentés par un code couleur sur la figure. Figure issue de Arai & Taverna, 2017.

iii/ Phase de Migration

Deux formes de migration neuronale coexistent pendant la formation du cortex : la migration radiale et la migration tangentielle (Walsh & Cepko, 1993). Les neuroblastes nés au niveau des éminences ganglionnaires situées en partie ventrale du futur cerveau migrent de façon tangentielle et donneront naissance aux neurones GABAergiques inhibiteurs. A l'inverse, les neuroblastes nés au niveau de la VZ du télencéphale dorso-latéral migrent en suivant une direction radiale verticale et seront à l'origine des neurones glutamatergiques excitateurs.

Selon le stade embryonnaire, ces futurs neurones excitateurs adoptent différents modes de migration radiale. Les premiers neuroblastes formés se déplacent de façon autonome en rétractant leur prolongement basal resté attaché à la surface piale (Morest, 1970; Nadarajah *et al*, 2001). Le deuxième mode de migration s'effectue à l'aide des cellules aRGC dont le prolongement basal traverse la VZ ainsi que la SVZ pour atteindre la lame basale et la surface piale (Rakic, 1972; Nadarajah *et al*, 2001). Les neuroblastes en migration utilisent ce prolongement en s'y accrochant afin de rejoindre leur couche corticale avant d'achever leur différenciation neuronale (Rakic, 1972). A la fin de leur déplacement, le

prolongement des neuroblastes s'attache de nouveau à la surface piaie. Cela permet aux neurones d'ajuster leur position par des mécanismes impliquant un raccourcissement de leur prolongement, comme décrit précédemment (Nadarajah *et al*, 2001).

Des expériences de « birth dating », réalisées sur des femelles gestantes de souris et de macaques, ont permis d'étudier la génération des neurones des différentes couches corticales (Angevine & Sidman, 1961; Rakic, 1974). Pour dater la naissance de cellules et ainsi suivre l'apparition des neurones des différentes couches, un nucléotide radioactif, comme la thymidine tritiée ou le BrdU, est injecté à un moment précis de la gestation. Ces nucléotides sont incorporés par l'ADN en cours de synthèse au moment de la duplication. La glie radiaire en cours de division incorpore la thymidine tritiée ou le BrdU au niveau de son ADN, mais ce marquage nucléotidique est progressivement dilué lors des mitoses symétriques successives. Par opposition, certaines cellules post-mitotiques correspondant aux neuroblastes engagés dans leur destin neuronal et issus des mitoses asymétriques ne se divisent plus et gardent ce marquage. Ainsi selon le moment de l'injection, il est possible de déterminer le moment précis lors duquel un neurone est généré. Les animaux sont alors sacrifiés à la naissance ou à l'âge adulte pour identifier les couches marquées par la thymidine.

Par cette approche, il a été possible de montrer que les premiers neurones produits se retrouvent au niveau des couches profondes du cortex, tandis que les derniers neurones générés sont situés au niveau des couches superficielles (Angevine & Sidman, 1961; Rakic, 1974). Ce modèle a été appelé le modèle « inside-out ». Plusieurs observations microscopiques étudiant la migration neuronale sont en faveur de ce modèle (Berry & Rogers, 1965; Rakic, 1972). Il est à noter que les neurones de Cajal-Retzius constituent une exception à ce modèle. Ils sont en effet générés avant tous les autres neuroblastes et sont pourtant positionnés dans la couche 1, au-dessus des 5 autres couches corticales (Angevine & Sidman, 1961; Rakic, 1974).

6- Méthodes de différenciation corticale des cellules souches neurales

De multiples protocoles ont été développés dans le but de dériver des neurones corticaux excitateurs.

En utilisant un système de culture en 3D dans lequel les cellules ESC sont cultivées en suspension, le groupe de Sassai *et al* est parvenu à obtenir une large proportion de progéniteurs télencéphaliques pouvant être différenciés en neurones corticaux fonctionnels (Eiraku *et al*, 2008). Dans ces conditions, les ESC sont capables de se rassembler de façon autonome et rapide, afin de former des structures polarisées morphologiquement et moléculairement semblables au tube neural qui se met en place au cours de l'embryogenèse (Eiraku *et al*, 2008). En particulier, les marqueurs retrouvés au niveau basal du tube neural, comme la lamine, sont détectés à la surface des structures produites par l'agrégation des

ESC, et les marqueurs apicaux, comme la N-cadherine, ou l'aPKC, sont visualisés à leur centre. De plus, environ 80% de ces cellules expriment les marqueurs corticaux Emx1 et VGlut, et présentent une activité calcique (Eiraku *et al*, 2008). D'autres caractéristiques du développement cortical sont reproduites, au travers de ce protocole, comme l'expression successive de certains facteurs clés et la chronologie d'apparition des différentes couches de neurones corticaux. Néanmoins, lorsque ce protocole est adapté aux ESC humaines, cela ne permet pas d'obtenir des neurones corticaux des couches superficielles.

Un protocole publié la même année et adoptant une tout autre stratégie a reproduit certains de ces résultats. Dans cette étude, des cellules ESC d'origine murine sont cultivées à faibles densités en conditions adhérentes et placées dans un milieu ne contenant aucun morphogène susceptible d'agir extrinsèquement sur le destin cellulaire. Cette approche permet l'obtention de cellules progénitrices neurales qui se différencient dans un premier temps en neurones, puis en astrocytes comme cela se produit *in vivo* (Gaspard *et al*, 2008). Par contre, contrairement aux conditions précédentes, un grand nombre de cellules expriment des facteurs spécifiques d'une identité ventrale, en raison d'une expression endogène du morphogène ventralisant Shh. Cette population de cellules est perdue lorsqu'est ajouté la cyclopamine, un inhibiteur de Shh, dans le milieu de culture. Ce nouveau milieu favorise la différenciation en neurones pyramidaux glutamatergiques des différentes couches corticales (Gaspard *et al*, 2008), dont la génération respecte comme précédemment l'ordre d'apparition séquentielle des couches corticales observé *in vivo*.

Plusieurs équipes ont tenté d'adapter ce protocole aux cellules pluripotentes humaines mais cela s'est révélé peu efficace dans l'enrichissement des cultures en neurones glutamatergiques (Yahata *et al*, 2011; Nicoleau *et al*, 2013). Néanmoins, après avoir testé plusieurs concentrations de la cyclopamine ainsi que différentes périodes de traitement, il a été possible, dans une étude, de réduire les proportions de neurones GABAergiques à 12% (Cao *et al*, 2017). De plus, des neurones humains d'identité majoritairement corticale ont été produits sans l'application de ce composé, grâce à des conditions spécifiques où la voie des BMP est inactivée de façon prolongée (Espuny-Camacho *et al*, 2013).

Depuis, ces protocoles ont sans cesse été optimisés afin de se rapprocher davantage du neurodéveloppement cortical. C'est dans ce but que Shi *et al* ont élaboré une nouvelle approche pour obtenir une récapitulation encore plus fidèle du neurodéveloppement humain connu à ce jour. En particulier, il a été possible grâce à leur protocole d'observer le schéma de divisions oscillantes caractéristique des premières étapes de neurogenèse et de retrouver les différentes classes de progéniteurs neuronaux agissant au cours de la neurogenèse, à savoir les cellules progénitrices de la glie radiaire ainsi que les cellules progénitrices basales (Shi *et al*, 2012). Une autre amélioration de cette approche est l'obtention de neurones corticaux des couches superficielles. Ces observations sont le résultat d'une longue série d'étapes, dont l'initiation repose sur la double inhibition de la voie SMAD combinée à l'exposition des cellules à des composés rétinoïques (Shi *et al*, 2012). Sans les détailler, les autres caractéristiques du neurodéveloppement reproduites par les précédents protocoles ont été retrouvées avec cette nouvelle approche.

En parallèle, d'autres équipes ont essayé de mettre au point des protocoles permettant d'obtenir des catégories plus spécifiques de neurones. Les neurones corticaux des couches superficielles ont été impliqués dans les troubles neuropsychiatriques et c'est dans un but de modélisation de ces troubles qu'un protocole a été élaboré pour les différencier. En se basant sur le fait que ces neurones sont produits en dernier lors de la corticogenèse et résultent ainsi d'une phase de prolifération étendue par rapport aux neurones des autres couches, Boissart *et al* ont établi un protocole (Boissart *et al*, 2013) permettant de retarder la différenciation des cellules progénitrice neurale en les maintenant dans milieu favorisant leur prolifération. Ce milieu composé des facteurs de croissance suivants : FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) et BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), permet de pousser les cellules progénitricies à un stade de pré-différenciation plus avancé qu'avec les protocoles précédemment décrits. Les cellules obtenues par ce protocole sont homogènes rendant possible les études de type criblage de molécules à des fins thérapeutiques (Boissart *et al*, 2013; Darville *et al*, 2016). Ce sont les cellules progénitricies neurales produites par ce laboratoire qui ont été utilisées au cours de cette thèse.

D'autres groupes sont parvenus à accélérer ces protocoles en omettant les phases d'induction neurale et de régionalisation. Dans ce cas, les cellules pluripotentes sont directement converties en neurones et ce sont les facteurs de transcription impliqués dans les voies neuronales qui sont utilisés. Par exemple, l'induction de l'expression de la Neurogénine 2 dans des ESC ou dans des iPSC a pour effet le développement de neurones fonctionnels exprimant certains marqueurs télencéphalique caractéristique des couches II à III du cortex en moins de 3 semaines (Zhang *et al*, 2013b). Les cultures obtenues par cette méthode sont également homogènes mais ne sont pas totalement spécifique d'un type neuronal donné. En particulier, dans l'étude Zhang *et al*, quasiment tous les neurones expriment les facteurs VGlut-2 que l'on retrouve dans les neurones glutamatergiques excitateurs mais, une forte expression des récepteurs au GABA associés au neurones inhibiteurs est également présente dans les neurones reconvertis (Zhang *et al*, 2013b).

7- Applications

Les iPSC offrent un champ d'applications large. Cette approche est maintenant couramment utilisée pour modéliser les troubles neuropsychiatriques y compris les TSA et dispose d'un nombre significatif d'avantages (Beltrão-Braga & Muotri, 2017; Russo *et al*, 2019). En effet, les iPSC fournissent une source auto-renouvelable de cellules qui sont génétiquement identiques aux cellules du donneur (Nestor *et al*, 2016). Les iPSC permettent donc de générer un nombre important de neurones humains qui sont normalement non accessibles et d'étudier des phénotypes liés au neurodéveloppement comme la neurogenèse, la neuritogenèse, la spinogenèse ainsi que la synaptogenèse (Yang & Shcheglovitov, 2020). Ainsi, en différenciant les iPSC de patients dans le type cellulaire adéquat, il est maintenant possible de mettre en place des expériences sur du tissu vivant et d'étudier des maladies neurodéveloppementales. Les maladies neurodégénératives sont également très étudiées par ce modèle.

Cela a été rendu possible par la mise place de protocoles permettant d'accélérer le vieillissement cellulaire (Miller *et al*, 2013).

Le modèle des iPSC est particulièrement utile lorsqu'il s'agit d'étudier des mutations rares fortement pénétrantes comme c'est le cas des mutations observées dans le gène *SHANK3*. Ce modèle permet aussi l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques (Darville *et al*, 2016). Une autre application d'ordre thérapeutique est l'utilisation des iPSC dans le cadre de la médecine réparatrice employée pour traiter les maladies neurodégénératives (Singh *et al*, 2015).

a. Modélisation des TSA

De plus en plus d'équipes adoptent le modèle iPSC pour comprendre les altérations phénotypiques liées aux TSA dont celles associées aux mutations retrouvées dans le gène *SHANK3*. Les premières études ont principalement été réalisées sur des cellules de patients présentant le syndrome de Phelan McDermid et comportant donc des délétions sur d'autres gènes avoisinant *SHANK3*, pouvant également participer au développement des phénotypes.

En 2013, l'équipe de Dolmetsch s'est intéressée aux conséquences de délétions de la région 22q13.3 sur l'activité neuronale en utilisant des neurones dérivés d'iPSC de patients avec PMDS et autisme. Dans cette étude, les neurones des patients sont co-cultivés avec des neurones provenant d'individus contrôles et seuls les neurones matures sont analysés grâce à l'expression de protéines fluorescentes contrôlée par le promoteur CAMKII. Les neurones des patients PMDS présentent un déséquilibre de la balance E/I engendrée par une diminution des courants excitateurs, dont ceux médiés par les récepteurs AMPA et NMDA. Ces derniers sont d'ailleurs moins exprimés dans les neurones des patients, tandis que les récepteurs impliqués dans la transmission inhibitrice montrent une expression similaire à celle observée dans les neurones des individus contrôles. L'observation d'une réduction du nombre de synapses excitatrices va dans le même sens. Concernant *SHANK3*, son expression est également réduite (Shcheglovitov *et al*, 2013).

Dans l'étude de Yi, les analyses se sont portées sur des mutations conditionnelles de type perte de fonction à l'état hétérozygote et homozygote induites sur des ESC d'individus contrôles. L'aspect conditionnel de la mutation permet d'étudier son effet et de comparer les phénotypes homozygote et hétérozygote dans un contexte isogénique et évite les variabilités liées aux clones des ESC. Ces travaux ont mis en évidence une diminution de l'expression des protéines HCN interagissant directement avec *SHANK3*, entraînant une altération des courants I_h ainsi qu'une diminution des courants post-synaptiques excitateurs (Yi *et al*, 2016). A l'état homozygote, ces phénotypes sont plus fortement altérés et s'accompagnent, de plus, d'une diminution de la densité des épines dendritiques et de la complexité de l'arborisation dendritique.

Une autre étude intéressante est celle menée par Kathuria *et al*. Afin d'étudier l'impact de délétions hétérozygotes dans *SHANK3*, ils ont utilisé le model de neurones dérivés d'iPSC et ont dérivé leurs

cellules en neurones hypothalamiques. Dans leur modèle, l'expression de SHANK3 apparaît antérieure à la phase de synaptogenèse. Leur analyse souligne que SHANK3 est moins exprimé dans les neurones des patients porteurs de la délétion et ce dès le début de son expression. Ainsi, contrairement aux études précédentes, les analyses ont été effectuées à des stades du développement plus précoces. Morphologiquement, les neurones des patients sont caractérisés par une réduction de la taille de leur soma, ainsi que par une augmentation du nombre et de la taille des neurites. Le rôle de SHANK3 dans l'établissement de ces phénotypes a été démontré grâce à deux expériences complémentaires. D'une part, la surexpression de SHANK3 dans les neurones des patients a permis de rétablir les paramètres morphologiques. D'autre part, les anomalies obtenues précédemment ont été observées sur des neurones dérivés d'ESC contrôles modifiées pour ne porter soit qu'une soit aucune copie de *SHANK3* (Kathuria *et al*, 2018).

Plus récemment, le rôle de SHANK3 a été étudié dans un modèle de culture de neurones dérivés d'iPSC d'individus contrôles, composé de 11% de neurones glutamatergiques, de 17 % de neurones dopaminergiques ainsi que de 55% de neurones GABAergiques dans lequel a été induite une sous-expression de SHANK3. Le développement de ces neurones a été examiné via l'analyse de leur morphologie, de l'expression génique et de leur fonctionnalité. Il a ainsi été montré une diminution de la longueur totale des dendrites, de la taille des somas et des cônes de croissances pour les trois types neuronaux (Huang *et al*, 2019). Toutefois, ces altérations ne se déclenchent pas au même stade de développement selon le type neuronal observé. La réduction de la neuritogenèse est ainsi visible après seulement 9 jours de développement *in vitro* dans le cas des neurones GABAergiques et dopaminergiques alors qu'il faut attendre 14 jours pour voir apparaître ce phénotype sur les neurones glutamatergiques. Les neurones glutamatergiques arborent également un branchement dendritique significativement moins complexe lorsque SHANK3 est réduit. Les expériences d'électrophysiologie ont démontré des anomalies au niveau des courants excitateurs et inhibiteurs (Huang *et al*, 2019). De plus, les gènes touchés par la sous-expression de SHANK3 sont impliqués dans le développement neuronal et dans la neurogenèse (Huang *et al*, 2019). Ces travaux suggèrent que les mécanismes sous-jacents au développement neuronal se tenant place dans le cerveau de patients porteurs de mutations dans SHANK3 sont altérés au cours de stades précoces du neurodéveloppement.

Une étude plus approfondie du profil transcriptionnel a été réalisée sur des précurseurs neuronaux et des neurones dérivés à partir d'iPSC de 7 patients PMDS et de leurs frères et sœurs non atteints (Breen *et al*, 2019). L'analyse en composante principale a démontré que l'expression génique des précurseurs neuronaux et des neurones dérivés d'iPSC est similaire à celle observée sur des échantillons de cerveau post-mortem prénataux. Un autre résultat a permis de révéler une modification de la composition cellulaire chez les patients PMDS avec une légère augmentation des neurones excitateurs ainsi qu'une légère diminution des neurones inhibiteurs (Breen *et al*, 2019). De plus, un plus grand nombre de gènes sont différenciellement exprimés au niveau des progéniteurs neuronaux (392 gènes) entre patients et contrôles par rapport aux neurones. Les gènes différenciellement exprimés appartiennent à des voies

développementales précoces dont la voie Wnt et sont impliqués dans des processus tels que la neurogenèse et la spécification du destin cellulaire ce qui confirme certains résultats précédemment publiés (Breen *et al*, 2019).

L'implication des protéines SHANK3 dans la maturation de la jonction neuromusculaire a été analysée grâce à une approche translationnelle organisée autour de l'étude de 3 modèles différents : un modèle de souris délétée pour l'exon 11 de SHANK3, l'étude de biopsies de muscles de patients PMDS et le modèle iPSC via la production de motoneurones et de cellules myogéniques dérivés d'iPSC de patients PMDS (Lutz *et al*, 2020). Une baisse de la maturité a été relevée à la fois dans les cellules myogéniques et dans les motoneurones dérivés d'iPSC des patients. Cette étude a également montré que les protéines SHANK3 interagissent avec les protéines alpha-ACTININ un des composants des sarcomères qui assurent la contractibilité des muscles striés squelettiques. L'observation d'une désorganisation des sarcomères dans les trois modèles a permis de suggérer un rôle de SHANK3 dans le maintien de ces structures (Lutz *et al*, 2020). Cette étude a ainsi mis en évidence des nouvelles fonctions de SHANK3 et permet de mieux comprendre les causes des altérations de la motricité de certains patients avec TSA.

b. Test et criblage de molécules thérapeutiques

Le modèle des cellules iPSC a aussi été utilisé pour tester l'effet thérapeutique de molécules. Ces études peuvent adopter différentes stratégies.

Dans certains cas, la molécule à tester est choisie car elle agit dans des voies altérées en absence de SHANK3. Le rétablissement de ces voies pourrait ainsi réduire les phénotypes observés dans les cellules des individus déficients pour SHANK3. Des analyses protéomiques, réalisées sur des souris pour lesquelles l'expression de Shank3 est diminuée, ont ainsi permis de mettre en évidence une baisse d'activité de la voie mTORC1 (Bidinosti *et al*, 2016). Celle-ci est générée par des modifications de la phosphorylation de certaines protéines. Plusieurs molécules capables de réactiver cette voie ont été identifiées (Bidinosti *et al*, 2016). Testé sur des cellules de patients avec PMDS, le composé SC79 capable d'activer directement la voie et le composé TG009 activant la voie de façon indirecte ont ainsi tous deux induit un rétablissement des déficits électriques de ces cellules (Bidinosti *et al*, 2016).

Une autre méthode consiste à sélectionner des molécules susceptibles d'agir directement sur l'expression de SHANK3 pour la rétablir à des taux normaux. Ainsi, après avoir montré que les anomalies relevées sur des neurones dérivés d'iPSC de patients avec PMDS pouvaient être diminuées par la réintroduction de la forme longue de SHANK3, Shcheglovitov *et al* ont évalué les effets d'un traitement des cellules avec l'IGF1 (Insulin growth factor-1), un facteur de croissance augmentant

l'expression de SHANK3. Leurs analyses ont montré que les cellules traitées à l'IGF1 présentaient un rétablissement des phénotypes cellulaires (Shcheglovitov *et al*, 2013).

Les études de criblage permettent de tester l'effet d'un grand nombre de molécules en même temps. Lors d'une étude de criblage de plus de 200 composés, l'équipe du Dr A. Benchoua a identifié deux médicaments approuvés par la FDA – le lithium et le valproate - capables d'augmenter l'expression de SHANK3 dans des neurones dérivés d'iPSC et d'ESC (Darville *et al*, 2016). Appliqués sur les neurones dérivés d'iPSC de deux patients avec TSA porteurs de mutations tronquantes dans *SHANK3*, l'acide valproic et le lithium agissent sur deux des trois phénotypes altérés dans ces neurones : Ils réaugmentent le nombre de synapses positives pour SHANK3 ainsi que la fréquence et l'intensité des oscillations calciques spontanées (Darville *et al*, 2016). L'effet du lithium a aussi été testé dans l'étude de Lutz *et al* (Lutz *et al*, 2020). Le traitement des motoneurones et des cellules myogéniques, dérivés des iPSC des patients, au lithium, a permis d'augmenter l'expression de SHANK3 dans ces deux types cellulaires et de rétablir un niveau normal de maturation de la jonction neuro-musculaire (Lutz *et al*, 2020).

8- Limitations du modèle iPSC

a. Rendements faibles

La reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes par les facteurs de Yamanaka correspond à un long processus d'environ 2 semaines qui se solde par des rendements faibles (0,1-3%) et s'effectue de façon asynchrone (Takahashi & Yamanaka, 2006). Selon le modèle stochastique, le processus de reprogrammation comprend différentes étapes qui sont aléatoirement franchies par les cellules (Takahashi & Yamanaka, 2015). Afin d'optimiser ce processus, un certain nombre de protocoles alternatifs utilisant des facteurs additionnels ont été établis. Ceux-ci ont pour but de faciliter le passage de ces étapes.

Une étape particulièrement limitante est imposée par les barrières épigénétiques qu'il faut lever en cours de reprogrammation. Un grand nombre de méthodes a donc préférentiellement ciblé les protéines agissant sur le statut épigénétique des cellules. L'utilisation de shRNA dirigés contre SUV39H1 et DOT1L améliore significativement la reprogrammation. En particulier, l'inhibition de DOT1L facilite l'extinction des gènes somatiques via l'élimination des marques actives au niveau de leurs promoteurs. Cela permet également une augmentation de l'expression des gènes de pluripotence *Lin28* et *Nanog* qui participent aux étapes tardives de la reprogrammation (Onder *et al*, 2012). Une autre étude a montré un meilleur taux de reprogrammation lorsque Brg1, une protéine du complexe BAF, est sur-exprimée au côté des facteurs OSK. Brg1, en interagissant avec des méthylases d'ADN, permet une

meilleure fixation de Oct4 sur ses cibles résultant probablement d'une élévation de la déméthylation de ces sites de liaison (Singhal *et al*, 2010). Il est aussi possible d'agir sur certaines voies de signalisation impliquées dans le remodelage de la chromatine. Par exemple, il a été observé que l'ajout d'inhibiteurs de la voie des TGF beta améliore les résultats de reprogrammation (Maherali & Hochedlinger, 2009).

D'autres stratégies consistent à utiliser de nouvelles combinaisons de facteurs de transcriptions. Il est par exemple possible de remplacer c-Myc par le facteur de transcription Glis1 et d'obtenir de bons rendements dans ces conditions. Glis1 agit en augmentant directement l'expression des facteurs de la famille Myc et en augmentant de façon indirecte l'expression des facteurs Esrrb, Lin28a, Foxa2 et Nanog (Maekawa *et al*, 2011). Le facteur Oct4 peut également être remplacé par le facteur Nr5a2 pour améliorer les taux de reprogrammation obtenus (Heng *et al*, 2010). Modifier la stœchiométrie des facteurs OSKM peut également être bénéfique. Par exemple une forte dose de Oct4 associée à des doses faibles de Sox2 et Klf4 induit une meilleure reprogrammation des cellules (Tiemann *et al*, 2011). Un exemple supplémentaire d'approche améliorant l'efficacité de la reprogrammation correspond à la modification des facteurs OSKM dans le but d'augmenter leurs activités transcriptionnelles. De manière remarquable, l'expression des facteurs SK combinée à l'expression du facteur Oct4 fusionné avec un domaine de transactivation permet d'obtenir 78 fois plus de colonies exprimant Oc4 qu'avec les versions naturelles de OSK (Wang *et al*, 2011d).

Les facteurs de transcriptions peuvent également être introduits dans les cellules à reprogrammer sous forme d'ARN messagers (ARNm) de synthèse modifiés. Cette approche constitue un moyen alternatif et non intégratif efficace pour apporter les facteurs dans la cellule. Transfecté dans des conditions très précises, ce cocktail d'ARNm reprogramme ainsi plus de 90% des cellules. Ces conditions incluent un milieu spécifique optimisé pour la transfection, une faible densité de cellules et la co-transfection des microARN 367/302s, connus pour faciliter la reprogrammation. Cette approche est plus compliquée à mettre en œuvre car elle nécessite à la fois un design précis des ARN et une transfection à répéter toutes les 48h, mais elle permet, en plus d'obtenir de meilleurs rendements, d'éviter les risques de recombinaison entre l'ADN introduit dans la cellule et le génome. Par ailleurs, les cellules reprogrammées par cette approche semblent plus similaires aux ESC (Warren *et al*, 2010; Kogut *et al*, 2018).

Enfin, même si en théorie toutes les cellules sont reprogrammables, certaines le sont plus facilement que d'autres. De meilleurs taux de réussite sont en effet été obtenus pour certains types cellulaires (Eminli *et al*, 2009). Ces observations ont donné naissance au modèle élitiste selon lequel l'efficacité des étapes de reprogrammation serait inhérente à la cellule que l'on souhaite transformer. Plusieurs facteurs peuvent être mis en cause pour expliquer la variation de l'efficacité de la reprogrammation d'un type cellulaire à l'autre. Parmi ces facteurs, on peut citer l'état de différenciation

de la cellule (Eminli *et al*, 2009) ou encore la durée de son cycle cellulaire (Guo *et al*, 2014). Une autre option pour améliorer un processus de reprogrammation est donc de sélectionner un type cellulaire plus immature.

b. Élimination des marques épigénétiques

De plus, comme cela a été expliqué précédemment les marques épigénétiques sont profondément remaniées durant les étapes de reprogrammation, ce qui peut aboutir à l'élimination de certaines marques présentes dans la cellule de départ. Il n'est donc pas possible d'étudier via ce modèle les facteurs environnementaux qui ont pu agir sur l'épigénome et contribuer au développement de la maladie.

Pour éviter cela, il est possible d'opter pour une autre technique qui consiste à réaliser une conversion directe, c'est-à-dire sans passer par l'état de cellules souches pluripotentes (Chanda *et al*, 2013; Vierbuchen *et al*, 2010). On nomme cette technique la transdifférenciation. Dans ce cas, il s'agira de surexprimer des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes neuronaux, tels que la Neurogénine 2 ou Neuro-D1 (Pang *et al*, 2011; Liu *et al*, 2013a).

La figure 22 illustre différents cocktails de molécules utilisés pour la reprogrammation de fibroblastes humains et murins en neurones excitateurs, dopaminergiques ou encore moteurs. Ces protocoles aboutissent généralement à une faible quantité de neurones. Une autre stratégie repose sur la conversion directe de cellules somatiques en cellules souches neurales afin d'obtenir des cellules amplifiables (Kim *et al*, 2014)

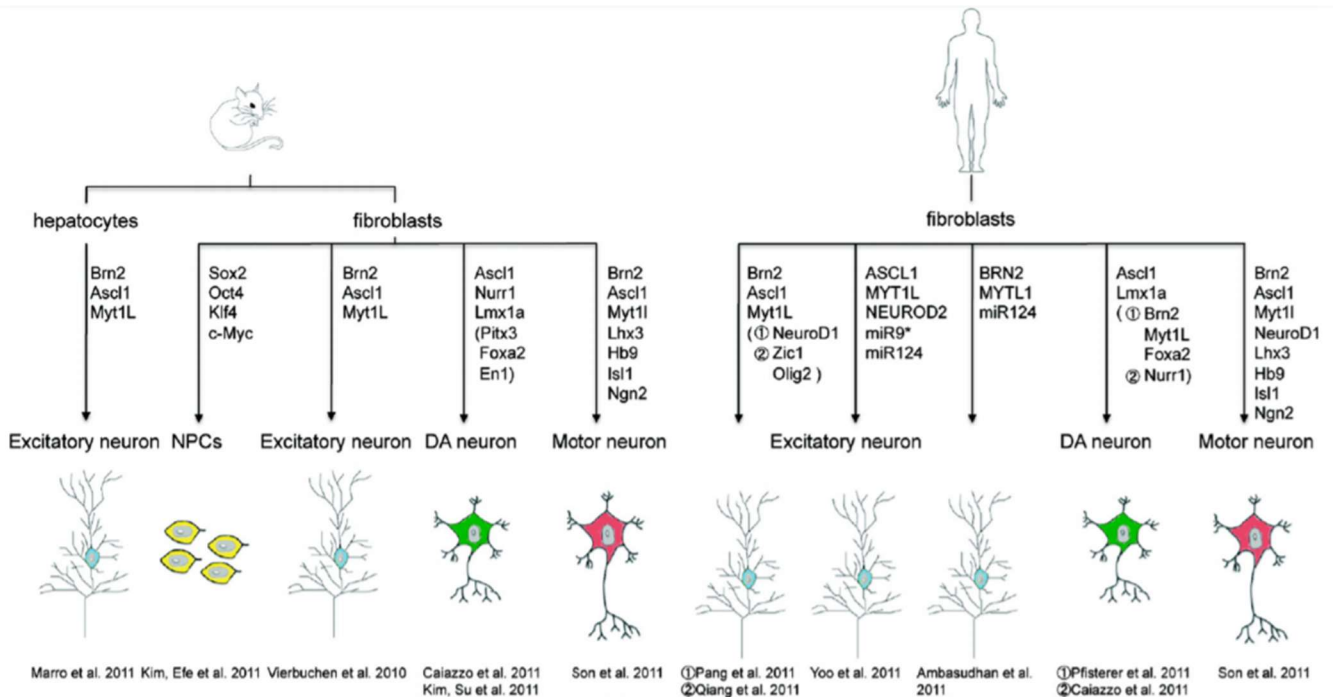


Figure 22 : Divers exemples de transdifférenciation neuronale à partir de fibroblastes humains et murins
Figure issue de Yang *et al*, 2011

c. Variabilités

Une autre limitation du modèle iPSC concerne la variabilité des phénotypes obtenus. En effet, un certain nombre d'étude a rapporté des cas de variabilité à différents niveaux. Il existe, par exemple, une variabilité intrinsèque aux cellules due au fond génétique et épigénétique de la cellule pouvant être à l'origine d'une hétérogénéité interindividuelle (Kilpinen *et al*, 2017; Volpato & Webber, 2020). Parfois la variabilité des données peut provenir des protocoles utilisés pour la reprogrammation et la dérivation des cellules. Ces derniers contiennent en général plusieurs étapes avec des événements aléatoires propices à l'apparition de variabilité (Volpato & Webber, 2020). Certains protocoles, comme celui décrit par Shi *et al*, sont en effet particulièrement longs et leur durée peut atteindre les 100 jours (Shi *et al*, 2012). De plus, l'étape de reprogrammation est propice à l'apparition de remaniements chromosomiques comme le témoignent les résultats d'une étude ayant mis en évidence 13% d'anomalies du caryotype (Taapken *et al*, 2011). Il a également été montré que les conditions de culture avaient un impact sur l'expression génique des cellules (Schwartzentruber *et al*, 2018).

Une équipe s'est focalisée sur ces aspects et a mis en place une étude visant à évaluer la reproductibilité de données obtenues par 5 laboratoires distincts utilisant deux lignées cellulaires identiques et les mêmes protocoles de dérivation (Volpato *et al*, 2018). Pour chacun des laboratoires, les analyses de RNAseq ont permis de différencier ces deux lignées d'un point de vue moléculaire. Par contre, les gènes différenciellement exprimés entre les deux lignées cellulaires divergent énormément en fonction des laboratoires, avec peu de résultats partagés, ce qui efface les différences dues au génotype, lorsque les données des 5 laboratoires sont combinées. De façon moins attendue, les variabilités observées n'augmentent pas avec le temps de culture (Volpato *et al*, 2018).

Cette limitation pourrait représenter un frein dans la recherche utilisant les iPSC si aucune précaution n'est prise car elle rend la comparaison de résultats entre différents groupes, difficile (Volpato *et al*, 2018). Une solution est d'inclure des lignées cellulaires provenant de plusieurs individus (de même sexe et d'âges et d'origine ethnique similaires) dans le but de diminuer les effets de la variabilité et de détecter des différences significatives entre différentes conditions (Germain & Testa, 2017). Cela est particulièrement nécessaire lorsque le but de l'étude est d'analyser l'impact de mutations dont l'effet est faible. Un autre moyen de limiter la variabilité est de sélectionner les types cellulaires souhaités par tri cellulaire (Bowles *et al*, 2019) ou d'utiliser des lignées isogéniques, en corrigeant la mutation étudiée grâce aux techniques de manipulation génétiques telles que CRISPR/cas9 (Volpato & Webber, 2020).

d. Carences du modèle

L'utilisation du modèle des iPSC pour l'analyse de troubles neurodéveloppementaux est en outre limitée par le manque d'un environnement tridimensionnel. Le développement de ces désordres résulte bien souvent d'événements complexes, faisant intervenir des anomalies de la connectivité des neurones

ou des défauts de migration de ces cellules qui ne peuvent pas être étudiés en deux dimensions (Korecka *et al*, 2016). L'analyse des circuits neuronaux n'est également pas possible dans ces conditions.

De plus, la majorité des protocoles vise à la dérivation de la catégorie neuronale la plus adéquate pour l'analyse de la maladie alors que le phénotype de ces cellules peut être influencé par les autres types cellulaires se développant *in vivo* à leurs côtés (Maury *et al*, 2012). On sait par exemple que les astrocytes jouent un rôle important dans la synaptogenèse (Pfrieger & Barres, 1997; Ullian *et al*, 2001) et les exclure des analyses pourrait alors apporter des biais dans l'étude et une mauvaise interprétation des résultats. Des protocoles de co-culture se sont ainsi développés pour améliorer la modélisation de certains troubles comme les TSA (Russo *et al*, 2018). Il a par ailleurs été constaté que les neurones dérivés d'iPSC maintenus en culture sont souvent immatures (Volpato & Webber, 2020), ce qui pourrait s'expliquer par l'absence de certains facteurs essentiels à leur maturation et par l'absence d'un environnement cellulaire complet. Il est par exemple encore difficile de reproduire *in vitro*, la vascularisation ainsi que la myélinisation retrouvées *in vivo* et participant à la maturation et la fonction des neurones (Nehme & Barrett, 2020).

De nouveaux systèmes sont apparus afin de s'affranchir des limitations liées à ces systèmes en deux dimensions. Les organoïdes permettent par exemple de reproduire *in vitro* des mini cerveaux et pourraient représenter un modèle alternatif où l'analyse de certains aspects cellulaires comme l'orientation des neurones dans l'espace serait rendue possible (Lancaster *et al*, 2013). Une autre approche consiste à transplanter les neurones dérivés d'iPSC dans un cerveau murin qui pourrait lui aussi représenter un environnement plus complet et physiologiquement plus représentatif du cerveau des patients en apportant une structure tridimensionnelle aux cellules en développement et en permettant l'analyse de phénotypes plus complexes que ceux étudiés sur les neurones en cultures (Korecka *et al*, 2016).

B) Transplantation cellulaire *in vivo*

1- Historique

Les premiers essais de transplantation neuronales datent des années 1890 (Thomson, 1890), mais il a fallu attendre plus de 15 ans pour que cette technique soit maîtrisée et que les cellules greffées soient capables de survivre *in vivo* (Ranson, 1909). Dans l'étude de Ranson, un ganglion cervical de rat est prélevé puis transplanté dans le cortex cérébral d'un second rat. Trois rats ont été ainsi greffés et l'un d'entre eux a survécu pendant deux mois. Malgré une réduction de la taille du ganglion greffé, les cellules restantes présentent une taille et une morphologie normales. D'autres résultats encourageants ont été obtenus par Dunn, qui a montré que des cellules corticales immatures de rat transplantées dans le cortex d'un second rat étaient capables de survivre plus de deux mois (Dunn, 1917). La croissance de ces

neurones greffés apparaît normale, et une myélinisation complète de certains de ces neurones a pu être observée (Dunn, 1917). Ces travaux mettent également en avant la nécessité d'une innervation sanguine autour de la greffe pour favoriser sa survie.

Une avancée majeure a eu lieu en 1970, lorsqu'une équipe a prouvé que les neurones issus de greffes de cellules neurales dans le cervelet de rats pouvaient s'intégrer dans les circuits neuronaux de l'animal hôte (Das & Altman, 1971). Durant la même décennie Björklund et Stenevi ont démontré qu'il était possible de rétablir certaines fonctions perdues lors de lésions du striatum, induites expérimentalement, grâce à la transplantation de substance noire embryonnaire. Leurs résultats ont établi pour la première fois qu'un transplant peut avoir une influence directe sur les fonctions motrices du cerveau de l'hôte (Björklund & Stenevi, 1979). D'autres expériences du même type, appliquées à divers modèles (démences, maladie d'Huntington, épilepsies), ont abouti à des conclusions similaires (Gage *et al*, 1984; Isacson *et al*, 1986; Barry *et al*, 1987). Ces découvertes ont conduit à de nouveaux espoirs concernant la recherche thérapeutique des maladies neurodégénératives et des lésions cérébrales. Les premiers essais cliniques utilisant cette technique (transplant cellulaire) pour traiter la maladie de Parkinson ont ainsi pu voir le jour en 1988 (Lindvall *et al*, 1988).

2- Transplantation et rejet de greffe

Lors de la transplantation de cellules entre deux individus différents, il peut y avoir le déclenchement d'une réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre le tissu étranger ainsi introduit. Cela est dû à la présence d'un type particulier de protéine, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), exprimé à la surface de chaque cellule. Ces protéines sont spécifiques à chaque organisme vivant et peuvent être reconnues par les lymphocytes T, capables de déterminer si elles appartiennent à l'hôte et de déclencher des réponses immunitaires dans le cas contraire afin de le détruire.

Le succès d'une greffe entre deux individus différents dépend principalement de leur concordance génétique. Ainsi, les greffes pour lesquelles le donneur et le receveur appartiennent à des espèces différentes, ou xéno greffes, sont associées à un risque élevé de rejet de greffe. (Figure 23).

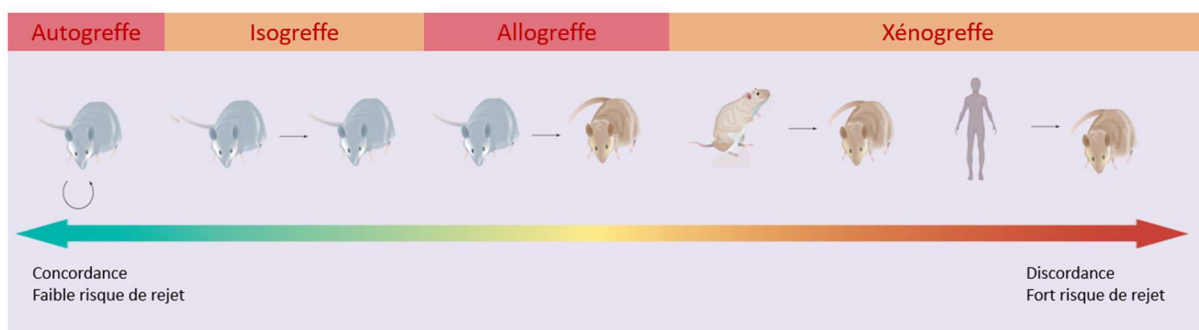


Figure 23 : Variation du risque de rejet de greffe en fonction de la concordance génétique entre donneur et receveur.

Cette figure illustre différents schémas de transplantation dans un hôte murin et le risque de rejet de greffe qui leur est associé. Lorsque les cellules transplantées proviennent de l'hôte dans lequel elles sont greffées, il s'agit d'autogreffe. Les cas d'isogreffe concernent des greffes entre des individus d'une même lignée. On parle d'allogreffe quand les cellules transplantées dans une souris sont issues d'une souris d'une autre lignée. Les xénotransplantations sont des greffes entre des espèces différentes. Le risque de rejet de greffe varie en fonction de la concordance génétique entre le donneur et le receveur et est donc forte dans le cas des xénotransplantations Figure adaptée de Anderson *et al*, 2012

Initialement, il était suggéré que le cerveau était protégé face au système immunitaire car différentes expériences de greffes étaient efficaces lorsque localisées dans le cerveau et infructueuses lorsque situées dans des organes périphériques (Head & Griffin, 1985; Widner *et al*, 1989). Plusieurs observations ont appuyé cette théorie comme l'absence dans le cerveau de cellules présentatrices d'antigènes ou encore l'absence de système lymphatique assurant la circulation des cellules du système immunitaire vers les ganglions (Head & Griffin, 1985). La barrière hématoencéphalique (BHE) a également été mise en lien avec cette théorie. La BHE a pour rôle de protéger le cerveau du reste de l'organisme en le séparant partiellement de la circulation sanguine. Elle empêche ainsi le passage de certaines molécules, dont celles impliquées dans le système immunitaire. Il a donc été proposé par certains scientifiques de l'époque, que celle-ci pourrait aussi contribuer au statut particulier attribué au cerveau (Anderson *et al*, 2012).

Pourtant, plusieurs expériences de transplantation dans le cerveau ont abouti à un rejet du greffon démontrant que le cerveau n'est pas complètement invulnérable face au système immunitaire (Janowski *et al*, 2014). Ces observations ont permis de reconsidérer les hypothèses sous-jacentes à la théorie selon laquelle le cerveau correspond à un site privilégié d'un point de vue immunologique. Par exemple, il a été montré que la BHE n'est pas imperméable à toutes les cellules du système immunitaire. Lorsque les lymphocyte T sont activés, ces derniers ont, en effet, la capacité de la traverser (Naparstek *et al*, 1984; Engelhardt, 2010). De plus, celle-ci peut être rompue lors de l'introduction de la greffe dans l'hôte, fournissant un accès aux cellules du système immunitaire qui parviennent ainsi à pénétrer dans le cerveau. L'hypothèse selon laquelle le cerveau serait dépourvu de système lymphatique a également été démentie par les travaux de Louveau *et al* et d'Aspelund *et al* (Louveau *et al*, 2015; Aspelund *et al*, 2015). Le troisième argument lié à cette théorie est aussi hors de propos car il est connu depuis longtemps que les cellules de la glie exprimées dans le cerveau possèdent des propriétés similaires aux cellules immunitaires, comme l'expression du CMH et la production de cytokines (Hayes *et al*, 1987; Meeuwsen *et al*, 2003; Choi *et al*, 2014).

D'autres facteurs influencent la réussite d'une greffe comme l'âge du sujet recevant la greffe ou bien l'âge du tissu greffé (Brundin *et al*, 1988; Kallur *et al*, 2006; Denham *et al*, 2012). En effet, plus un sujet est jeune au moment de la greffe, plus son système est immature et moins il y aura de risques que

le greffon soit rejeté. Cela a été démontré à plusieurs reprises chez le rat (Kallur *et al*, 2006; Denham *et al*, 2012). Chez la souris le succès de greffe au stade néonatal n'est au contraire pas reproduit (Mattis *et al*, 2014). Le site d'injection semble également jouer sur l'efficacité d'une greffe car certaines régions semblent plus permissives que d'autres sur le maintien d'un corps étranger sur le long terme (Janowski *et al*, 2014).

Deux stratégies sont couramment utilisées pour limiter les rejets de greffes. L'une d'entre elles consiste à administrer un traitement immunosuppresseur au sujet qui va recevoir la greffe ce qui a pour fonction d'affaiblir les réponses immunitaires. La deuxième consiste à utiliser des souris pour lesquelles les différents acteurs participant aux rejets de greffes sont absents ou déficients. Une lignée créée dans ce but est la lignée NOD-SCID^{PRKD}. La mutation dans le gène PRKD a pour conséquence l'absence de lymphocytes B et T, mais n'est pas suffisante pour maintenir une greffe sur le long terme en raison de la présence des cellules Natural Killer (NK) qui agissent activement lors des réactions déclenchées par une réponse immunitaire (Bosma *et al*, 1983; Dorshkind *et al*, 1985). Afin d'améliorer les temps de survie d'une greffe, cette mutation a été introduite dans la lignée NOD, qui est caractérisée par une absence de compléments circulant dans le sang, une immaturité des macrophages (Serreze *et al*, 1993; Pearson *et al*, 2003) et par une baisse de l'activité des cellules NK (Kataoka *et al*, 1983). Les souris NOD-SCID^{PRKD} représentent donc un excellent modèle pour les transplantations de cellules nécessitant d'être maintenues sur des longues périodes, comme c'est le cas lorsque l'objectif de la transplantation est l'étude du neurodéveloppement ou la modélisation de troubles neuropsychiatriques.

3- Apport du modèle de transplantation sur le neurodéveloppement

Bien que ce modèle soit surtout utilisé pour développer et tester des approches thérapeutiques visant à remplacer des cellules perdues à cause de lésions cérébrales ou de maladies neurodégénératives, plusieurs équipes l'ont également employé afin d'étudier le neurodéveloppement humain.

Au cours de l'évolution, les cerveaux humain et murin ont divergé et diffèrent aujourd'hui sur certains aspects (figure 24). Ils se distinguent notamment d'un point de vue anatomique, mais aussi par les types cellulaires exprimées et les cinétiques de leur développement. Ces différences pourraient empêcher, modifier ou ralentir la croissance de neurones humains évoluant dans un environnement murin.

Malgré ces divergences, de nombreuses études ont montré que des cellules humaines greffées dans le cerveau de souris étaient capables de survivre et de se développer dans un environnement étranger (Espuny-Camacho *et al*, 2013) et ce quel que soit le stade de différenciation des cellules greffées. Des expériences, au cours desquelles des cellules ESC humaines ont été greffées dans un cerveau de souris, ont montré une intégration des neurones au niveau de l'hippocampe, du cortex, du thalamus, du striatum,

du corps calleux et du cervelet (Muotri *et al*, 2005). Une large distribution au sein du cerveau est aussi obtenue lorsque les cellules sont greffées au stade de progéniteurs neuronaux (Chen *et al*, 2016).

Les neurones humains sont également capables de se développer dans d'autres espèces comme la gerbille et le singe (Ourednik *et al*, 2001; Hallett *et al*, 2015) ou encore dans des espèces phylogénétiquement plus éloignées comme la poule (Goldstein *et al*, 2002). Un autre point intéressant est que différentes catégories cellulaires résidant dans le cerveau humain peuvent se différencier dans le cerveau murin : neurones glutamatergiques pyramidaux (Espuny-Camacho *et al*, 2013; D'Alessio *et al*, 2020), neurones inhibiteurs (Nicholas *et al*, 2013; Upadhyya *et al*, 2019) et cellules gliales (Xu *et al*, 2019b). De plus, les cellules greffées sont capables d'établir des connections avec les cellules de l'hôte (Chen *et al*, 2016a; Linaro *et al*, 2019).

Ces études ont permis de démontrer que, lorsque des neurones humains dérivés à partir d'iPSC sont greffés chez des souris à la naissance, ces cellules sont capables de reproduire de façon similaire le développement correspondant à leur engagement et de se différencier en neurones matures et fonctionnels (Espuny-Camacho *et al*, 2013). Cela a été montré par des analyses de la cinétique d'expression de certains marqueurs neuronaux corticaux tels que TBR1, FOXP2 et CTIP2 exprimés dans les couches profondes du cortex et détectables après 1 mois de greffe ainsi que STAB2 exprimé dans les couches superficielles détectable après 2 mois de greffe (Espuny-Camacho *et al*, 2013). Ces résultats indiquent qu'après greffe, la génération des cellules neuronales engagées dans la voie de différenciation corticale respecte le motif d'apparition séquentielle des neurones appartenant aux différentes couches du cortex, comme cela avait déjà été observé *in vitro* (Espuny-Camacho *et al*, 2013). La fonctionnalité des neurones greffés a été évaluée par des analyses de patch-clamp et par imagerie de l'activité calcique (Espuny-Camacho *et al*, 2013; Real *et al*, 2018). Les cellules transplantées au stade de progéniteurs neuronaux peuvent également donner naissance à certains types d'interneurones comme ceux exprimant la somatostatine ou encore à des cellules gliales telles que les astrocytes et les oligodendrocytes (D'Alessio *et al*, 2020).

L'observation de l'organisation cellulaire à des stades précoces suite à des injections de progéniteurs neuronaux dans le cerveau de souris adultes met en évidence la présence de cellules exprimant la Nestine (un marqueur de la glie radiaire) et développant de longs prolongements parallèles. Ces données illustrent ainsi que l'architecture adoptée par les cellules lors de la neurogenèse corticale est également reproduite *in vivo* par les cellules greffées (Real *et al*, 2018). Un autre constat intéressant est la séparation, dans des territoires distincts de la greffe, des neurones ayant une identité de couches corticales profondes et des neurones ayant une identité de couches corticales superficielles (Real *et al*, 2018).

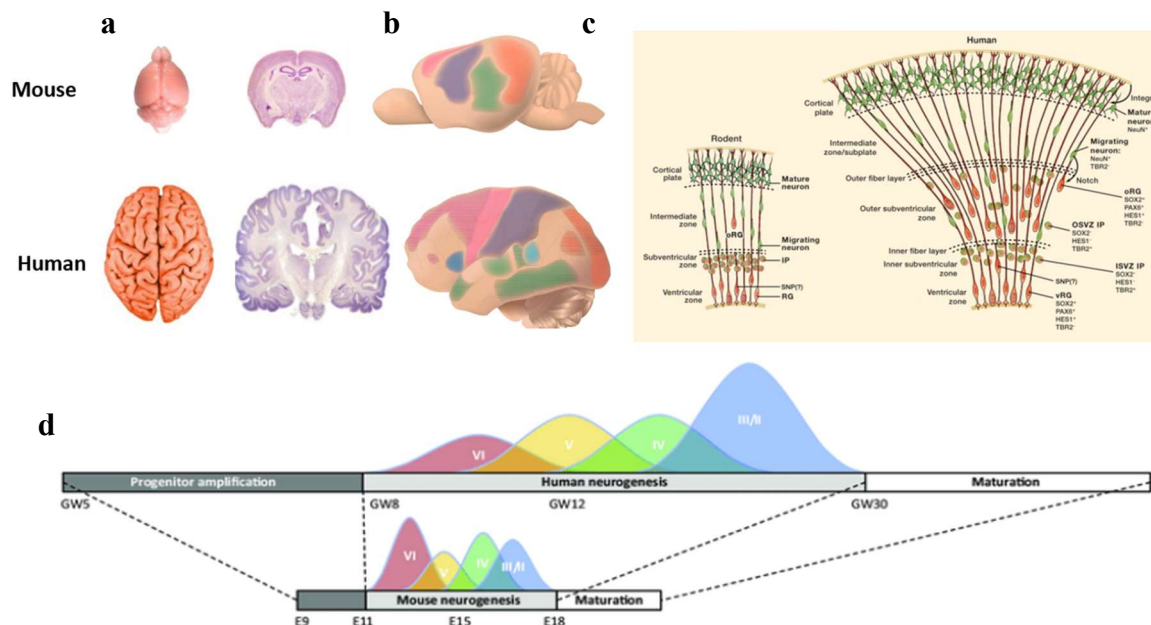


Figure 24 : Différences anatomiques et développementales entre les cerveaux humain et murin

Cette figure illustre plusieurs exemples de divergences entre les cerveaux humains et murins. Ces derniers se distinguent notamment d'un point de vue anatomique. Alors que le cerveau humain est gyrencéphale, celui de la souris ne comporte aucun repliement et l'épaisseur du cortex y est également plus faible (a). De plus, le répertoire de cellules corticales exprimées par la souris est moins diversifié que chez l'humain et le nombre ainsi que la proportion relative des aires fonctionnelles n'est pas identique entre ces deux espèces (b). Il existe aussi des différences pendant la corticogenèse (c). Il en résulte une cinétique du neurodéveloppement comprenant la neurogenèse et la maturation neuronale globalement plus longue chez l'homme (d). Figure composée d'images issues de (a) (b) Lui *et al*, 2011, (c) Snyder *et al*, 2018 (d) Van den Ameele *et al*, 2014.

De plus, le développement et la maturation des neurones greffés s'effectue en conservant les caractéristiques temporelles de l'espèce dont sont issus les neurones greffés (Espuny-Camacho *et al*, 2013; Linaro *et al*, 2019). La maturation des neurones humains s'effectue ainsi sur plusieurs mois en respectant la chronologies des différents stades développementaux humains malgré leur évolution dans un environnement murin plus mature (Linaro *et al*, 2019). Lorsque les cellules sont greffées dans le cerveau de souris adultes, les premières synapses sont visibles après 20 jours de développement et leur nombre augmente graduellement (Real *et al*, 2018). Parallèlement, il y a une maturation fonctionnelle qui se met en place. L'activité calcique des cellules, se caractérise par une activité spontanée qui apparaît dès 2 semaines et qui se maintient jusqu'à 3 mois (Real *et al*, 2018). L'activité spontanée enregistrée dans les neurones greffés est suivie par une hyperpolarisation membranaire et une augmentation du taux des PA (Linaro *et al*, 2019). Toutes ces étapes s'accompagnent d'une modification de la morphologie des neurones qui se complexifie progressivement et se coordonne aux évènements décrits précédemment (Linaro *et al*, 2019; D'Alessio *et al*, 2020). Après 11 mois de développement *in vivo*, les neurones humains sont matures et présentent des propriétés similaires au neurones corticaux humains adultes (Linaro *et al*, 2019). Certaines caractéristiques morphologiques spécifiques aux neurones humains sont

également retrouvés sur les neurones transplantés, comme la taille des épines, la longueur de leur cou ou leur densité (Linaro *et al*, 2019)

L'identité des neurones greffés s'exprime au-delà des caractéristiques moléculaires, morphologiques et fonctionnelles précédemment décrites. Lorsqu'ils sont greffés, les neurones ont en effet la capacité d'envoyer leur projections axonales et dendritiques en respectant leurs couches et aires d'origine (Espuny-Camacho *et al*, 2013). Ainsi les neurones exprimant les marqueurs de la couche 5 projettent principalement dans le mésencéphale et les neurones projetant dans le thalamus expriment en majorité les marqueurs de la couche 6. De plus, lorsque les neurones greffés sont orientés vers une identité du cortex visuel, ceux-ci vont principalement contacter des régions impliquées dans le traitement des signaux visuels (Espuny-Camacho *et al*, 2013, 2018). Pour cela, il est nécessaire que le site d'injection des cellules corresponde à l'identité des cellules greffées. En effet, si des neurones caractérisés par des marqueurs des aires visuelles sont greffés dans le cortex moteur, ces derniers envoient moins de projections (Espuny-Camacho *et al*, 2018). Ces résultats ont précédemment été obtenus dans le cadre de greffes de cellules murines dans le cerveau de souris (Gaspard *et al*, 2008; Michelsen *et al*, 2015). Ils montrent, en outre, que la spécificité des projections axonales humaines peut s'établir en dépit des différences existant entre le cerveau humain et le cerveau murin.

Une partie des neurones greffés est aussi capable de s'intégrer dans les circuits corticaux formés par les neurones murins et de répondre aux stimuli sensoriels envoyés (Real *et al*, 2018; Linaro *et al*, 2019). Les neurones humains sont, en outre, capables de distinguer des stimuli de natures différentes et d'adapter leur réponse de la même façon que les neurones murins (Linaro *et al*, 2019).

4- Modélisation de troubles du neurodéveloppement et approche thérapeutique

Les récentes avancées dans la modélisation du neurodéveloppement de neurones humains dans un contexte *in vivo* ont offert la possibilité de modéliser les troubles du neurodéveloppement comme le syndrome de Down. Pour le moment, très peu d'études de modélisation de troubles du neurodéveloppement utilisant cette approche ont été publiées.

Dans l'étude de Real *et al*, une population de cellules dérivées d'iPSC de deux individus contrôles ainsi que de deux patients atteints du syndrome de Down, et composée de 50% de progéniteurs neuronaux ainsi que de 50% de neurones corticaux excitateurs des couches corticales profondes, a été transplantée dans le cortex somatosensoriel de souris adultes pour étudier des étapes précoces du neurodéveloppement (Real *et al*, 2018). Cette étude inclut un contrôle isogénique obtenu par la perte spontanée du chromosome 21 excédentaire, dans un clone d'un des deux patients, lors du processus de reprogrammation. Leurs travaux ont permis de révéler une augmentation de la production de cellules astrogliales humaines dans le cerveau des souris transplantées avec les cellules des patients par rapport

aux cerveaux de souris transplantées avec les cellules des individus contrôles (Real *et al*, 2018). Les taux de neurones, de progéniteurs et de cellules en prolifération restent, au contraire, similaires entre les deux génotypes. L'analyse de la dynamique des épines dendritiques a montré un accroissement de la stabilité des épines résultant en une densité plus élevée d'épines. Ceci pourrait être le résultat d'une activité calcique plus réduite (Real *et al*, 2018).

D'autres études ont été entreprises afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette approche pour le traitement des troubles neurodéveloppementaux. Certaines formes de TSA sont caractérisées par une perte de certains types d'interneurones dont ceux exprimant la Parvalbumine. Dans une étude testant l'effet thérapeutique d'une transplantation neuronale sur les TSA, il a été montré que la transplantation d'interneurones de type Parvalbumine, dans un modèle murin récapitulant diverses caractéristiques des TSA, permet la restauration de plusieurs déficits relevés dans ce modèle. En particulier, une diminution du nombre de PA a été observée après transplantation (Donegan *et al*, 2018). Au niveau comportemental, les déficits des interactions sociales ainsi que certaines aptitudes cognitives telles que l'attention ont également été réduits par la transplantation d'interneurones exprimant la Parvalbumine (Donegan *et al*, 2018). Des données similaires ont précédemment été obtenues dans un modèle murin de schizophrénie, un autre trouble neurodéveloppemental marqué par une baisse d'interneurones (Donegan *et al*, 2017). De ce fait, la transplantation d'interneurones apparaît comme une approche prometteuse pour le traitement des formes autistiques caractérisée par une élévation de la balance E/I. Toutefois, la reproduction de ces résultats par la transplantation de neurones humains est nécessaire pour confirmer le potentiel cette approche.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les TSA sont des troubles affectant le neurodéveloppement et touchant environ 1 individu sur 100. Des études génétiques réalisées au laboratoire et par diverses équipes internationales démontrent que l'architecture génétique des TSA s'avère très complexe. Malgré de récentes avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires des TSA, les traitements actuels concernent essentiellement des approches comportementales et éducatives et à ce jour, aucun médicament ne permet de traiter efficacement les symptômes majeurs des TSA. L'importante hétérogénéité clinique et génétique des TSA contribue à cette difficulté. Toutefois, certaines mutations ont un impact très fort sur le développement des TSA. C'est le cas de celles observées dans les gènes *SHANK*, considérés comme étant des gènes majeurs pour les TSA, et de *SHANK3* en particulier. Comprendre les dysfonctionnements neuronaux liés aux mutations *SHANK3* devrait permettre le développement de nouvelles pistes thérapeutiques. Le gène *SHANK3* code une protéine, exprimée dans le cerveau au niveau de la densité post-synaptique des neurones glutamatergiques excitateurs et jouant un rôle majeur dans la formation des synapses et la maturation des épines dendritiques.

Les premières études visant à comprendre le rôle de *SHANK3* dans le développement des TSA ont principalement fait appel aux modèles murins, en raison de l'inaccessibilité de tissus neuronaux d'origine humaine. Néanmoins, ces modèles restent limités car certaines données sont difficilement extrapolables à la situation humaine. La découverte de protocoles de reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes a révolutionné le monde de la recherche et a permis de voir apparaître un nouveau modèle plus pertinent pour la modélisation des troubles neuropsychiatriques. Ce modèle permet, en effet, de générer de larges quantités de neurones humains et offre la possibilité de réaliser des analyses dans le contexte génétique du patient.

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé ce modèle dans deux projets. Le premier a été initié avant mon arrivée au laboratoire et a porté sur l'analyse *in vitro* de l'effet de mutations *de novo* hétérozygotes au sein de *SHANK3*, identifiées chez des individus atteints de troubles autistiques sévères. Pour ce faire, le laboratoire a sélectionné 4 patients indépendants, portant dans leur génome des mutations *de novo* hétérozygotes tronquantes dans *SHANK3*. Les fibroblastes de ces patients ont été reprogrammés en iPSC puis redérivés en neurones glutamatergiques excitateurs, par nos collaborateurs du laboratoire d'I-Stem et ces derniers ont été caractérisés par Laura Gouder, étudiante en thèse dans notre laboratoire. J'ai alors pu bénéficier d'un modèle déjà mis en place au laboratoire, ainsi que d'outils d'analyses précédemment développés, et un des objectifs de mon projet a résidé dans l'étude *in vitro* du rôle de *SHANK3* dans la spinogénèse grâce à un examen détaillé de différents paramètres relatifs à la densité et à la morphologie des épines dendritiques.

Mon deuxième projet a consisté à analyser *in vivo* l'impact de mutations dans *SHANK3* sur le développement neuronal. Le premier objectif de celui-ci était la mise en place d'un modèle d'étude *in vivo* par transplantation de progéniteurs neuronaux d'un individu contrôle dans le cerveau de souris immunodéficientes. Le second objectif de ce projet fut l'application de ce modèle aux mutations étudiées auparavant dans la partie *in vitro*.

RÉSULTATS

Résumé graphique des différents axes des deux projets et présentation des méthodologies employées au cours de cette thèse

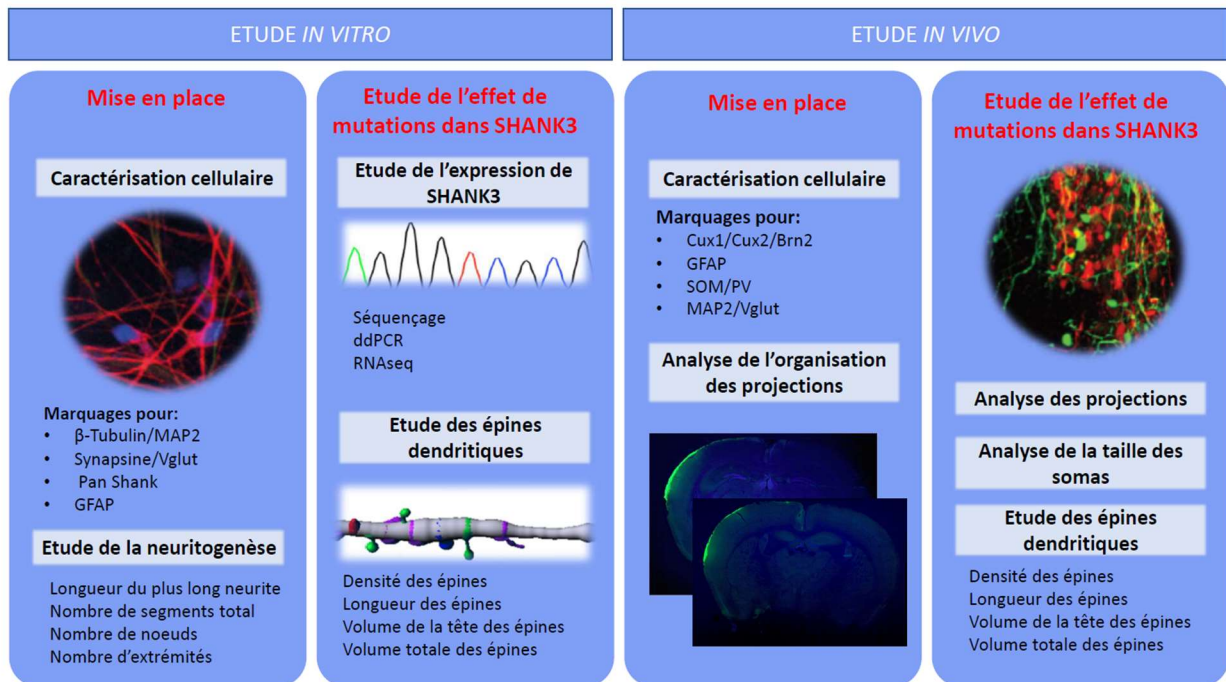


Figure 25 : Présentation des différents axes étudiés dans les projets *in vitro* et *in vivo* de cette thèse

Dans le projet *in vitro*, les neurones analysés proviennent de la différenciation de cellules progénitrices neurales produites au laboratoire de I-Stem. Le protocole de dérivation neuronale a été établi pour obtenir des neurones corticaux glutamatergiques des couches II à IV. L'appartenance des neurones aux couches superficielles du cortex a été confirmée par des marquages immunologiques dirigés contre *Cux1*, *Cux2* et *Brn2* (Boissart et al, 2013; Darville et al, 2016).

La cinétique de développement des neurones contrôles dérivés d'iPSC a été analysée par des marquages immunologiques dirigés contre la β -Tubuline, MAP2, la Synapsine ainsi que VGlut.

La neuritogenèse des neurones contrôles dérivés d'iPSC a également été évaluée après 15 jours de développement *in vitro*. Après immunomarquage dirigé contre MAP2, les neurones ont été imagés au microscope à fluorescence. Les acquisitions ont ensuite été analysées grâce au logiciel Acapella.

L'expression de SHANK3 a été quantifiée dans les neurones dérivés d'iPSC de 4 patients porteurs de mutations tronquantes dans l'exon 21 de SHANK3 ainsi que dans les neurones dérivés d'iPSC de 3 individus contrôles. Pour cela plusieurs méthodologies ont été employées : la ddPCR et le RNAseq. La présence des mutations dans les neurones des patients a été confirmée au préalable par séquençage de Sanger. Toutes ces mesures ont été effectuées après 40 jours de développement *in vitro*.

L'effet de SHANK3 sur la spinogenèse a été analysé par étude des épines dendritiques. Pour cela, les neurones ont été transduits après 40 jours de développement *in vitro* avec un lentivirus exprimant la GFP (Green fluorescent protein) afin de visualiser au microscope la morphologie des neurones et des épines dendritiques. Pour augmenter le signal de la GFP et obtenir une meilleure fidélité de la morphologie des épines dendritiques une étape supplémentaire de marquage immunologique dirigé contre la GFP a été effectuée. Après imagerie des neurones pyramidaux par microscopie confocale à immunofluorescence, les dendrites et épines dendritiques ont été reconstruits puis analysés grâce au

logiciel Imaris. Cet outil donne accès aux mesures d'un grand nombre de paramètres relatifs aux dendrites et aux épines dendritiques.

Dans le projet *in vivo*, les cellules sont transplantées, au stade de progéniteurs neuronaux, dans le cerveau de souris immunodéficientes, 1 ou 2 jours après leur naissance. Au préalable, les cellules progénitrices d'un individu contrôle, inclut dans le projet *in vitro*, ont été transfectées par un lentivirus exprimant la GFP afin de pouvoir les repérer dans le cerveau de la souris. De même, les cellules progénitrices d'un des patients inclut dans le projet *in vitro* a été transfecté avec un lentivirus exprimant la mCherry. Les deux individus sélectionnés sont représentatifs de leur groupe respectif (peu de variabilité observée au sein des individus contrôles et au sein des patients avec TSA pour les divers paramètres analysés lors de l'étude *in vitro*). Après différents temps de développement des neurones humains *in vivo*, les souris transplantées ont été sacrifiées par perfusion intracardiaque avec du paraformaldéhyde dans le but de fixer leur tissu cérébral. Les cerveaux ont ensuite été sectionnés, de façon coronale, au vibratome en définissant une épaisseur de coupe de 50 μm , puis ces dernières ont été observées par microscopie confocale à immunofluorescence.

Différentes séries d'injections ont été réalisées.

Une première série a consisté à injecter les cellules de l'individu contrôle uniquement afin de mettre en place et de caractériser le modèle. Les cellules ainsi transplantées ont été caractérisées par immunofluorescence, avec des anticorps dirigés contre les marqueurs Cux1, Cux2 et Brn2 afin de déterminer si les neurones se développant *in vivo* adoptent la même voie de différenciation que lorsqu'ils se développent *in vitro*. Des immunomarquages ont également été réalisés contre les marqueurs SOM, PV et GFAP pour interroger la présence d'interneurones et d'astrocytes humains dans les cerveaux de souris. Afin d'évaluer le degré de maturation des neurones greffés chez la souris, des immunomarquages dirigés contre MAP2 et VGlut ont également été entrepris. Dans le même but, une observation en microscopie électronique de la greffe humaine a été effectuée après 10 mois de développement des neurones humains *in vivo*.

L'organisation des projections des neurones de l'individu contrôle transplantés dans le cortex ou dans le système ventriculaire a été analysée. Pour cela, les cerveaux ont été sectionnés, avec une épaisseur de coupe de 50 μm et de façon coronale, à partir des bulbes olfactifs jusqu'au début du cervelet. Une coupe sur deux a été observée au microscope confocal à fluorescence afin de repérer dans quelles régions du cerveau de la souris, il était possible de visualiser des projections de neurones humains.

Durant la deuxième série d'injections, les cellules progénitrices de l'individu contrôles et celle du patient ont été transplantées simultanément, au même endroit et en quantité égale dans le cortex des souris. Afin de pouvoir comparer les signaux de la mCherry et de la GFP de façon précise, les cellules de l'individu contrôle marquées par la GFP et celles du patient marquées par la mCherry ont tout d'abord été triées en fonction de leur niveau de fluorescence. De cette manière, les cellules injectées possèdent une fluorescence suffisamment forte et similaire entre les deux groupes de cellules.

Afin d'évaluer l'impact de mutations dans SHANK3 sur les étapes précoces du neurones développement neuronal, plusieurs analyses comparatives ont été réalisées sur les cerveaux greffés par les deux populations de cellules :

- (1) Analyse des projections
- (2) Analyse de la taille des somas
- (3) Analyse des épines dendritiques

Ces analyses ont toutes été réalisées après 30 jours de développement *in vivo*.

Résumé des résultats obtenus au cours de cette thèse

Résultats	
In Vitro	<ul style="list-style-type: none">▪ Modèle multicellulaire composé d'environ 80% de neurones glutamatergiques, 20% de neurones GABAergiques et d'astrocytes▪ Apparition du domaine présynaptique et du domaine postsynaptique après 15 à 20 jours et 30 jours de développement <i>in vitro</i> respectivement▪ Neuritogenèse similaire entre différentes cultures d'un même individu contrôle▪ Réduction des ARN de <i>SHANK3</i> dans les neurones des patients avec TSA par rapport aux neurones des individus contrôles▪ Diminution de la densité des épines dendritiques dans les neurones des patients avec TSA par rapport aux neurones des individus contrôles▪ Diminution du volume de la tête des épines et du volume totale des épines dans les neurones des patients avec TSA par rapport aux neurones des individus contrôles▪ Neurones des individus contrôle et neurones des patients avec TSA peu matures au bout de 40 jours de développement <i>in vitro</i>
In Vivo	<ul style="list-style-type: none">▪ Différenciation des neurones humains greffés en neurones glutamatergiques des couches II à IV du cortex <i>in vivo</i>, en interneurons exprimant la somatostatine et en astrocytes▪ Neurones greffés de l'individu contrôle peu matures après 7 mois de développement <i>in vivo</i>▪ Projections des neurones de l'individu contrôle dans diverses régions cérébrales après leur transplantation dans le cortex moteur ou dans les ventricules des souris▪ Diminution de la taille des somas des neurones du patient avec TSA par rapport aux neurones de l'individu contrôle▪ Diminution des projections des neurones du patient avec TSA par rapport aux neurones de l'individu contrôle▪ Pas de différences significatives observées lors de l'étude des épines dendritiques entre les neurones du patient avec TSA et les neurones contrôles

Figure 26 : Résumé des résultats obtenus lors des projets *in vitro* et *in vivo* de cette thèse

Présentation des différents articles inclus dans cette thèse

Les Matériels et Méthodes ainsi que les résultats obtenus dans le cadre des études in vitro sont décrits dans l'article 1 intitulé « Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations » et publié en 2019 dans Scientific Reports.

Une revue est également incluse dans cette partie. Cette dernière s'intitule « Induced pluripotent stem cells as a tool to study brain circuits in autism-related disorders ». Elle a été publiée en 2018 dans le journal Stem Cell Research and Therapy. Cette revue présente différentes applications du modèle iPSC dans l'étude des TSA et des troubles liés au TSA. Une partie de cette revue est également consacrée aux études centrées sur l'analyse de SHANK3 grâce au modèle iPSC. Enfin cette revue traite des limitations de l'utilisation des iPSC dans les études in vitro et des avantages de leur utilisation dans un contexte in vivo avec le développement de souris chimères.

Les Matériels et Méthodes ainsi que les résultats obtenus dans le cadres de l'étude in vivo sont décrits dans l'article 2 intitulé « A chimeric mouse model to study human iPSC-derived neurons: the case of an autistic patient carrying a truncating SHANK3 mutation » et publié en 2020 dans Scientific Reports.

**Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism
carrying *de novo* SHANK3 mutations**

Laura Gouder ^{1,2,3*}, Aline Vitrac ^{1,2,3*}, Hany Goubran-Botros ^{1,2,3*}, Anne Danckaert ⁴, Jean-Yves Tinevez ⁴, Gwenaëlle André-Leroux ⁵, Ekaterina Atanasova ^{1,2,3}, Nathalie Lemièrre ^{1,2,3}, Claire S. Leblond ^{1,2,3}, Aurélie Poulet ⁷, Alexandra Benchoua ⁷, Richard Delorme ^{1,6}, Thomas Bourgeron ^{1,2,3§} and Isabelle Cloëz-Tayarani ^{1,2,3§}

*These authors contributed equally to the manuscript

§ Joint senior authors

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

²CNRS URA 2182 « Genes, Synapses and Cognition », Institut Pasteur, Paris, France

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

⁴Imagopole, Citech, Institut Pasteur, Paris, France

⁵MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

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

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

Materials and correspondence: Isabelle Cloëz-Tayarani, PhD

email: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying *de novo* SHANK3 mutations

Laura Gouder^{1,2,3}, Aline Vitrac^{1,2,3}, Hany Goubran-Botros^{1,2,3}, Anne Danckaert⁴, Jean-Yves Tinevez⁴, Gwenaëlle André-Leroux⁵, Ekaterina Atanasova^{1,2,3}, Nathalie Lemièrre^{1,2,3}, Anne Biton⁶, Claire S. Leblond^{1,2,3}, Aurélie Poulet⁷, Anne Boland⁸, Jean-François Deleuze⁸, Alexandra Benchoua⁷, Richard Delorme^{1,9}, Thomas Bourgeron^{1,2,3} & Isabelle Cloëz-Tayarani^{1,2,3}

The synaptic protein SHANK3 encodes a multidomain scaffold protein expressed at the postsynaptic density of neuronal excitatory synapses. We previously identified *de novo* SHANK3 mutations in patients with autism spectrum disorders (ASD) and showed that SHANK3 represents one of the major genes for ASD. Here, we analyzed the pyramidal cortical neurons derived from induced pluripotent stem cells from four patients with ASD carrying SHANK3 *de novo* truncating mutations. At 40–45 days after the differentiation of neural stem cells, dendritic spines from pyramidal neurons presented variable morphologies: filopodia, thin, stubby and mushroom, as measured in 3D using GFP labeling and immunofluorescence. As compared to three controls, we observed a significant decrease in SHANK3 mRNA levels (less than 50% of controls) in correlation with a significant reduction in dendritic spine densities and whole spine and spine head volumes. These results, obtained through the analysis of *de novo* SHANK3 mutations in the patients' genomic background, provide further support for the presence of synaptic abnormalities in a subset of patients with ASD.

Autism spectrum disorders (ASD) are characterized by atypical social communications, and the presence of restricted and repetitive patterns of behavior. ASD frequently co-occur with additional comorbidities such as intellectual disability (ID) and epilepsy¹. The genetic architecture of ASD differs among individuals, ranging from apparently monogenic to polygenic forms². Among the genes recurrently found mutated in individuals with ASD, the SHANK genes code for synaptic scaffolding proteins located at glutamatergic synapses. SHANK mutations can occur in patients with ASD with an intelligence quotient in the normal range (SHANK1), but mostly in patients with mild (SHANK2) to severe (SHANK3) ID³. SHANK3 haploinsufficiency also contributes to the clinical symptoms of patients with Phelan-McDermid syndrome (PMS) characterized by a terminal deletion of chromosome 22q13 that includes SHANK3 in the large majority of cases⁴. SHANK3 mutations represent a relatively frequent genetic cause for ASD accounting for 1–2% of individuals with ASD and ID^{3,5}. In addition, truncating SHANK3 mutations were also reported in rare cases of schizophrenia⁶.

¹Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, Paris, France. ²CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Institut Pasteur, Paris, France. ³Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Human Genetics and Cognitive Functions, Paris, France. ⁴Imagopole, Citech, Institut Pasteur, Paris, France. ⁵MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France. ⁶Bioinformatics and Biostatistics Hub, C3BI, USR 3756 IP CNRS, Institut Pasteur, Paris, France. ⁷CECS, I-STEM, AFM, 91030, Evry Cedex, France. ⁸Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), Institut de Biologie François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, F-91057, Evry, France. ⁹Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, Paris, France. Laura Gouder, Aline Vitrac and Hany Goubran-Botros contributed equally. Thomas Bourgeron and Isabelle Cloëz-Tayarani jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.C.-T. (email: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr)

SHANK proteins are located at postsynaptic densities (PSD) of excitatory neurons in different brain areas⁷. They are cytoskeletal scaffold proteins involved in the formation/function of dendrites. SHANK3 recruits a large number of synaptic intracellular interactors such as Homer as well as several neurotransmitter receptors including the α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA), the metabotropic glutamate (mGlu), and the *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) glutamate receptors⁸. On average, each single glutamatergic synapse contains approximately 300 SHANK family proteins (SHANK1-3), which correspond to approximately 5% of the total number of synaptic proteins⁹. A defect in the expression of one SHANK member causes significant synaptic deficiencies as evaluated by using animal models and cultured neurons. In mice, disruption of the *Shank3* gene alters excitatory synaptic transmission and leads to autistic-like behaviors such as social communication deficits and repetitive behaviors^{10–14}. By contrast, overexpression of Shank3 in cultured aspying cerebellar neurons triggers the development and maturation of functional spines expressing NMDA, AMPA and metabotropic glutamatergic receptors¹⁵. This overexpression approach in rat neurons in culture was also used to characterize the functional impact of SHANK mutations on the reduction of dendritic spines density^{16,17}. In a recent study, Mei *et al.*¹⁸ generated a conditional knock-in mouse model in which the re-expression of the *Shank3* gene restores spine densities in the adult striatum. In this model, the social communication deficits and the repetitive grooming behaviors were also specifically restored. By contrast, motor coordination and anxiety remain unchanged. All together, both *in vitro* and *in vivo* data indicate a significant role of SHANK3 protein in the regulation of synaptic plasticity with possible reversion of the observed deficits at the adult stage.

In humans, six studies investigated the role of SHANK3 using induced pluripotent stem cells (iPSC). Results from four studies in which iPSC-derived neurons from patients were used showed a reduction in dendritic spine or excitatory synaptic transmission as compared with controls^{19–22}. These effects can be reversed by SHANK3 overexpression, insulin growth factor 1 (IGF1) treatment¹⁹, Cdc2-like kinase 2 (CLK2) inhibition²⁰ or lithium treatment²¹. Another study using iPSC-derived enterocytes revealed a decrease in zinc uptake transporter that could play a role in the gastro-intestinal symptoms of the patients²³. It should be noted that most of these studies used cells from patients with PMS who were carriers of relatively large 22q13.3 deletions, encompassing not only *SHANK3* but also additional genes that could also contribute to the phenotype⁴. One study used genome-editing technologies to introduce *SHANK3* single nucleotide mutations in iPSC-derived neurons from controls²⁴. The authors showed that heterozygous and homozygous *SHANK3* truncating mutations severely impair hyperpolarization-active cation channels (HCN) that are associated with reduced synaptic connectivity and transmission²⁴. All these results converge towards a synaptic deficit in patients with ASD carrying a *SHANK3* mutation, but none of the previous studies has investigated the dendrite morphology of neurons carrying *SHANK3* truncating mutations in the patient genetic background. In the present study, we selected four independent patients carrying heterozygous truncating *de novo* *SHANK3* point mutations who had initially been characterized in our laboratory³. We generated the corresponding iPSCs for their selective reprogramming into cortical neurons in order to examine the effects of *SHANK3* haploinsufficiency on the level of *SHANK3* mRNA and on the 3D spine morphogenesis organization.

Results

Characterization of iPSC-derived neurons from patients with *SHANK3 de novo* mutations. We used the human iPSC-based model to analyze the effects of heterozygous truncating *de novo* *SHANK3* mutations found in four patients with ASD, and presenting moderate to severe ID. Their clinical symptoms are fully described in Leblond *et al.*³. The schematic location of the selected mutations in SHANK3 protein is shown in Fig. 1a. The four mutations are predicted to lead to truncated proteins either by inducing a stop codon directly (E809X and Q1243X) or via a frameshift of the open reading frame (G1271Afs*15 and L1142Vfs*153). For clarity, the six ankyrin domains are presented in their 3D structure to illustrate precisely their number and complete juxtaposition (Supplementary Fig. 1). Indeed, some contradictory results have been published regarding the topological characteristics of the ANK domains^{25,26}. Other SHANK3 domains such as SH3, PDZ and SAM are also complex structures that are involved in the interaction of SHANK3 proteins with its intracellular partners²⁶. Supplementary Fig. 2 illustrates the main technical steps for fibroblasts reprogramming into pluripotent stem cells, commitment to the dorsal telencephalon lineage, derivation, amplification and banking of late cortical progenitors (LCP) as previously described²⁷. LCP were differentiated into cortical neurons of the superficial layers II–IV, which correspond to the cortical upper layers as confirmed previously by Cux1, Cux2 and Brn2 immunolabeling²⁷. We used fibroblasts from patients with E809X and Q1243X mutations²⁷ and fibroblasts from one patient with G1271Afs*15 mutation²¹. The characterization of iPSC derived from the fibroblast of patient L1142Vfs*153 was not reported previously and is presented in Supplementary Fig. 3. In addition, we derived similar cortical glutamatergic neurons from three independent control individuals, namely 1869, 4603 and PB12^{21,27}. Supplementary Fig. 2 illustrates the different steps of culture that allow the production of a significant percentage of mature neurons and study workflow. Figure 1b shows the different maturation steps of the neurons obtained at 40–45 days post neural stem cells (NSC) differentiation. We first checked for the absence of any significant variability in the growth of neurites between single culture samples using the MAP2 staining^{28,29} (Fig. 1c and Supplementary Fig. 4). According to our protocol, iPSC were predominantly derived into glutamatergic neurons as illustrated by VGlut1 immunofluorescence staining and the selective expression of the yellow fluorescent protein driven by the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) promoter (Fig. 1d). This promoter is predicted selective for pyramidal excitatory neurons vs. inhibitory interneurons³⁰. In accordance with Boissart *et al.*²⁸, these neurons accounted for 70–80% of total cells whereas GABAergic neurons accounted for about 15% (data not shown). Our data clearly indicate a predominant presence of glutamatergic cells in the culture, independently of the cellular phenotypes (CTR vs. ASD). Finally, we determined the appearance of presynaptic and postsynaptic components by synapsin and PSD95 immunofluorescence staining. Colocalisation of SHANK and the excitatory marker PSD95 was first detectable at 30 days after NSC differentiation (Fig. 1e). We observed that neuronal cells

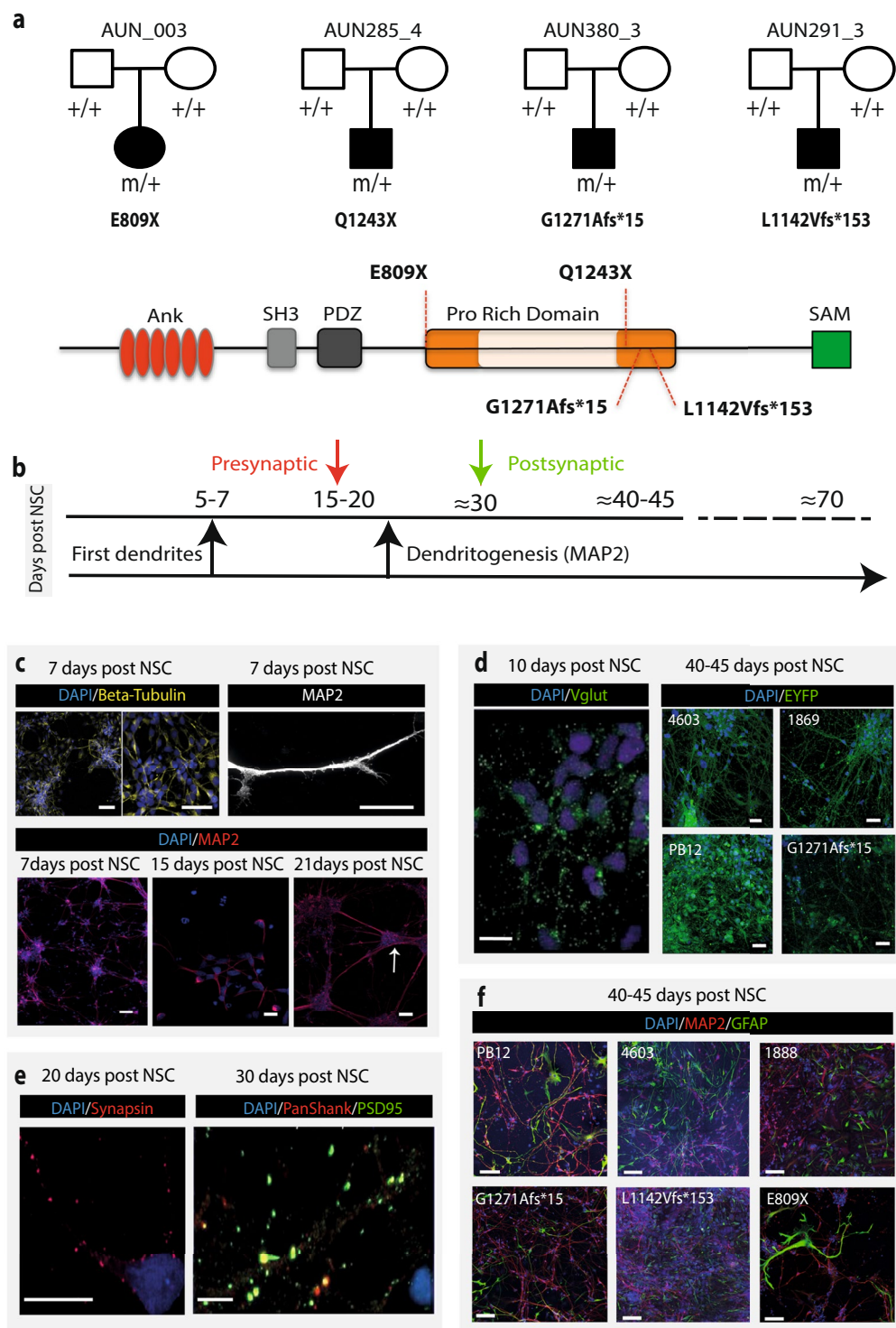


Figure 1. Pedigrees of the families carrying *de novo* SHANK3 mutations and neuronal characterization. **(a)** Upper, the four patients probands carry *de novo* truncating mutations in *SHANK3* gene (two « STOP » and two « frameshift » mutations leading to a premature STOP codon). **(a)** Lower, A schematic representation of the multidomain SHANK3 protein with the location of the four mutated aminoacids is provided. Conserved domains are indicated by filled rectangles. The mutations are located within the Proline-rich structure of SHANK3, between the PDZ and the SAM domains, and within exon 21 of *SHANK3* gene. **(b)** Schematic representation of neuron maturation at different time periods. **(c)** Upper left, Immunofluorescence staining of human control iPSC cells-derived neurons by beta III tubulin at 7 days post NSC differentiation. **(c)** Upper right, labeling of a single dendrite using the MAP2 marker showing dendritic growth cones at early stages of culture. **(c)** Lower, Immunofluorescence staining of human iPSC cells-derived neurons by MAP2 at different intervals of time post NSC differentiation. The target shows neurite elongation and established

connectivity between cell clusters. (d) VGlut1 marker at 10 days post NSC differentiation stained glutamatergic neurons. Labeling of control (1869, 4603, PB12) and ASD (G1271Afs*15) mature neurons at 40–45 days post NSC differentiation using the pAAV-CaMKIIa-hChr2-EYFP-WPRE lentivirus are also illustrated. (e) Immunofluorescence staining using presynaptic (synapsin) and postsynaptic (PSP95 and PanSHANK) markers. No staining was detectable before the indicated days post NSC differentiation (20 days for Synapsin, 10 days for VGlut1 and 30 days for PSD95). Data are from at least two control individuals (PB12 and 4603) (f) Immunofluorescence GFAP staining of cultures from iPSC-derived neurons showing the presence of astrocytes in 3 controls individuals (PB12, 4603, 1888) and 3 patients (G1271Afs*15, L1142Vfs*153, E809X). Scale bars: 100 μm (a–e); 100 μm (f).

could be kept in culture for about 70 days after NSC differentiation. However, they were not always at a full cellular viability. The time slot of 40–45 days therefore appeared convenient to study dendritic spine maturation and morphometry while preventing any cellular death. At this stage of maturation, we could also detect the presence of astrocytes accounting about 5–10% of total cells in control and ASD neuronal cultures (Fig. 1f). Astrocytes are known for their role in promoting the maturation of NSC³¹. They influence the local environment of iPSC-derived neurons, their maturation and promote synaptogenesis³².

SHANK3 expression in iPSC-derived neurons from patients and control individuals. We investigated *SHANK3* expression in iPSC-derived neurons from control individuals and patients. *SHANK3* mRNA were quantified using droplet digital PCR (ddPCR)³³ after reverse transcription (RT) of mRNA from cells in culture. *SHANK3* mRNA levels were significantly decreased by an average of 25% to 50% in patients as compared with controls ($p < 0.001$) (Fig. 2). RNAseq experiments show similar decrease in *SHANK3* mRNA levels as well as an enrichment of under-expressed genes among the genes targeted by Fragile-X mental retardation protein (FMRP) (Supplementary Fig. 5). By contrast, housekeeping genes were not enriched in genes which were differently expressed in neurons from ASD patients as compared with control neurons (Supplementary Fig. 5). We then sequenced the genomic and cDNA to detect the level of *SHANK3* mutated allele (primers are presented in Supplementary Table S1). Surprisingly, the mutant allele was present with a similar ratio between mutant and wild-type alleles in all patients' cDNA (Fig. 2). These data also indicate that under our experimental conditions, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanism devoted to the elimination of mRNA transcripts with premature stop codons appears inefficient. This might reflect previous observations of NMD dysfunction during neuronal cell development³⁴. Studies would be necessary to confirm the decrease in the levels of *SHANK3* proteins in samples from patients.

Spinogenesis in pyramidal neurons derived from iPSC is correlated to SHANK3 expression. Reduced *SHANK3* levels are expected to modify dendritic spine morphology. We therefore measured spinogenesis in iPSC-derived pyramidal glutamatergic cells by comparing the primary dendrites of neurons from patients with ASD to those from three control individuals (Fig. 3a,b). Our data show a significant decrease of nearly 50% in spine densities in all the four patients as compared to the three control individuals. The total volume of spines, as well as their head volume was also decreased to a similar extent. Spine straightness was slightly increased in patients but this change was less pronounced than those observed on spine densities and volumes. Spine mean diameter and spine length as well as the surface of spine attachment to the dendrite remained globally constant between patients and control individuals (Fig. 3b). Our data indicate that all spine categories were represented in pyramidal neurons from both patients and controls. However, we observed some differences in their relative proportions: filopodia were present at highest densities in both control individuals and patients as compared to the combined thin, stubby and mushroom categories ($p < 0.0001$). By contrast, we did not observe any significant difference in spine maturation between patients and controls (Fig. 4). When *SHANK3* mRNA levels and dendrites were analyzed together, we found a significant correlation between the level of *SHANK3* mRNA and spine density ($p = 0.0067$), spine volume ($p = 0.024$) and spine head volume ($p = 0.0034$) (Fig. 5).

Discussion

In brain cortical circuits, dendritic spines play an important role in the establishment of excitatory synapses. However, their quantitative morphological analysis has been poorly documented in iPSC-derived neurons from patients with ASD. We therefore analyzed spinogenesis in iPSC-derived pyramidal glutamatergic cells using our published method for the 3D quantification of GFP-labeled dendritic spines³⁵. So far, data from studies using iPSC-derived neurons in neurodevelopmental disorders have included only one or two patients. In our study, we have increased the number to four ASD patients with precise *SHANK3* mutations. This aspect is of importance since each individual has a unique genetic background. In addition, a broad range of severe clinical symptoms are observed in patients carrying *SHANK3* mutations^{3,4,36}. Finally, recent observations indicate a dysregulation of different microbial species in Shank3 KO mice³⁷ that may affect GABAergic system³⁸ together with an apparent complex relationship between *SHANK3* genotype, sex and immune response³⁷. These observations strengthen the importance of using a larger number of patients for the analysis of cellular phenotypes in humans.

We could observe altered 3D spine morphologies and densities in comparison with control neurons in iPSC-derived neurons from four patients with ASD carrying *SHANK3 de novo* truncating mutations. Moreover, we could also correlate the reduced expression of *SHANK3* mRNA in neurons reprogrammed from patients' fibroblasts with the effects of the four distinct *SHANK3* mutations on spinogenesis. In neuronal cells, a dendritic mRNA transport occurs with local translation at dendritic spines³⁹. The decrease in *SHANK3* mRNA levels may result from reduced spine densities as observed in reprogrammed neurons from patients. The spatio-temporal

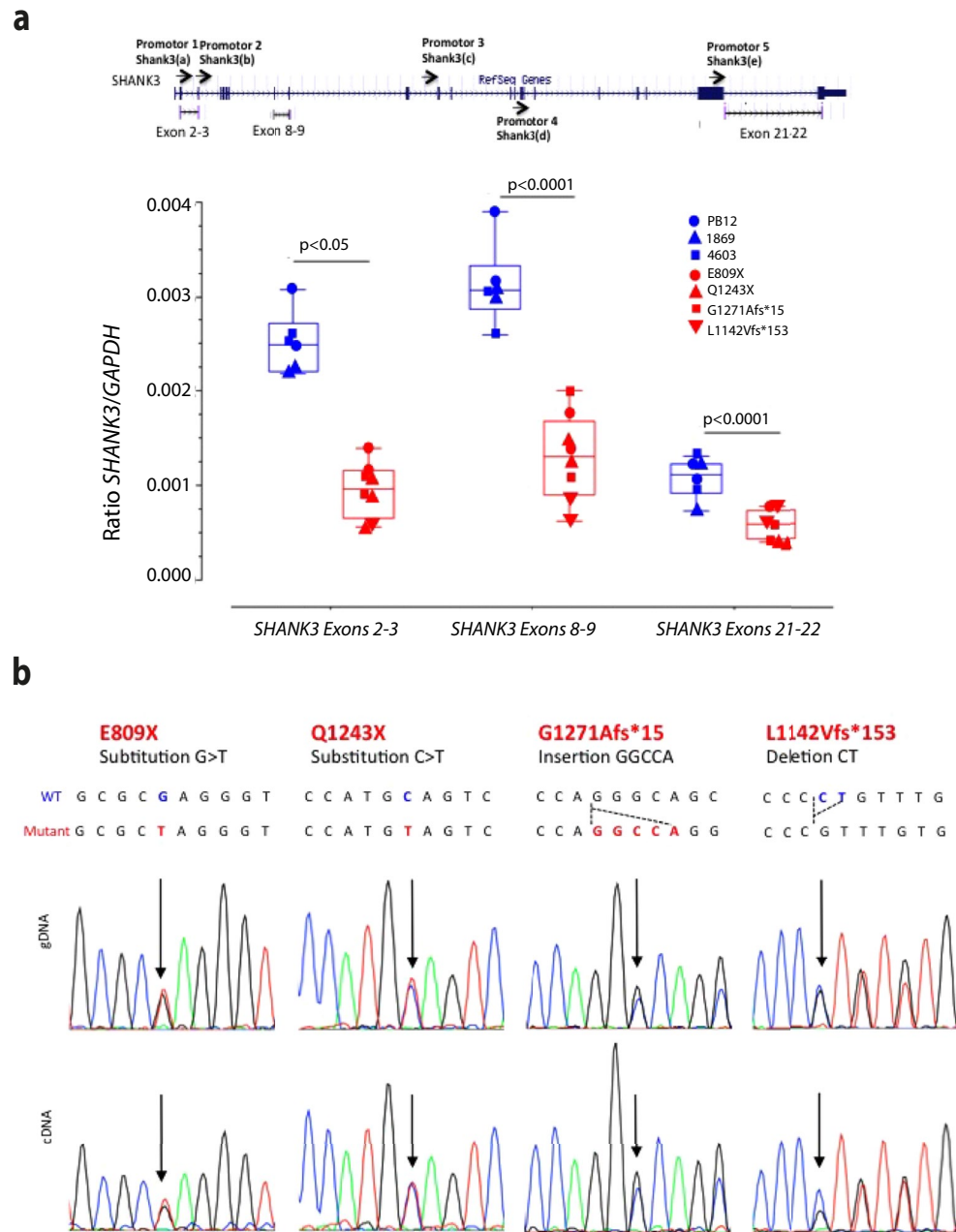


Figure 2. Analysis of *SHANK3* gene expression in iPSC-derived neurons from controls and ASD patients. (a) Quantification of *SHANK3* mRNA in iPSC-derived neurons (40 days post NSC) using RT-ddPCR. Data are mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using a two-way Anova. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ (b) Sequencing diagrams showing the presence of the four mutations in the genomic and cDNA extracted from iPSC-derived neurons.

control of gene expression which occurs at synapses involves the FMRP protein. FMRP target genes which are also subject to dendritic mRNA transport with local translation at synaptic sites⁴⁰ were enriched in down-regulated genes.

Our data are in agreement with the findings of Shcheglovitov *et al.*¹⁹ showing fewer excitatory synapses in iPSC-derived neurons obtained from two patients with PMS carrying a complete deletion of *SHANK3* as compared to controls. Our data are also in agreement with those reported in rat neurons by Durand *et al.*¹⁶ who demonstrated by a 2D spine analysis, that a stop *SHANK3* mutation selectively reduced the density of spines along the dendrites, while spine width remained unchanged. In the study of Bidinosti *et al.*²⁰ using rat cortical

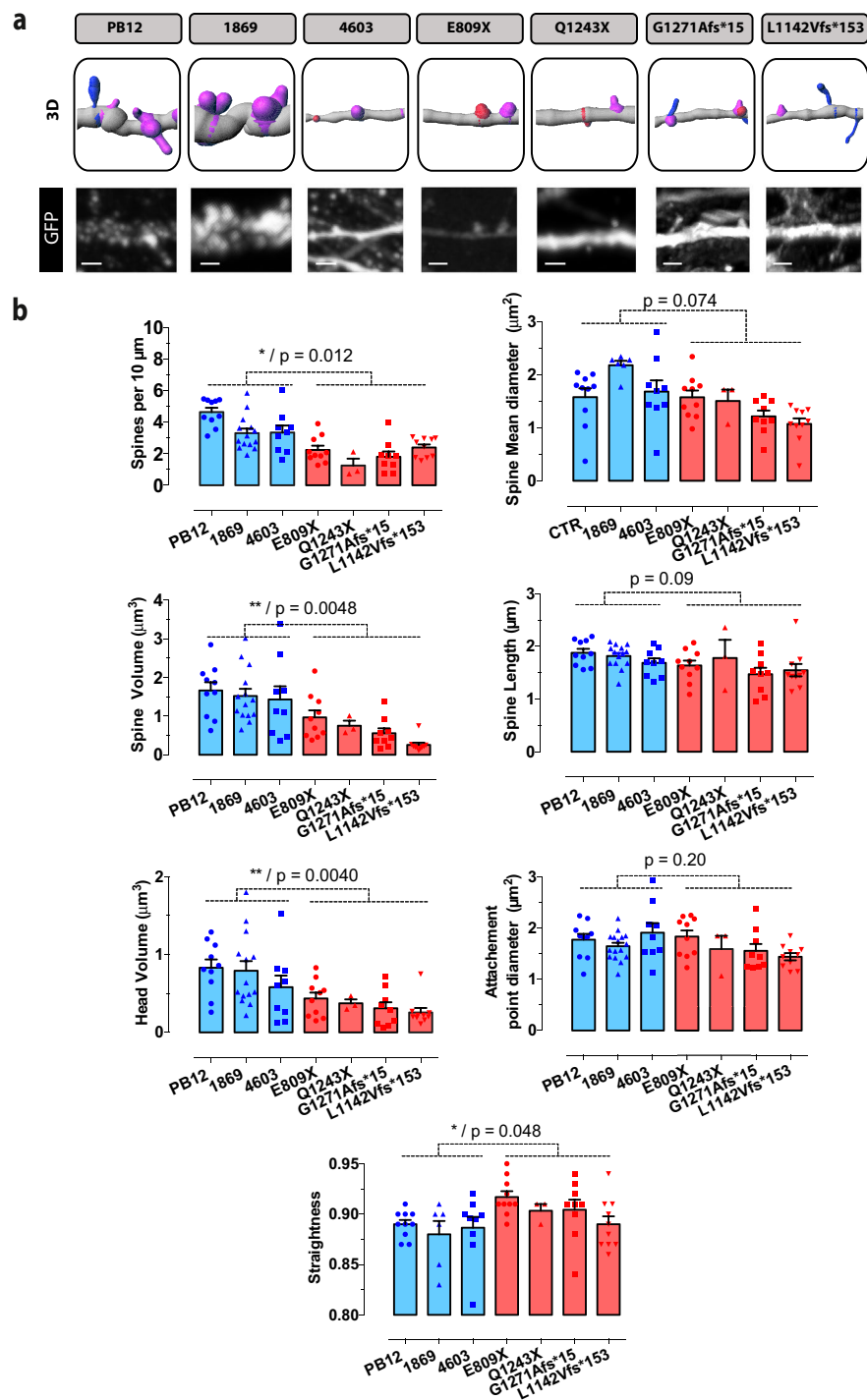


Figure 3. Quantitative analysis of the morphological parameters of primary dendritic spines between control and ASD neurons. **(a)** Primary spine segments with corresponding 3D reconstructions. Scale bar = 2 μm . Dendrite segments (grey color) are endowed with four categories of spines: Filopodia (pink color), Thin (blue), Stubby (pink) and Mushroom (green). **(b)** Spine morphological parameters were quantified using the Imaris software as described in Materials and Methods. Numbers of neuronal dendrites are indicated in the graph. Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using unpaired Student t-test in order to analyze the significance between mean values from combined controls and combined patients. Equality of variances was checked using the Fisher's F-test. P values are directly indicated in the graph. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

neurons, spine densities were in the same order as those from our study. Moreover, these authors found that inactivating *SHANK3* led to a similar reduction in spine densities. Altered dynamics of maturation of spines from excitatory neurons during development may underlie the cortical dysfunctions found in ASD by modifying the

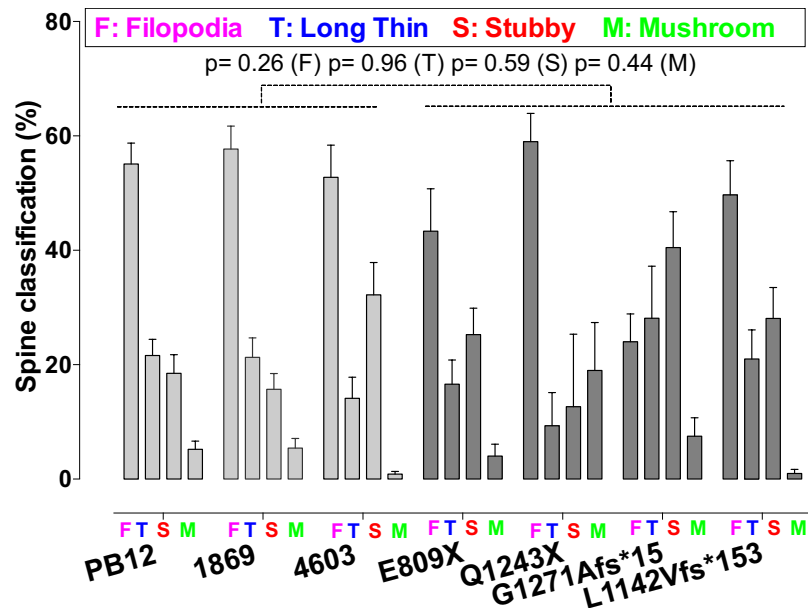


Figure 4. Morphological classification of primary dendritic spines between control and ASD neurons. Morphological parameters of the four spine categories were quantified using the Imaris software as described in Materials and Methods. Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using unpaired Student t-test. Equality of variances was checked using the Fisher's F-test. P values are directly indicated in the graph. Combined mean values for Filopodia were significantly increased as compared to combined values from all other spine categories ($p < 0.0001$). Statistical analysis was performed as described above.

intracortical projections of excitatory neurons. We could observe that spine maturation is not fully achieved. Filopodia were present at the highest densities in controls and in patients, as compared to other spine categories. The distribution of spine categories in patient G1271Afs*15 was slightly different with apparent lower levels of filopodia as compared with other individuals. Dendritic spine dysgenesis in neurons from ASD patients may underlie the synaptic defects found in diverse mouse models of ASD^{41,42}. An inadequate organization of neuronal circuits may cause the main clinical behavioral deficits, also reproducible in mouse models. At molecular levels, the genetic manipulation of selected proteins such as Shank3 but also Shank2, as well as neuroligins, Epac2, Tsc1/2, Ube3A, and PTEN that are involved in ASD, leads to altered spine shapes and densities in rodent models⁴³. Current advances in SHANK3 protein research clearly correlate its deficit to a wide-range of human neurological disorders with developmental synaptic dysfunction that may also be associated with synaptic decline at later stages as observed in Alzheimer disease⁴⁴. The fact that Shank3 protein has been shown to differentially regulate brain cortical and striatal circuits in mice⁴⁵, further supports its complex involvement not only in ASD but also in other neurological disorders.

In conclusion, our results obtained on iPSC-derived neurons from four independent patients with ASD and ID fully support the deleterious role of *SHANK3* mutations on dendrite density and morphology in the patient genetic background. This abnormality of dendrites is a current feature, which is also observed in iPSC-derived neurons from patients with neurodevelopmental syndromes (i.e. PMS, Rett syndrome, Timothy syndrome, Fragile X syndrome) as reviewed elsewhere^{46–49}. The 3D measurement of the dendritic spines morphologies represents a useful index for synaptic defects in patients with neurodevelopmental disorders.

Methods

We confirm that all methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. We confirm that all experimental protocols were approved by the named institutions. Informed consent was obtained from all subjects as detailed below.

Ancestry analysis of patients. For the ancestry analysis, patients and control individuals were genotyped using Illumina Infinium Omni1/2.5 (1 M/2.5 M SNPs) and Illumina Infinium HumanCore24 (300 K SNPs) bead-chips, respectively. To assess the genetic background of patients and controls, genotyping data from HapMap3 populations was used as a reference panel and the genetic distance based on pairwise identity by state calculation was performed using PLINK and 17 K SNPs (overlapping SNPs from the Illumina technologies) (Supplementary Fig. 6).

Production of human pluripotent Stem cells and their derivation into cortical neurons of layer II to IV. The iPSC were produced as described previously²⁷. Following the patient's legal representatives' approval, 8-mm skin punch biopsies were obtained (study approval by Committee for the Protection of Persons, CPP no. C07-33). The clinical characteristics have been published³. Fibroblasts reprogramming was performed using the four genes coding for the human factors *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc*, and *KLF4* cloned in Sendai viruses (Invitrogen).

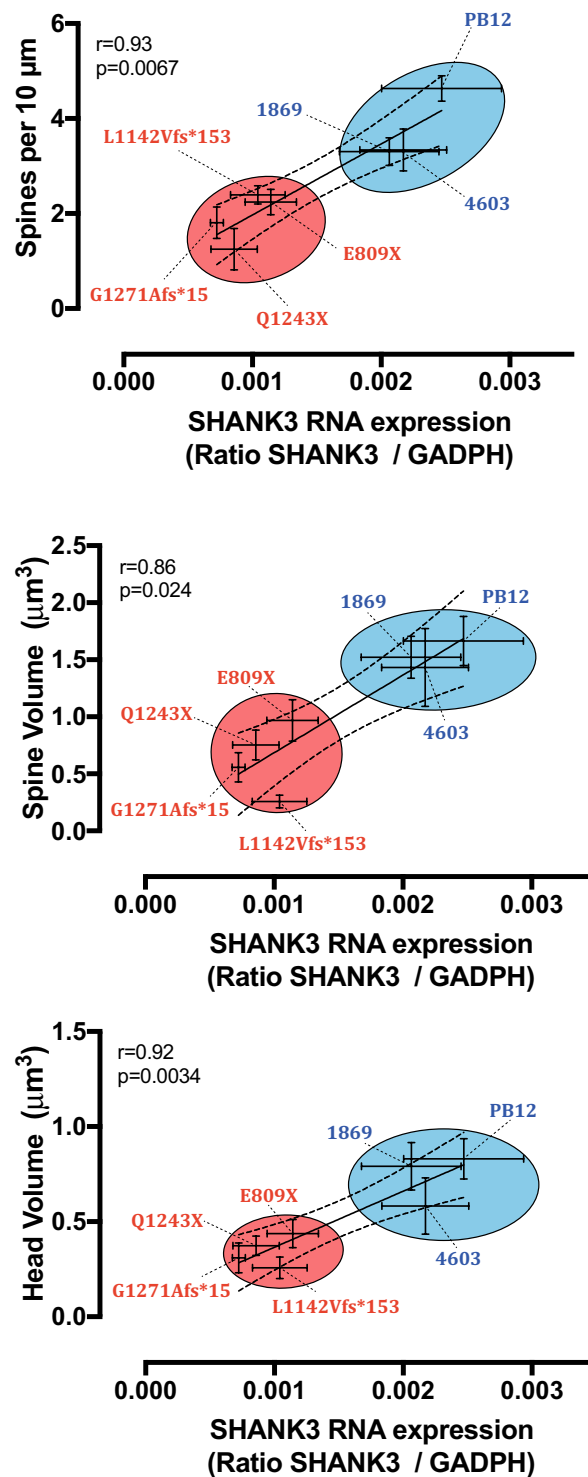


Figure 5. Correlation analysis between SHANK3 expression and alterations in dendritic spine parameters in iPSC-derived neurons from control individuals and patients with ASD. Upper graph, Correlation between SHANK3 mRNA and spine densities. Middle graph, Correlation between SHANK3 mRNA and total spine volume. Lower graph, Correlation between SHANK3 mRNA and head spine volume. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 6 software (GraphPad, sand Diego, California, USA). Data are mean \pm SEM. Coefficients were calculated using Spearman correlation method and are indicated in the graphs with statistical significance.

Induced PSC lines were characterized according to Boissart *et al.*²⁷. Commitment of pluripotent stem cells (PSC) to the neural lineage and derivation of stable cortical neural stem cells (NSC) was also described previously^{27,35}. For the control iPSC lines, we used GM04603 and GM01869, two male fibroblast cultures obtained from the

Coriell Biorepository (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA). The control line PB12 was reprogrammed from peripheral blood mononuclear cells obtained from an anonymous female blood donor at the French Blood Donor Organization.

Immunofluorescence. Immunofluorescence was described in Gouder *et al.*³². The list of primary and secondary antibodies with their respective dilutions is presented in Supplementary Table S2.

Lentiviral transduction. The protocol for the transduction of PGK-GFP-lentivirus has been previously described³². The same experimental conditions were used for the pAAV-CaMKIIa-hChr2-EYFP-WPRE lentivirus without subsequent immunofluorescence against the yellow fluorescent protein. The CaMKIIa promoter is predicted to drive specific expression in neurons *vs.* glia and in pyramidal excitatory neurons *vs.* inhibitory interneurons²⁸. Transduction of neuronal cultures was performed using a lentivirus containing a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) promoter provided by Dr Gabriel Lepousez.

Primary dendritic spine imaging. For imaging of dendritic spines, a step-by-step protocol has been previously published and is available in a video journal³². Main steps are as follows: (1) transduction of iPSC-derived cells with GFP lentiviral vectors followed by an immunofluorescence labeling with an anti-GFP antibody; (2) confocal imaging by a confocal laser-scanning microscope using a 40X oil NA = 1.3 objective and a 488 nm laser for GFP excitation; (3) selection of neurons with a pyramidal morphology; (4) Z-stack acquisitions with a Z spacing ranging from 150 nm to 300 nm; (5) Semi-automatic tracing of dendrites and automated segmentation of spines using the Filament Tracer module of Imaris 7.6 software (Bitplane AG, Zürich); (6) Spine classification in four classes defined by their morphology as follows: Stubby: Length < 1 μm; Mushroom: Length (spine) > 3 μm and Max width (head) > mean width (neck) x 2; Long thin: Mean width (head) ≥ Mean width (neck); Filopodia-like: length > 1 μm (no head).

Genomic, cDNA sequencing, and Genotyping. For genomic DNA sequencing, cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris, pH = 8.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) with proteinase K. DNA was extracted using phenol-chloroform isoamylalcohol (ref. P2069, Sigma) and isopropanol (ref. 59309-1L, Sigma). For cDNA sequencing, RNA was extracted using the miRNA Micro Kit (QIAGEN) and reverse transcription was performed using the SuperScript[®] VILO cDNA Synthesis Kit (ref. 11754–250, Invitrogen). The region encompassing the mutation was amplified by PCR using 5 or 4 sets of primers for the genomic DNA and cDNA, respectively (Supplementary Table S1) and the Kapa2G polymerase (KAPA 2G Robust HotStart PCR Kits, ref. KK5517, Clinisciences). PCR products were run on agarose gels and purified using phosphatase (FastAP, ref. EF0651, ThermoScientific) and exonuclease enzymes (Exonuclease I, EN0581, ThermoScientific). Controls were performed in the absence of reverse transcriptase. Sequencing was performed using the BigDye[®] Terminator V3.1 cycle sequencing and purifications kits (ref. 4337455,4376484, ThermoFisher).

RT-ddPCR assay. RNAs from 40-day human neurons in culture were extracted using the miRNA Micro Kit (QIAGEN, ref. 217004) and converted in cDNA using the Superscript[®] VILO cDNA synthesis Kit (ref. 11753–250, Invitrogen). The expression of *SHANK3* mRNA was analyzed using 3 sets of primers and probes targeting respectively exons 2-3, 8-9 and 21-22. A duplex ddPCR strategy was used to amplify and quantify *SHANK3* and the housekeeping gene *GADPH* in a same well. For each set of primers targeting *SHANK3*, probes were coupled either with the FAM dye or with the HEX dye. Each reaction medium contained 10 μl ddPCR Supermix for probes (without UTP), 1 μl of *SHANK3* primer/probe mix (Biorad), 1 μl of *GADPH* assay (Biorad), 6 μl of nuclease free water, and 2 μl of DNA (2.5 ng/μl). 20 μl of each reaction medium was transferred to a droplet generation cartridge before adding 70 μl of Droplet Generation Oil. Droplets generated with QX200 Droplet Generator were loaded into a clean 96-well PCR plate, sealed with foil. The PCR reaction conditions were as follows: 1 cycle at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 94 °C for 30 s, 1 cycle at 55 °C for 1 min, followed by 1 cycle at 98 °C for 10 min. Droplet signals were obtained using a Bio-Rad QX200 droplet digital PCR system (Bio-Rad, USA). Data were analyzed using the Bio-Rad QuantaSoft software version 1.3.2. Negative controls were obtained by excluding the retrotranscription step. Up to 20000 discrete droplets were analyzed for each PCR sample (Supplementary Table S3).

Statistics. The sample size and statistical analyses are reported in each figure legend. 95% confidence levels have been used.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Gillberg, C. The ESSENCE in child psychiatry: early symptomatic syndromes eliciting neurodevelopmental clinical examinations. *Rev. Disabil.* **31**, 1543–1551 (2010).
- Bourgeron, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 551–563 (2015).
- Leblond, C. S. *et al.* Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet.* **10**, e1004580 (2014).
- Tabet, A.-C. *et al.* A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. *NPJ Genomic Medicine.* **2**, 32 (2017).
- Durand, C. M. *et al.* Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* **39**, 25–27 (2007).

6. Gauthier, J. *et al.* De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 7863–7868 (2010).
7. Jiang, Y. H. & Ehlers, M. D. Modeling Autism by SHANK Mutations in Mice. *Neuron* **78**, 8–27 (2013).
8. Tomasetti, C. *et al.* Treating the synapse in major psychiatric disorders: the role of postsynaptic density network in Dopamine-Glutamate interplay and psychopharmacologic drugs molecular actions. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, E135 (2017).
9. Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K. & Okabe, S. Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nat. Methods* **2**, 677–684 (2005).
10. Bozdagi, O. *et al.* Haploinsufficiency of the autism-associated *Shank3* gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol. Autism* **1**, 1–15 (2010).
11. Peça, J. *et al.* *Shank3* mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* **472**, 437–442 (2011).
12. Wang, X. *et al.* Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of *Shank3*. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3093–3108 (2011).
13. Yang, M. *et al.* Reduced excitatory neurotransmission and mild autism-relevant phenotypes in adolescent *Shank3* null mutant mice. *J. Neurosci* **32**, 6525–6541 (2012).
14. Zhou, Y. *et al.* Mice with *Shank3* Mutations Associated with ASD and Schizophrenia Display Both Shared and Distinct Defects. *Neuron* **89**, 147–162 (2016).
15. Roussignol, G. *et al.* *Shank* expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J. Neurosci.* **25**, 3560–3570 (2005).
16. Durand, C. M. *et al.* SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry* **17**, 71–84 (2012).
17. Cochoy, D. M. *et al.* Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Mol. Autism* **6**, 1–13 (2015).
18. Mei, Y. *et al.* Adult restoration of *Shank3* expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature* **530**, 481–484 (2016).
19. Shcheglovitov, A. *et al.* SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* **503**, 267–271 (2013).
20. Binidosti, M. *et al.* CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency. *Science* **351**, 1199–1203 (2016).
21. Darville, H. *et al.* Human pluripotent stem cell-derived cortical neurons for high throughput medication screening in autism: a proof of concept study in SHANK3 haploinsufficiency syndrome. *EBiomedicine* **9**, 293–305 (2016).
22. Kathuria, A. *et al.* Stem cell-derived neurons from autistic individuals with SHANK3 mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Mol. Psychiatry* **00**, 1–12 (2017).
23. Pfaender, S. *et al.* Zinc deficiency and low enterocyte zinc transporter expression in human patients with autism related mutations in SHANK3. *Sci. Rep.* **7**, 45490 (2017).
24. Yi, F. *et al.* Autism-Associated SHANK3 haploinsufficiency Causes Ih-Channelopathy in Human Neurons. *Science* **352**, aaf2669 (2016).
25. Schuetz, G. *et al.* The neuronal scaffold protein *Shank3* mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase *Ret* in epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **167**, 945–952 (2004).
26. Mameza, M. G. *et al.* SHANK3 gene mutations associated with autism facilitate ligand binding to the *Shank3* ankyrin repeat region. *J. Biol. Chem.* **288**, 26697–26708 (2013).
27. Boissart, C. *et al.* Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry* **3**, e294 (2013).
28. Mercati, O. *et al.* Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites. *Biol. Open* **2**, 324–334 (2011).
29. Mercati, O. *et al.* 2017. CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry* **22**, 625–633 (2017).
30. Osten, P., Dittgen, T. & Licznarski, P. Lentivirus-based genetic manipulations in neurons *in vivo*. In: Kittler, J. T. & Moss, S. J., editors. *The Dynamic Synapse: Molecular Methods in ionotropic receptor biology*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. *Frontiers in Neuroscience* Chapter 13 (2006).
31. Song, H., Stevens, C. F. & Gage, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**, 39–44 (2002).
32. Slezak, M. & Pfrieder, F. W. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* **26**, 531 (2003).
33. Rački, N., Morisset, D., Gutierrez-Aguirre, I. & Ravnikar, M. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 661–667 (2014).
34. Nickless, A., Bailis, J. M. & You, Z. Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell. Biosci.* **7**, 26 (2017).
35. Gouder, L. *et al.* Three-dimensional quantification of dendritic spines from pyramidal neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J. Vis. Exp.* **1**, e53197 (2015).
36. De Rubeis, S. *et al.* Delineation of the genetic and clinical spectrum of Phelan-McDermid syndrome caused by SHANK3 point mutations. *Mol. Autism* **9**: 31.
37. abouty, L. *et al.* Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior and Immunity*, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.05.015> (2018).
38. Bravo, J. A. *et al.* Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 16050–16055 (2011).
39. Doyle, M. & Kiebler, M. A. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J.* **30**, 3540–3552 (2011).
40. Zalfa, F. *et al.* The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**, 317–327 (2003).
41. Phillips, M. & Pozzo-Miller, L. Dendritic spine dysgenesis in Autism Related Disorders. *Neurosci Lett.* **601**, 30–40 (2015).
42. Wang, M. *et al.* Distinct defects in spine formation or pruning in two gene duplication mouse models of autism. *Neurosci. Bull.* **33**, 143–152 (2017).
43. Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J. E. & Woolfrey, K. M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* **14**, 285–293 (2011).
44. Alexandrov, P. N., Zhao, Y., Jaber, V., Cong, L. & Lukiv, W. J. Deficits in the Proline-Rich Synapses-associated *Shank3* protein in multiple neuropsychiatric disorders. *Fron. Neurol.* **8**, 670 (2017).
45. Bey, A. L. *et al.* Brain region-specific disruption of *Shank3* in mice reveals a dissociation for cortical and striatal circuits in autism-related behaviors. *Transl. Psychiatry* **8**, 94 (2018).
46. Astick, M. & Vanderhaeghen, P. From Human Pluripotent Stem Cells to Cortical Circuits. *Current Topics in Developmental Biology* **129** (2018).
47. Fink, J. J. & Levine, E. S. Uncovering true cellular phenotypes: Using induced pluripotent stem cell-derived neurons to study early insults in neurodevelopmental disorders. *Front. Neurol.* **9** (2018).
48. Omole, A. E. & Fakoya, A. O. J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *Peer J.* **6**, e4370 (2018).
49. Vitrac, A. & Cloëz-Tayarani, I. Induced pluripotent stem cells as a tool to study brain circuits in autism-related disorders. *Stem Cell Res Ther.* **9**, 226 (2018).

Acknowledgements

The authors are thankful to the Clinical Investigation Center of Robert Debré hospital for assistance with patient recruitment, sampling and fibroblast preparations. The French Ministry of Education provided the fundings for LG and AV's PhDs. Other fundings for this study were provided by grants from the French National Research Agency ANR (ANR-13-SAMA-0006; SynDivAutism), the Bettencourt-Schueller Foundation, the Cognacq Jay Foundation, and the Fondamental Foundation. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). We are grateful to Pascal Roux for sharing his expertise in spectral confocal microscopy. 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 GM01869 ("1869"), GM04603 ("4603") and GM01888 ("1888"). PB12 was reprogrammed from blood samples provided by the French National Blood Collection Center (Etablissement Français du Sang, EFS).

Author Contributions

I.C.T. and T.B. conceived the study. I.C.T. was in charge of the overall direction and planning. L.G., A.V., H.G.B. carried out the neurobiological experiments in collaboration with J.Y.T., A.D., G.A.L. and E.A. N.L. and C.S.L. contributed to the genetic analyses. R.D. was responsible for the recruitment and clinical evaluation of subjects. A.B. and A.P. performed the reprogramming of fibroblasts. A.Bi., A.Bo. and J.F.D. contributed to the RNAseq experiments.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36993-x>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

**Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism
carrying *de novo* SHANK3 mutations**

Laura Gouder^{1,2,3§}, Aline Vitrac^{1,2,3§}, Hany Goubran-Botros^{1,2,3§}, Anne Danckaert⁴, Jean-Yves
Tinevez⁴, Gwenaëlle André-Leroux⁵, Ekaterina Atanasova^{1,2,3}, Nathalie Lemièrè^{1,2,3}, Anne
Biton⁶, Claire S. Leblond^{1,2,3}, Aurélie Poulet⁷, Anne Boland⁸, Jean-François Deleuze⁸,
Alexandra Benchoua⁷, Richard Delorme^{1,9}, Thomas Bourgeron^{1,2,3}
and Isabelle Cloëz-Tayarani^{1,2,3*}

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

²CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Institut Pasteur, Paris, France

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

⁴Imagopole, Citech, Institut Pasteur, Paris, France

⁵MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

⁶Bioinformatics and Biostatistics Hub, C3BI, USR 3756 IP CNRS, Institut Pasteur, Paris,
France

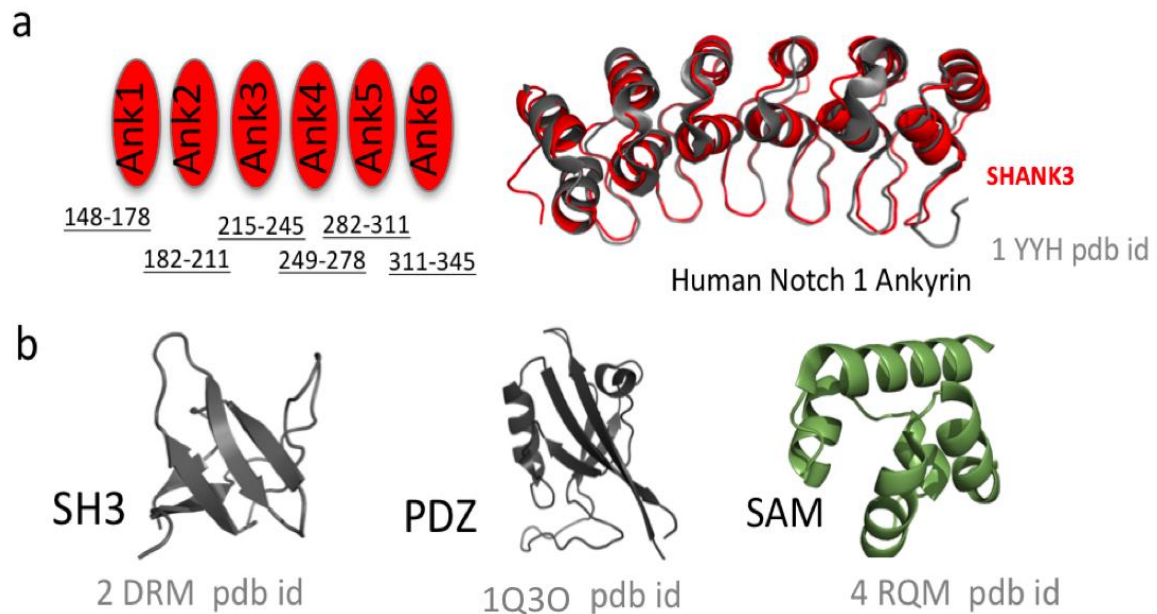
⁷CECS, I-STEM, AFM, 91030 Evry Cedex, France

⁸Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), Institut de Biologie
François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, F-91057, Evry, France

⁹Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Department of Child and
Adolescent Psychiatry, Paris, France

[§]These authors contributed equally to the manuscript

Figure S1: 3D structure of selective domains of SHANK3 protein



Legend to Supplementary Figure S1: **a.** Left panel shows the delineation for the six ankyrin (ANK) domains ranging from residues 148 to 345 within the SHANK protein aminoacid structure. Right panel shows the juxtaposed ANK domains, which have been homology modeled according to a method reported previously^{28,29}, using 1YYH (Ehebauer et al, 2005), 3B7B (Collins et al, 2004) and 1WDY (Tanaka et al, 2004) pdb identities as 3D templates, selected from HHPred detection (Söding et al, 2005). **b.** Illustration of the 3D structures of the SH3, PDZ and SAM domains, which are identified domains of full-length SHANK. All FASTA sequences were retrieved from the UniProtKB server at <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYBO#structure>.

Figure comment: The six ankyrin (ANK) domains are presented in their putative 3D structure to illustrate precisely their numbers and complete juxtaposition with respect to ANK topology. Indeed, some contradictory results have been published regarding the topological characteristics of the ANK domains (Schuetz et al, 2004; Mameza et al, 2013). Although predicted benign, coding-sequence variants within the ANK domains have been identified in patients with ASD³. Other SHANK3 domains such as SH3, PDZ and SAM are also complex structures that are involved in the interaction of SHANK3 proteins with its intracellular partners (Mameza et al, 2013).

Supplementary References:

Collins, R.E., Northrop, J.P., Horton, J.R., Lee, D.Y., Zhang, X., Stallcup, M.R. & Cheng, X. The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. *Nat. Struct. Mol. Biol* **15**, 245-250 (2004).

Ehebauer, M.T., Chirgadze, D.Y., Hayward, P., Martinez-Arias, A. & Blundell, T.L. High-resolution crystal structure of the human Notch1 ankyrin domain. *Biochem J.* **392**, 13-20 (2005).

Mameza, M.G., Dvoretzkova, E., Bamann, M., Honck, H.H., Guler, T., Boeckers, T.M., Schoen, M., Verpelli, C., Sala, C., Barsukov, I. *et al.* SHANK3 gene mutations associated with autism facilitate ligand binding to the Shank3 ankyrin repeat region. *J. Biol. Chem.* **288**, 26697-26708 (2013).

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

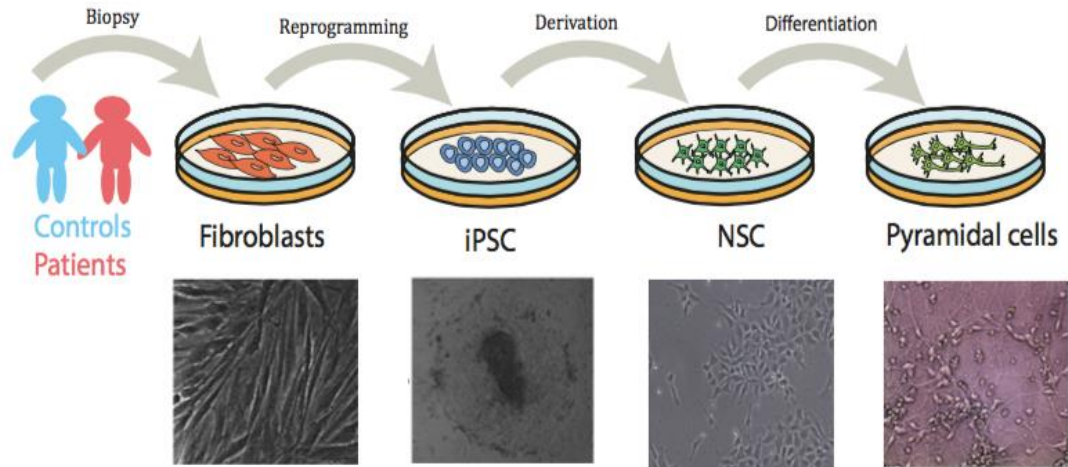
Söding, J., Biegert, A., Lupas, A. N. The HHPred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **33** (Web Server issue), W244–W248 (2005).

Tanaka, N., Nakanishi, M., Goto, Y., Kitade, Y. & Nakamura, K.T. Structural basis for recognition of 2'5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. *EMBO J.*, **23**, 3929-39-38 (2004).

Figure S2: Study workflow

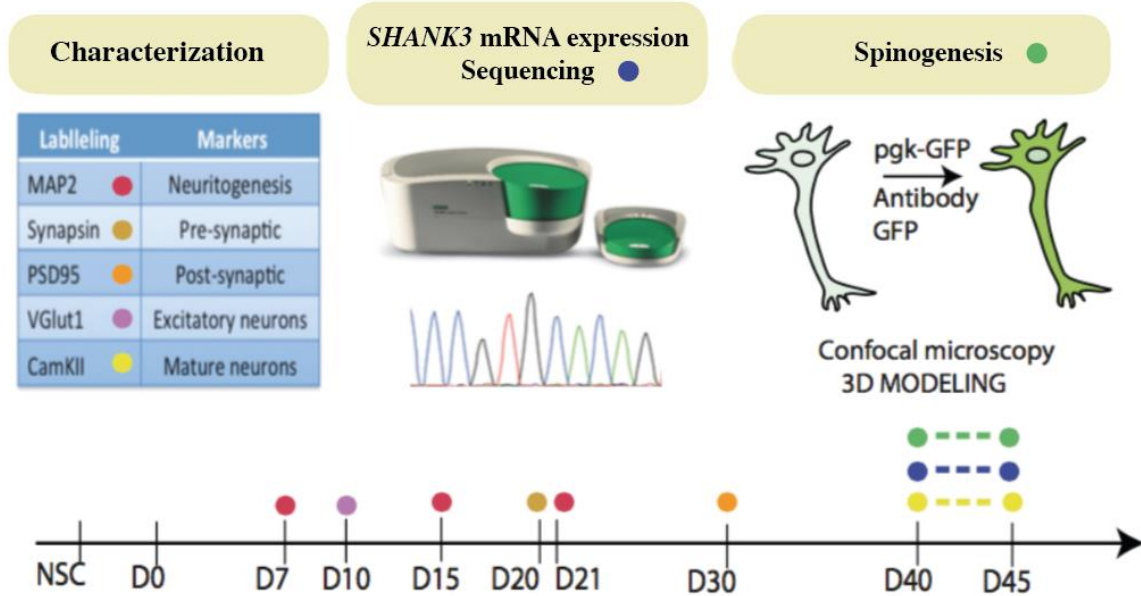
a

Production of cortical pyramidal neurons from a single clone



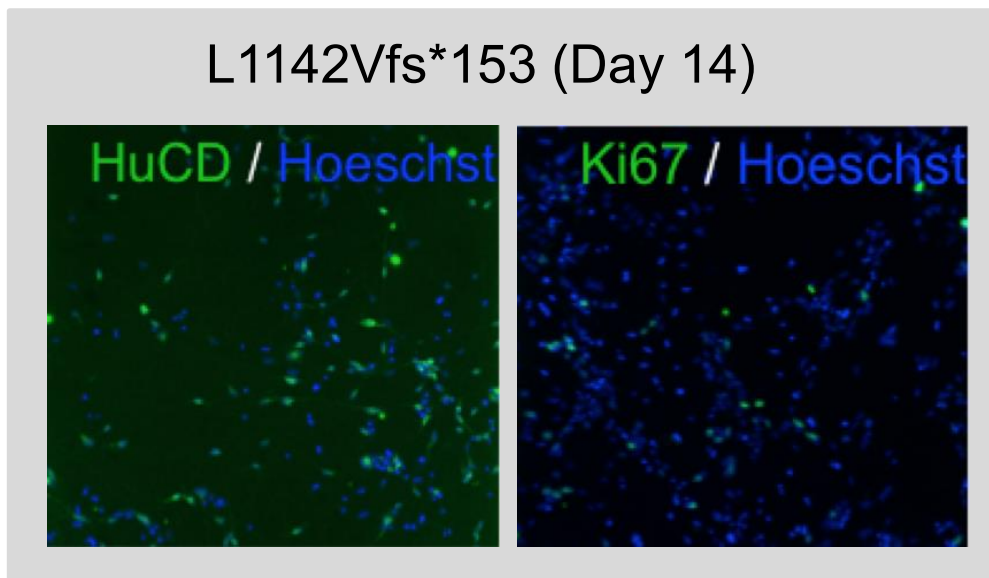
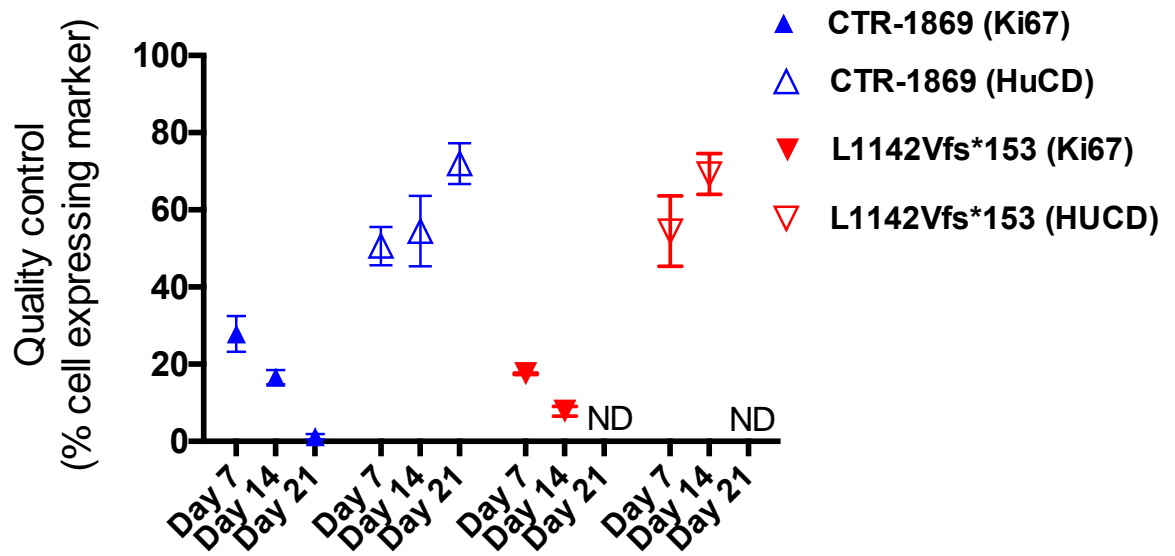
b

Analysis



Legend to Supplementary Figure S2: **a.** Schematic representation of the different steps for the production of pyramidal neurons. A single clone was analyzed for each independent individual: 3 controls and 4 patients (7 cell lines in total). **b.** Illustration of the different steps of analysis, which includes neuronal characterization, *SHANK3* mRNA expression, and morphometric analysis of dendritic spines.

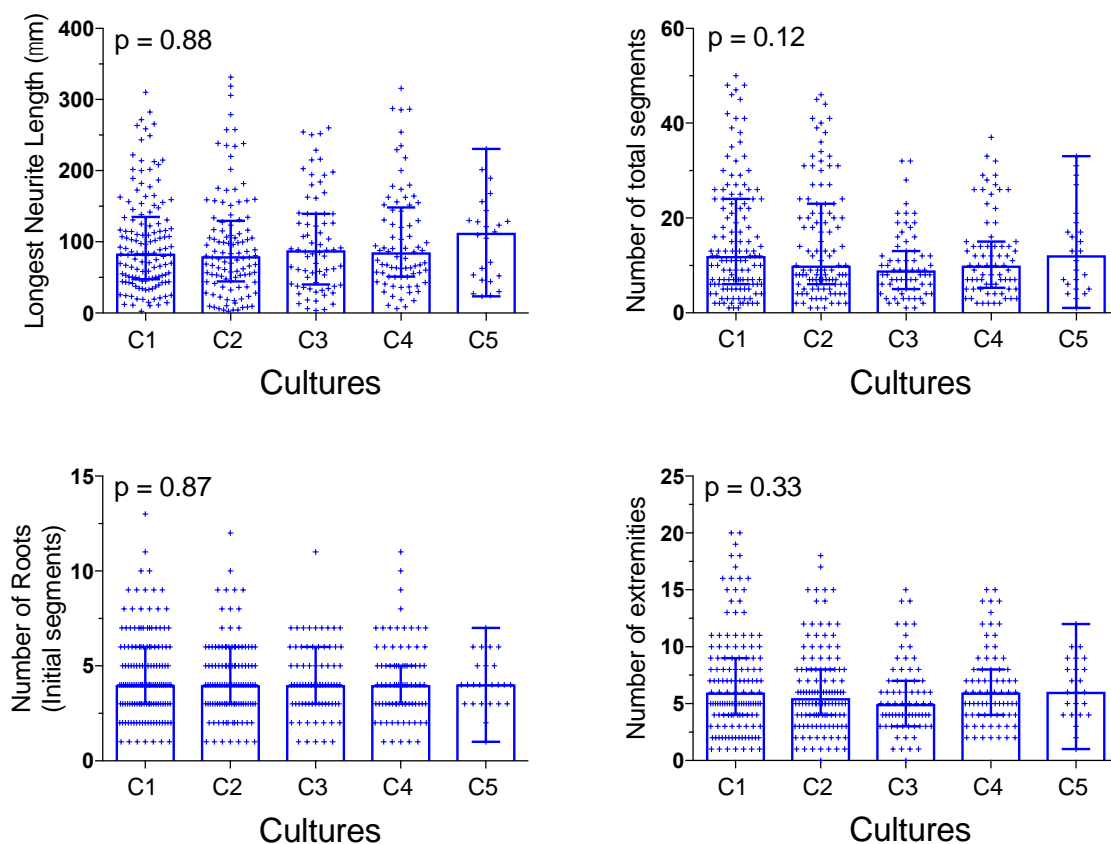
Figure S3: Characterization of iPSC from patient L1142Vfs*153



Legend to Supplementary Figure S3: Late cortical progenitors (LCP) terminal differentiation using high-throughput screening in 384-well plates as described in Boissart et al²⁷. Top, Values from the graph correspond to the automated quantification of the kinetics of neural proliferation (Ki-67 marker) and neuronal differentiation (HuCD marker) at different days after cell plating for one control and patient with the *SHANK3* mutation L1142Vfs*153. Results represent the percentage of cells expressing each marker in total cell populations. Data are mean \pm SD. Bottom, Representative pictures captured by the Arrayscan microscope are presented for the cells from patient L1142Vfs*153 which was not included and validated elsewhere^{21,27}.

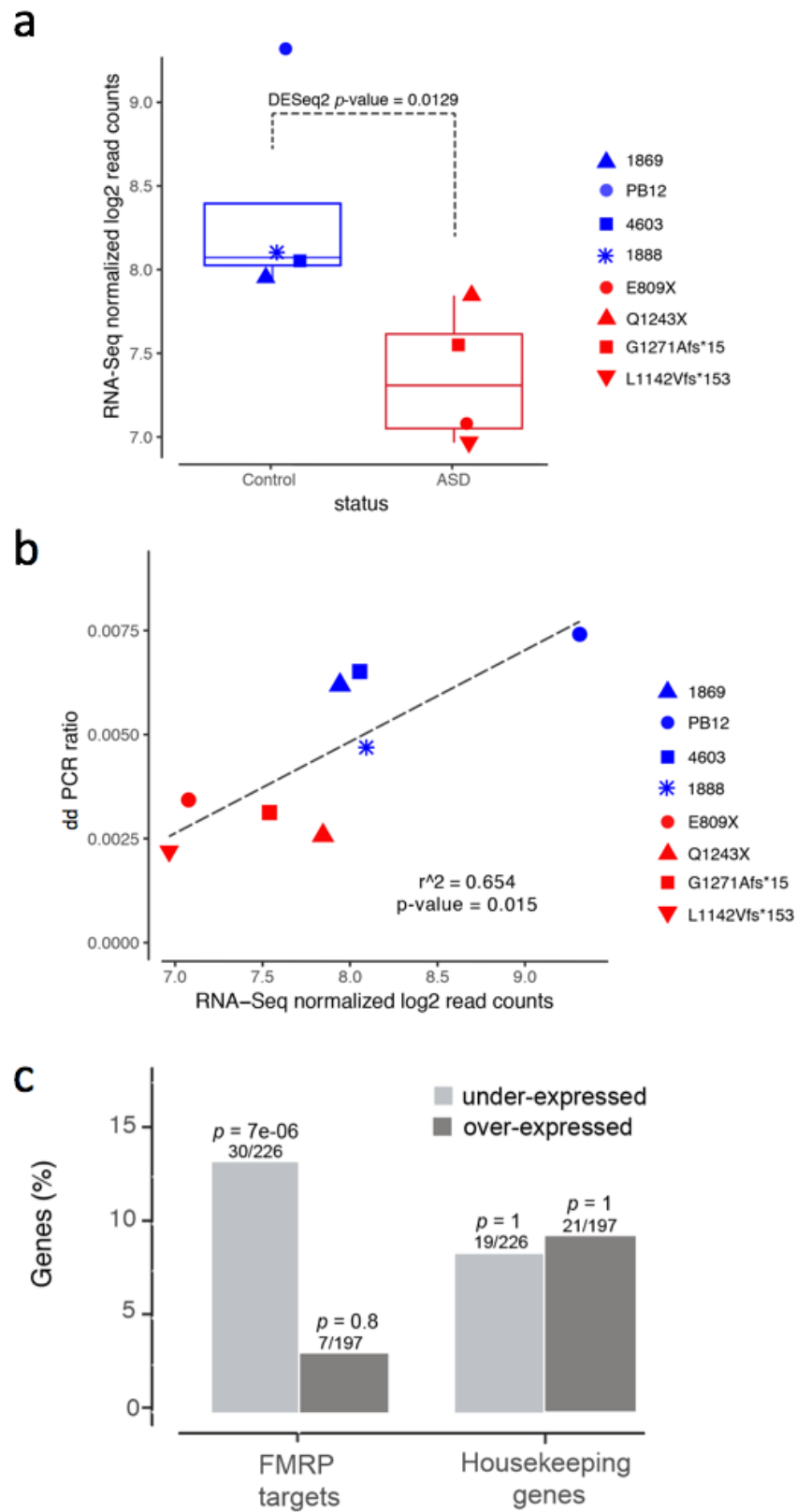
Figure S4: Quantitative analysis of neuritogenesis in five distinct cultures of control

human iPSC-derived neurons



Legend to Supplementary Figure S4: Neuritogenesis, a complex dynamic process combining neurite outgrowth and branching, was followed in 5 distinct cultures of control iPSC-derived neurons (15 days post NSC). At the end of culture, neurons were fixed and immunostained with an anti-MAP2 antibody. Fluorescence images were acquired with an inverted Axio Observer.ZI (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an AxioCam camera. Quantification of images was performed using the Acapella software (Perkin Elmer) as previously described²⁸. Briefly, neuronal nuclei were detected according to the DAPI staining and for quantification all parameters were measured under the same defined threshold conditions. Measured parameters loaded from the specific module “neurite detection” include the length of the longest neurite per neuron, the total numbers of root extremities and segments. Scatter dot plots with a line at median with interquartile range are represented. Each dot represents one neuron. Statistical analysis was performed using a Kruskal-Wallis test and GraphPad Prism Version 6 software (GraphPad, sand Diego, California, USA). Outliers were identified using the ROUT method with a Q value of 1%. P values are directly indicated in the graphs. No statistical difference was found between the 5 cultures (C1 to C5).

Figure S5: *SHANK3* gene expression in iPSC-derived neurons from controls and ASD patients.



Legend to Supplementary Figure S5: **a.** Quantification of *SHANK3* mRNA in iPSC-derived neurons (40 days post NSC) using RNAseq technology. Data are shown as log2 read counts normalized by library size. Statistical analysis was performed using DESeq2 package (v1.18.1), $p=0.013$. **b.** Scatter plots showing *SHANK3* expression as measured by ddPCR (Ratio *SHANK3/GAPDH*) versus RNA-Seq (log2 normalized read counts). PCR were done in two replicates for each individual. For each replicate, *SHANK3/GAPDH* ratio was summed across the selected *SHANK3* exons (2-3; 8-9; 21-22) to obtain one estimate of *SHANK3* expression per sample. *SHANK3* expression values were then averaged across the two PCR replicates from a same individual. Coefficients of linear regression is $r^2=0.654$, $p=0.015$. **c.** Enrichment analysis within the following two gene sets: 777 FMRP targets from Darnell et al. (2001) and 3519 housekeeping genes from Eisenberg et al. (2013). Analysis was performed on the genes within the two gene sets which were detected using DESeq2 package and observed as under-expressed ($FDR < 5\%$ and $\logFC < 0$) and over-expressed ($FDR < 5\%$ and $\logFC > 0$) between control and ASD neurons. A total of 15,665 genes was detected as expressed in the RNA-Seq data using a threshold of one count-per-million reads in at least three samples. The y-axis gives the percentage of genes from each gene set present in the population of genes detected as under-expressed and over-expressed. *P*-values of the Fisher tests are given for each gene set and each group of genes above each barplot.

Method:

Library construction and RNA-seq

Stranded mRNAseq sequencing has been performed at the Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH, CEA). After complete quality control of RNA on each sample (quantification in duplicate and RNA6000 Nano LabChip analysis on Bioanalyzer 2100 from Agilent), libraries were prepared using the "TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit" from Illumina, with an input of 1 μg and with selection of poly(A) RNAs, following the manufacturer's instructions. Library quality was checked by Bioanalyzer 2100 analysis, and sample libraries were pooled before sequencing to reach the expected sequencing depth. Sequencing has been performed on an Illumina HiSeq 4000 as paired-end 100 bp reads, using Illumina sequencing reagents and pooling 6 samples per lane (corresponding on average to 40 to 50 million sequenced fragments or 80 to 100 million total reads). The quality of the sequences was checked using an in-house CNRGH pipeline before transferring the fastq files to Institut Pasteur.

Bioinformatics analysis

The RNA-Seq reads were mapped to the genome with the STAR aligner v2.5.3a (Dobin et al. 2013) in two-pass mode to the GRCh37 v75 genome, STAR was used to output uniquely Mapped read counts at the gene level. The 15,665 genes with at least one count-per-million reads in three samples were selected for further analysis. Differential expression analysis between ASD and Control samples was performed using DESeq2 v1.18.1 (Love et al., 2014). Plots were made in R using the package ggplot2 (Wickham 2009).

Supplementary References:

Darnell, J.C., Jensen, K.B., Jin, P., Brown, V., Warren, S.T. and Darnell, R.B. Fragile X Mental Retardation Protein Targets G Quartet mRNAs Important for Neuronal Function. *Cell*. **107**(4):489-99 (2001).

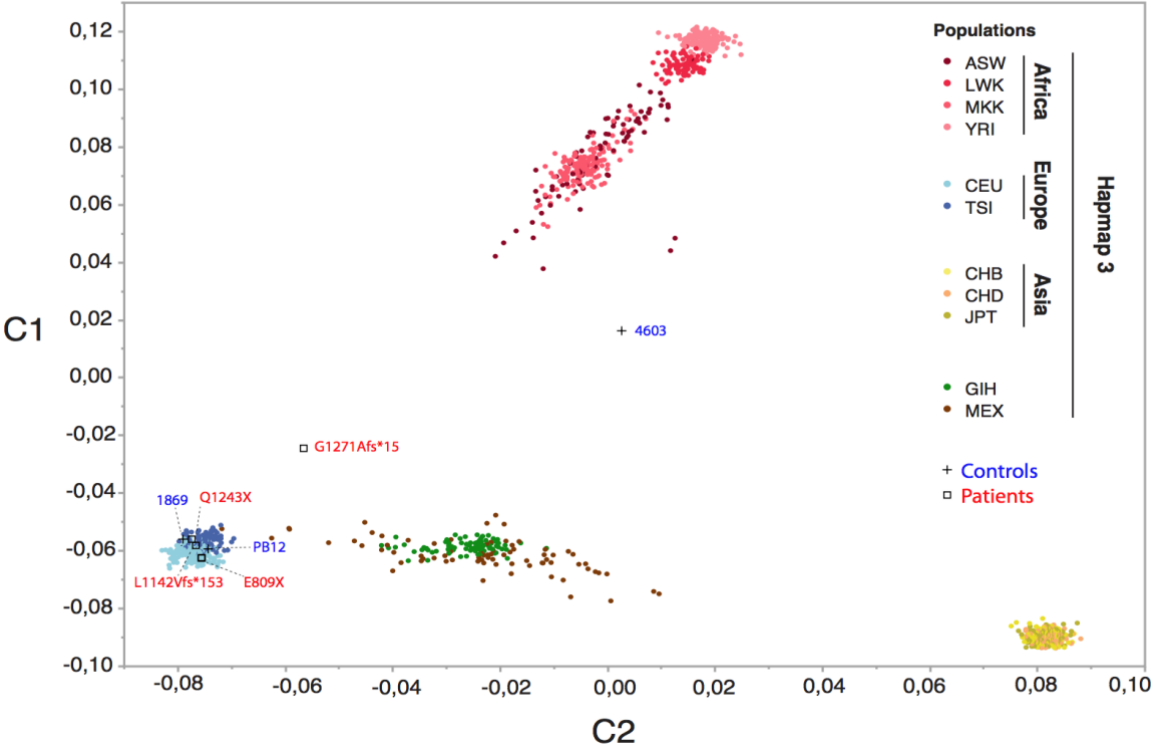
Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, C., Zaleski, C., Jha, S., et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, **29**, 15-21 (2013).

Eisenberg, E., and Levanon, E.Y. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* **10**, 569-74 (2013).

Love, M.I., Huber, W., Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. **15**(12):550 (2014).

Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, (2009).

Figure S6: Multi-Dimensional Scale Analysis of the genetic distance between individuals of HapMap3 populations and the cohort of control individuals and patients from our study



Legend to Figure S6: Each dot represents a single individual. The distance between two dots represents the genetic distances. As described in Materials and Methods, the stratification was performed using PLINK and 17K SNPs overlapping from genotyping data of HapMap3 populations (Illumina Human1M and Affymetrix SNP 6.0) and the cohort of controls and patients (Illumina Infinium Omni1/2.5; 1M/2.5M SNPs) and Illumina Infinium Humancore24 (300K SNPs).

Table S1: Nucleotide sequence of primers used for PCR and Sanger sequencing

Forward		Reverse		Size
21-AF	TGTA AACGACGGCCAGT TTTGTG TCCGGACGGTGGCTTCC	21-AR	GGATAACAATTCACACAGGAC GGAGCGAAGAGGCTGGCGTGAA	634
21-AF'	TGTA AACGACGGCCAGT agacatcgagacgcagact			
21-BF	TGTA AACGACGGCCAGT GCGCTCCATGATCATCCTGCA	21-BR	GGATAACAATTCACACAGGAC TTTGCCGGTGAGTGGGTGGA	634
21-CF	TGTA AACGACGGCCAGT GCGGATCTGCCATCCCTACAGC	21-CR	GGATAACAATTCACACAGGAC CACAGCCGCTGACTGCATGG	618
21-DF	TGTA AACGACGGCCAGT GCTGGCCTCATCGTTGTGCACGCCA	21-DR	GGATAACAATTCACACAGGAC TTGGGAGGCACTGGTGGCTTCTCGA	626
21-EF	TGTA AACGACGGCCAGT AGGCTGACACACGCAGCTCC	21-ER	GGATAACAATTCACACAGGAC AGGCCAAGCAAGACCGGATTGAG	698

Legend to Supplementary Table S1: Nucleotide sequence of primers used for PCR and Sanger sequencing. Five sets of primers were used to cover the whole sequence of exon 21. Primers were linked to the M13 adaptor sequence (red characters). Three sets of primers (duos B, C and D) were used for genomic DNA and cDNA amplification. Set A and E were not used for cDNA since AF and ER were located in intronic regions. Sequencing was performed using M13 sequences as primers.

Table S2: Commercial antibodies used for immunofluorescence labeling

	HOST	REFERENCE	SUPPLIER	DILUTION
Primary Antibodies				
Synapsin	Rabbit	ab1543	Millipore	1/1000
VGlut1	Rabbit	135303	Synaptic System	1/1000
Pan SHANK	Mouse	MABN24	Millipore	1/500
BetaIII tubulin	Chicken	ab9354	Millipore	1/1000
GFAP	Rabbit	ab7260	Abcam	1/1000
MAP2	Mouse	MAB 3418	Millipore	1/200
PSD95	Rabbit	ab18258	Abcam	1/1000
Secondary Antibodies				
Anti mouse Alexa 488	Chicken	A21200	Invitrogen	1/200
Anti mouse Alexa 594	Goat	A11005	Invitrogen	1/200
Anti rabbit Alexa 488	Rabbit	A11034	Invitrogen	1/200
Anti chicken Alexa 546	Goat	A11040	Invitrogen	1/200


Table S3: List of compounds and Materials used for RT-ddPCR

Primers				
Primers	Forward	Probe	Reverse	Reference
Shank3 Exon 2-3 HEX Home-Made design	GCAAGTTCCTGGATGAGGAG	CCTGCCCTACCTGGAGTTTC	CATAAACTCGCGCTTGTATC	10031279 (Biorad)
Shank3 Exon 2-3 FAM Home-Made design	CTGGGGGAGGAACCAGTTG	CTGGACCCTGCCAAGAAGT	CACCGAGGCTGCTGAAGAG	10031276 (Biorad)
Shank3 Exon 8-9 HEX Biorad design	NA	NA	NA	10031255 (Biorad) dHsaCPE5058813
Shank3 Exon 8-9 FAM Biorad design	NA	NA	NA	10031252 (Biorad) dHsaCPE5058812
Shank3 Exon 21-22 HEX Home-Made design	CTGGGGGAGGAACCAGTTG	CTGGACCCTGCCAAGAAGT	CACCGAGGCTGCTGAAGAG	10031279 (Biorad)
Shank3 Exon 21-22 FAM Home-Made design	CTGGGGGAGGAACCAGTTG	CTGGACCCTGCCAAGAAGT	CACCGAGGCTGCTGAAGAG	10031276 (Biorad)
GAPDH HEX Biorad design	NA	NA	NA	10031255 (Biorad) dHsaCPE5031597
GAPDH FAM Biorad design	NA	NA	NA	10031252 (Biorad) dHsaCPE5031596

Table S3 (cont.)

Products	
Products	Reference
ddPCR Supermix for probes no UTP	186-3025 BioRad
DG8TMCartridges for QX100 TM/QX200 TM Droplet Generator	186-4008 Biorad
Droplet Generator DG8 TM Gasket	1863009 Biorad
Droplet Generator DG8 TM Cartridge Holder	1863051 BioRad
Droplet Generator Oil for Probe	186-3005 Biorad
twin.tec PCR Plate 96, semi skirted	951020320 eppendorf
QX200™ Droplet Generator	1864002 BioRad
QX200™ Droplet Reader	1864003 BioRad
QuantaSoft™ Software Regulatory edition	1864011 BioRad


Induced pluripotent stem cells as a tool to study brain circuits in autism-related disorders

Aline Vitrac^{1,2,3} and Isabelle Cloëz-Tayarani^{1,2,3} 

¹Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France
¹Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

²CNRS UMR 3571, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris, France

³Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Human Genetics and Cognitive Functions, 25 rue du Docteur Roux, Paris, France

 Corresponding author

REVIEW

Open Access



Induced pluripotent stem cells as a tool to study brain circuits in autism-related disorders

Aline Vitrac^{1,2,3} and Isabelle Cloëz-Tayarani^{1,2,3*}

Abstract

The mammalian brain is a very complex organ containing an estimated 200 billion cells in humans. Therefore, studying human brain development has become very challenging given all the data that are available from different approaches, notably genetic studies.

Recent pluripotent stem cell methods have given rise to the possibility of modeling neurodevelopmental diseases associated with genetic defects. Fibroblasts from patients have been reprogrammed into pluripotent stem cells to derive appropriate neuronal lineages. They specifically include different subtypes of cortical neurons that are at the core of human-specific cognitive abilities. The use of neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) has led to deciphering convergent and pleiotropic neuronal synaptic phenotypes found in neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorders (ASD) and their associated syndromes. In addition to these initial studies, remarkable progress has been made in the field of stem cells, with the major objective of reproducing the *in vivo* maturation steps of human neurons. Recently, several studies have demonstrated the ability of human progenitors to respond to guidance cues and signals *in vivo* that can direct neurons to their appropriate sites of differentiation where they become fully mature neurons.

We provide a brief overview on research using human iPSC in ASD and associated syndromes and on the current understanding of new theories using the re-implantation of neural precursors in mouse brain.

Keywords: Human induced pluripotent stem cells, Autism, Developmental disorders, Transplantation, Brain circuits

Background

The use of induced pluripotent stem cells (iPSC) has provided new opportunities for analyzing brain development and the consequences of its dysfunctions in neurodevelopmental disorders. The iPSC approach has been particularly useful for neurodevelopmental diseases for which major genes are considered responsible. One important aspect resides in the fact that the reprogrammed iPSC studied so far carry single genetic deficits which were initially identified in the genomes of patients. This is the case for autism spectrum disorders (ASD) and their related disorders, which include Rett syndrome, Timothy syndrome, fragile X syndrome, and Phelan-McDermid syndrome

(PMS). Causative genes are mostly related to synaptic functions. Among others, traditional approaches include large-scale genomic data analysis and engineered animal models [1–3]. The discovery of human iPSC has enabled the analysis of neuronal phenotypes after the derivation of patients' somatic cells into neurons. One limitation of such an *in vitro* approach is the inability to grow the cells for periods long enough to reproduce the postnatal development and maturation of human iPSC-derived neurons. Alternative techniques are based on the use of neural progenitors that are patterned after their re-implantation in mouse brain to undergo differentiation via specific neural pathways *in vivo*.

* Correspondence: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr

¹Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

²CNRS UMR 3571, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



In vitro use of human iPSC-derived neurons in neurodevelopmental disorders: the case of syndromic and non-syndromic forms of ASD

A common understanding of the pathogenesis of neurodevelopmental disorders, including ASD, has still not been achieved. This remains an important issue, as it is a prerequisite for the development of pharmacological drugs for the treatment of the core symptoms of such disorders. Reprogramming of iPSC from patients into neuronal cell types was first used to further elucidate the phenotypes related to pathologies such as Alzheimer's disease [4], Parkinson's disease [5], epilepsy [6], and schizophrenia [7, 8]. Peripheral neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis [9] have also been investigated. For all these pathological conditions, human iPSC have been reprogrammed into selective neuronal cell types by considering the neuronal phenotypes that are damaged as predicted by available animal models and clinical investigations in patients. The iPSC model has enabled further insights into the cellular and molecular mechanisms that are affected during brain development. This model was first developed in the case of monogenic diseases such as Rett syndrome, fragile X syndrome, Timothy syndrome, PMS, and various forms of schizophrenia that display symptoms in common with ASD. The common features between such monogenic diseases and ASD include cognitive dysfunctions with mental retardation and dysmorphia. Other features comprise epilepsy (atypical forms of Rett syndrome), cardiac dysfunction (Timothy syndrome), motor coordination, and sensorial hypersensitivity (fragile X syndrome). Studies using iPSC technology have been focused both on neural progenitors and on mature neurons derived mostly from the fibroblasts (or less often from blood) of patients. The identification of phenotypes in human iPSC-derived neurons was first studied in four syndromic forms of ASD with well-known identified causal genes.

Rett syndrome is a severe X-linked neurodevelopmental disorder. The main form of this disorder is characterized by defects in the *MECP2* gene coding for the transcriptional regulator methyl CpG binding protein 2, which is expressed in a wide variety of tissues, including the brain. The most extensive work using the iPSC model has been devoted to Rett syndrome, with the phenotypic characterization of these cell lines obtained from patients' fibroblasts. Decreased cell soma size and neurogenesis [10], reduced expression of the adhesion molecule L1 [10], and synaptic alterations [11, 12] have been observed by using this model, supporting the expected defects in neuronal connectivity.

Timothy syndrome is a very rare autosomal dominant disorder which results from mutations in the *CACNA1C* gene coding for the alpha-1 subunit of the L-type voltage-gated calcium channel Cav1.2. To date, only a

few studies have analyzed the neuronal phenotypes of human iPSC-derived neurons, which have shown specific alterations in calcium signaling [13] and dendritic plasticity [14]. One of the initial studies reported a reduced number of cells expressing the DNA-binding protein SATB2 [15]. *Satb2* regulates the fate of upper and deeper layers of cortical neurons as shown in mouse brain models [16]. It is therefore reasonable to suggest the existence of deleterious effects on neural development which are due to altered calcium signaling in parallel with the absence of SATB2 protein, and more specifically on cortico-cortical connections. Nevertheless, it should be noted that in vitro developmental neuronal patterns differ from in vivo ones, especially when the deleterious mutations target pleiotropic genes, such as *CACNA1C*, that coordinate organ functions in a non-independent manner.

PMS is a neurodevelopmental disorder strongly associated with ASD that is caused by a deletion of the *SHANK3* gene at the 22q13 locus, identified as a 22q13 deletion syndrome. Shcheglovitov and colleagues [17] used iPSC-derived cortical neurons from two patients and observed significant deficits in the excitatory transmission of reprogrammed neurons which were rescued by IGF1 exposure.

Fragile X syndrome is considered as one of the most common cause of syndromic ASD. This syndrome results from an expansion of a CGG repeat within the fragile X mental retardation 1 (*FMR1*) gene on the X chromosome. This gene is required for neuronal development and a deficiency in its corresponding protein leads to altered neuronal connectivity. It has been difficult so far to find a model to study this syndrome using iPSC technology. The more recent study by Doers and colleagues [18] clearly demonstrates reduced neurite outgrowth in neurons from patients. Reduced neurite outgrowth may alter axonal growth as well as the differentiation of presynaptic and postsynaptic components, and consequently may lead to alteration of short-range and long-range neuronal connectivity.

ASD are neurodevelopmental disorders characterized by deficits in social cognition, communication, and behavior as well as moderate to severe mental retardation. ASD have a complex genetic basis, with hundreds of identified candidate genes which cannot be individually responsible for ASD clinical features and cellular phenotypes. This complexity has led to considerable effort to identify functional pathways that may reveal cellular connections between the candidate genes. Among these, the glutamatergic pathway includes genes that, once mutated, are thought to be responsible for both syndromic and non-syndromic ASD [19]. Indeed, ASD present with alterations in the brain cortex and its development and morphological organization and the brain's short-range

and long-range connectivity [20]. For example, an abnormal connectivity between the cerebellum and the entire cerebral cortex has recently been shown using fMRI brain imaging [21]. The development and maintenance of neuronal networks depend on differentiation of neurons and axonal outgrowth as well as dendrite branching. We have shown that these processes are controlled differently by cell-adhesion molecules such as contactin 4 (CNTN4), contactin 5 (CNTN5), and contactin 6 (CNTN6) proteins [22]. Among the genes which code for CNTN4–6, we have demonstrated that *CNTN6* is a susceptibility gene for ASD [23]. Alterations in the formation of neural networks that are controlled by CNTN6 may underlie the cognitive, sensory, and motor deficits that we observe in autistic patients carrying *CNTN6* coding variants [22].

Modeling shankopathies using human iPSC-derived neurons

Among the mutated genes in ASD, the *SHANK* genes offer one of the best possibilities to explore the core symptoms of these disorders by analyzing the cellular defects that are associated with mutations in them. The major *SHANK* family genes involved in ASD include *SHANK1*, *SHANK2*, and *SHANK3*. *SHANK* genes encode scaffolding proteins present at the postsynaptic density of excitatory synapses. The first report on specific *SHANK3* mutations was provided by our laboratory [24]. Further investigations have clearly demonstrated the role of all *SHANK* genes in ASD [1]. The involvement of *SHANK3* as a causal gene in ASD was observed in 0.7% of patients in large cohorts, with different types of mutations including microdeletions, point mutations, and stop mutations [1]. *SHANK3* is also associated with behavioral phenotypes of the 22q13 deletion syndrome [25, 26]. Human iPSC have been generated from patients with heterozygous deletions of chromosome 22q13.3. Derived neurons displayed reduced *SHANK3* expression and major defects in their excitatory but not inhibitory synaptic transmission [17]. These findings strongly suggest that a disruption of the excitatory/inhibitory balance occurs in the brain of patients with PMS. Kathuria and colleagues [27] differentiated iPSC from two patients with ASD carrying microdeletions of *SHANK3* into either cortical or olfactory placodal neurons. These authors showed that placodal neurons had a reduced number of synapses compared with control neurons. The young postmitotic neurons also had reduced cell bodies with higher neuronal arborization. These two developmental phenotypes were specific to placodal neurons and were not observed in iPSC-derived cortical neurons. The morphogenetic deficits were rescued by genome editing techniques [27]. The iPSC model has also been used in patients with ASD presenting de novo

point truncating mutations in the *SHANK3* gene; under the experimental conditions, pyramidal excitatory neurons accounted for more than 80% of cortical neurons [28]. In a subsequent study and under similar experimental conditions, these authors were able to evaluate and reverse the neuronal dysfunctions in two individuals with de novo point mutations in the *SHANK3* gene [29], namely decreased neurite length and branching and spontaneous calcium oscillations. In addition, the authors found that lithium as well as valproic acid and fluoxetine increased the *SHANK3* mRNA and protein levels in a concentration-dependent manner [29]. *SHANK3* is expressed at neuronal excitatory synapses and forms protein complexes [30] which may contribute to ASD phenotypes when they are broken up. *SHANK3* interactomes are expressed at single-spine level [31], which also receive neuronal excitation inputs. For the analysis of spine densities, most studies using animal models have been performed in two dimensions, which may not totally reflect the asymmetric morphology of diverse spine categories. Regarding ASD and human iPSC models, none of the published data have so far described a quantitative analysis of spinogenesis in patients with *SHANK3* mutations. Using the same protocol and human iPSC lines described by Darville and colleagues [29], we established a method which allows the quantification of spine morphology in three dimensions [32]. The shape of dendritic spines and volume vary according to the stage of their maturation. Mature spines are usually characterized by a larger head and a thin neck, whereas immature spines are thinner with a poorly defined head with small postsynaptic densities. We found the latter category to be predominant in human iPSC-derived pyramidal neurons from individuals without ASD-related disorders (unpublished observations). We are undertaking an extensive analysis of spinogenesis in a subset of patients carrying different de novo *SHANK3* point mutations to evaluate the inter-individual variability. This aspect is still lacking so far, since most studies have been conducted using cells reprogrammed from a few patients only.

Main pitfalls using human iPSC cells in vitro

iPSC culture systems can offer an almost unlimited source of neurons for fundamental research on the first stages of neural development and for pharmacological screening. However, this model presents some limitations. Indeed, reprogramming of somatic cells through the expression of the four Yamanaka transcription factors, *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, and *cMYC*, has been shown to be asynchronous and have low efficiency. The rate of cell reprogramming also depends on donor cell types and culture conditions [33]. Different models have been proposed to analyze the reprogramming processes and the roles of transcription factors and epigenetic regulators

[34]. To circumvent these problems, various methods have been developed in order to study reprogramming dynamics under more unified frameworks [35]. Alternative reprogramming protocols have also been proposed that are based on the use of synthetic capped mRNAs containing modified nucleobases (mod-mRNA) [36]. However, these methods do not seem to be efficient enough for the accurate reprogramming of human primary fibroblasts. A new, optimized method [37] which combines mod-mRNA with reprogramming factors together with improved cell culture conditions is encouraging and seems to provide an alternative approach for reprogramming of human fibroblasts in the case of ASD and related syndromes. New protocols have also been developed for improving the differentiation and maturation of iPSC-derived neurons [38].

When analyzing data from human iPSC-derived neurons in vitro, focusing on two-dimensional cell cultures often derived from one single cell type at a time may lead to an underestimation of cellular defects. For example, recent findings using the human iPSC model clearly indicate that astrocytes play important role in synaptogenesis and neuronal morphology [39]. The low efficiency of cell reprogramming observed so far has rendered the simultaneous derivation of distinct isogenic cell types from the same human iPSC much more difficult. The co-culture of several isogenic cell types, including distinct neuronal and microglial cells, would represent a significant improvement for studying ASD and its related disorders.

Finally, in vitro systems do not allow the reproduction of global cellular homeostasis and cell orientation and projections within the distinct cortical layers. It is also not clear to what extent the immature neurons that are produced in vitro recapitulate the diverse steps of neurogenesis. Interestingly, Imaizumi and colleagues [40] developed specific culture systems to control the identity of derived neuronal cells along the anteroposterior and dorsoventral axes. New protocols including three-dimensional culture systems [41] and brain organoids [42, 43] have been developed for iPSC models. Brain organoids consist of cellular aggregates derived from human embryonic stem cells (ESC) and iPSC. They may represent new in vitro systems with an oriented cell organization. Depending on the cell line and the number of passages, however, the brain organoids can be variable. Consequently, the development of brain organoids remains a challenging process due to the complexity of neuronal phenotypes and circuitry. So far, no method can provide a full reproduction of the phenotypic brain environment in vivo and the exact characteristics of developmental disorders due to the absence of a wide variety of conditions, including vascularization, nutrients, and specific developmental cues and

signals. Human brain organoids are reviewed elsewhere in more detail [44, 45].

Reconstruction of brain circuitry using neural transplants generated from iPSC

As discussed above, the main features of brain cortical development cannot be reproduced using in vitro models. Neurodevelopmental disorders are currently associated with cognitive dysfunctions, with the neocortex underlying high cognitive functions in humans. For this reason, cortical neuronal subtypes such as pyramidal glutamatergic cells have been predominantly used in vitro [15, 17, 28, 29, 46].

For neurodevelopmental disorders, including ASD, defects in neuronal connectivity have been associated with increased local and reduced long-range connectivity as discussed above. One interesting aspect is the fact that an early neurodevelopmental dysfunction in single subcortical regions may modify the cerebral networks underlying early sensory-motor impairments and social deficits, including those observed in ASD [47]. The reconstruction of brain circuitry can be partially achieved by transplantation of human neurons generated from iPSC into mouse brain [48–52]. Since the early studies, significant progress has been made. Espuny-Camacho and colleagues [48] showed that ESC and iPSC can recapitulate corticogenesis and lead to sequential generation of functional pyramidal cells when grafted into mouse brain in vivo. In addition, these authors have demonstrated that, with regard to differentiation and connectivity, transplanted cells extend their ramifications over several months and constitute functional synapses with the host neuronal circuits [48]. Transplantation of neural precursors in mouse brain can be performed without a preliminary period of in vitro culture to allow cells to fully differentiate. Under such conditions, a post-characterization of cell phenotypes is necessary to clearly identify neurons from other iPSC-derived cells, such as oligodendrocytes and astrocytes. One key aspect resides in the fact that cortical pyramidal neurons derived from mouse or human iPSC follow species-specific maturation processes after their transplantation into mouse brain. Michelson and colleagues [49] also demonstrated that maturation of human ESC/iPSC takes 9 months post-transplantation and maintains the chronology of developmental steps for a given species. Using a similar approach, these authors derived neurons from mouse ESC in vitro which could be identified as those from visual cortex. The resulting neurons were then transplanted successfully into lesioned adult mouse visual cortex [49]. A possible rescue of the damaged pathways, including long-range and reciprocal axonal projections with appropriate synapses, was also observed [49]. Moreover, electrophysiological recordings were used to show that grafted neurons were

responsive to visual stimuli [49]. Such an approach has not been tested with human iPSC. Nagashima and colleagues [50] developed a method consisting of an in utero transplantation system of pluripotent ESC based on a mild dissociation of adherens junctions in neuroepithelial tissue. Transplanted cells migrated from the subventricular zone to the cortical plate and, after only several days, presented the morphology of immature pyramidal cells [50]. To our knowledge, this method has

not yet been used for the iPSC model. In their recent study, Falkner and colleagues [51] used chronic in vivo two-photon imaging to study the integration of mouse transplanted neurons into existing circuits of the mouse visual cortex [51]. After 2–3 months, the transplanted neurons were fully integrated, with functional properties indistinguishable from those of the pre-existing neuronal networks [51]. Functional imaging of grafted neurons into mouse brain represents an advantage compared to

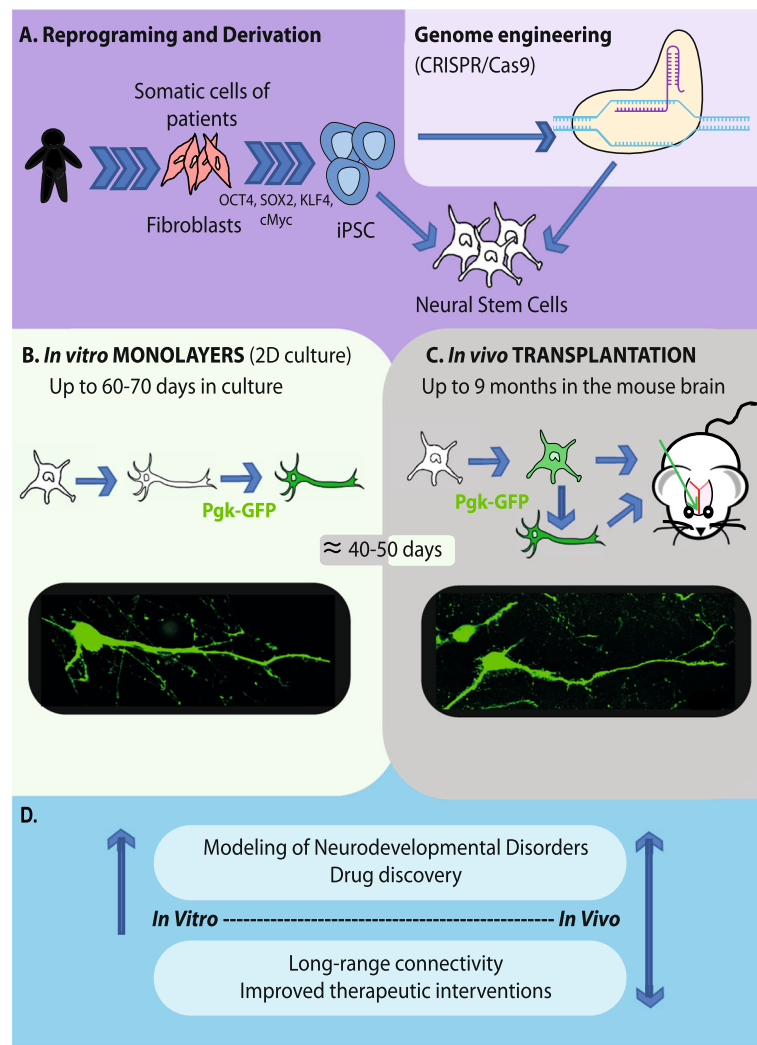


Fig. 1 Main experimental designs for human iPSC models of monogenic neurodevelopmental disorders. **a** Patient’s specific iPSC are derived from fibroblasts using the four Yamanaka’s factors. Genome engineering using the CRISPR/Cas9 method allows the reversion of phenotypic defects by re-introducing the wild-type allele into the genome of iPSC lines. The CRISPR/Cas9 method also allows introduction of the mutation under study directly into the genome of control iPSC lines in order to compare visually similar phenotypes to those seen in the iPSC from patients. Both non-edited and isogenic iPSC are differentiated into the affected neuronal subtypes, mostly pyramidal cortical neurons in the case of cognitive disorders. **b** Viable neurons can be maintained in culture up to 70 days after the differentiation of neural stem cells (NSC). The transduction of neuronal cells with a green fluorescent protein (GFP)-lentivirus allows their visualization and phenotypic characterization using fluorescence microscopy. A GFP-labeled pyramidal neuron 40-45 days after the differentiation of NSC. **c** Neuronal precursors or neurons fully differentiated in vitro are transplanted into the brain of mouse neonates. The visualization of fluorescent neurons is done using fluorescent microscopy on brain slices. A transplanted GFP-labeled pyramidal neuron is illustrated at 40–50 days post-injection (picture from our experiments). Mice are maintained up to 9 months of age after grafting. **d** Comparative information and main therapeutics perspectives provided by the use of iPSC-derived neurons in vitro vs in vivo

anatomical methods. This approach has not yet been used in the case of human neurons derived from patients with neurodevelopmental disorders. Figure 1 illustrates disease modeling using both in vitro and in vivo human iPSC models, independently or in a complementary manner. Figure 1 also represents the possible introduction of a genetic mutation by genome editing techniques such as CRISPR/Cas9 [53, 54] and/or the reversion of cellular phenotypic alterations found in monogenic disorders. The recent work by Wuttke and colleagues [52] is promising. Using an optogenetics-based electrophysiology approach, these authors demonstrated that developmentally “primed” cortical neurons can maintain their precise pattern of differentiation and regional connectivity after transplantation, with the development of appropriate long-distance projections and synapses. Reconstruction of the neonatal circuitry may be possible by the micro-transplantation of primed cortical neurons. Finally, methods for volume imaging of optically transparent brain tissues should offer new possibilities for the analysis of brain circuits.

The recent work by Mansour and colleagues is quite [54] promising. These authors have developed a method which consists of grafting human brain organoids into the adult mouse brain. They observed vascularized and functional intra-graft neuronal networks as well as graft-to-host synaptic connectivity. Together with ongoing technological improvements [45], grafting human brain organoids into mouse brain should represent an accurate alternative method to model a wide range of neurodevelopmental disorders, including ASD.

Conclusions

The effective integration of transplanted cells that mature into neuronal subtypes together with appropriate long-range connectivity within critical regions such as brain cortex should allow the functional reconstruction of cortical circuitry over time. In addition, advances in genome editing technologies allow the genetic manipulation of iPSC in a site-specific manner. Combined with a circuit level analysis, such approaches should provide new plausible models to study human neurodevelopmental diseases and additional opportunities for future drug development.

Abbreviations

ASD: Autism spectrum disorders; CNTN: Contactin; ESC: Embryonic stem cell; GFP: Green fluorescent protein; iPSC: Induced pluripotent stem cell; NSC: Neural stem cell; PMS: Phelan-McDermid syndrome

Acknowledgements

Data in Fig. 1 used samples from the NINDS Human Genetics Resource Center DNA and Cell Line Repository; NINDS repository sample numbers corresponding to the samples used are GM01869 and GM04603.

Funding

The French Ministry of Education provided the funding for AV's PhDs.

Authors' contributions

AV and ICT were responsible for conceptualization of the review article. AV designed the figure. AV and ICT wrote the manuscript and ICT finalized the manuscript. Both authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

The graphic figure in this article is original and is subject to the copyright policy of the journal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. ²CNRS UMR 3571, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris, France. ³Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Human Genetics and Cognitive Functions, 25 rue du Docteur Roux, Paris, France.

Published online: 23 August 2018


References

- Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, et al. Meta-analysis of *SHANK* mutations in autism Spectrum disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004580.
- Huguet G, Benabou M, Bourgeron T. The genetics of autism spectrum disorders. In: Sassone-Corsi P, Christen Y, editors. *A time for metabolism and hormones*; 2016. p. 101–29.
- Ferhat AT, Halbedl S, Schmeisser MJ, Kas MJ, Bourgeron T, Ey E. Behavioural phenotypes and neural circuit dysfunctions in mouse models of autism Spectrum disorder. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017;224:85–101.
- Lee HK, Velazquez Sanchez C, Chen M, Morin PJ, Wells JM, Hanlon EB, et al. Three dimensional human neuro-spheroid model of Alzheimer's disease based on differentiated induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2016;11:e0163072.
- Fernandez-Santiago R, Carballo-Carbajal I, Castellano G, Torrent R, Richaud Y, Sanchez-Danes A, et al. Aberrant epigenome in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients. *EMBO Mol Med.* 2015;7:1529–46.
- Parent JM, Anderson SA. Reprogramming patient-derived cells to study the epilepsies. *Nat Neurosci.* 2015;18(3):360–66. <https://doi.org/10.1038/nn.3944>.
- Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, et al. Synaptic dysregulation in a human iPSC cell model of mental disorders. *Nature.* 2015; 515:414–8.
- Wright R, Réthelyi JM, Gage FH. Enhancing induced pluripotent stem cell models of schizophrenia. *JAMA Psychiatry.* 2014;71:334–5.
- Jaiswal MK. Therapeutic opportunities and challenges of induced pluripotent stem cells-derived motor neurons for treatment of amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron disease. *Neural Regeneration Research.* 2017;12:723–736. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.206635>.
- Yoo M, Carroumeu C, Kwon O, Muotri A, Schachner M. Biochemical and biophysical research communications the L1 adhesion molecule normalizes neuritogenesis in Rett syndrome-derived neural precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;494:504–10.
- Marchetto MCN, Carroumeu C, Acab A, Yu D, Yeo G, Mu Y, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell.* 2010;143:527–39.
- Patriarchi T, Amabile S, Frullanti E, Landucci E, Lo Rizzo C, Ariani F, et al. Imbalance of excitatory/inhibitory synaptic protein expression in iPSC-derived neurons from FOXG1 patients and in foxg1 mice. *Eur J Hum Genet.* 2016;24:871–80.
- Tian Y, Voineagu I, Paşca SP, Won H, Chandran V, Horvath S, et al. Alteration in basal and depolarization induced transcriptional network in iPSC derived neurons from Timothy syndrome. *Genome Med.* 2014;6:1–16.

14. Krey JF, Paşca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, Rasmusson R, et al. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci.* 2013;16:201–9.
15. Paşca SP, Portmann T, Voineagu I, Yazawa M, Shcheglovitov A, Paşca AM, et al. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat Med.* 2011;17:1657–62.
16. Leone DP, Heavner WE, Ferenczi EA, Dobрева G, Huguenaud JR, Grosschedl R, et al. *Satb2* regulates the differentiation of both callosal and subcerebral projection neurons in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 2015;25:3406–19.
17. Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, Portmann T, Shu R, Sebastiano V, et al. *SHANK3* and *IGF1* restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature.* 2013;503:267–71.
18. Doers ME, Musser MT, Nichol R, Berndt ER, Baker M, Gomez TM, et al. iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem Cells Dev.* 2014;23:1777–87.
19. Rojas DC. The role of glutamate and its receptors in autism and the use of glutamate receptor antagonists in treatment. *J Neural Transm.* 2014;121:891–905.
20. Khan S, Gramfort A, Shetty NR, Kitzbichler MG, Ganesan S, Moran JM, et al. Local and long-range functional connectivity is reduced in concert in autism spectrum disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:3107–12.
21. Khan AJ, Nair A, Keown CL, Datko MC, Lincoln AJ, Müller RA. Cerebro-cerebellar resting-state functional connectivity in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry.* 2015;78:625–34.
22. Mercati O, Danckaert A, Andre-Leroux G, Bellinzoni M, Gouder L, Watanabe K, et al. *Contactin 4*, *-5* and *-6* differentially regulate neurogenesis while they display identical PTPRG binding sites. *Biol Open.* 2013;2:324–34.
23. Mercati O, Huguot G, Danckaert A, André-Leroux G, Maruani A, Bellinzoni M, et al. *CNTN6* mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry.* 2016;22:625–33.
24. Bourgeron T. Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *C R Biol.* 2016;339:300–7.
25. Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Buxbaum JD. Phelan McDermid syndrome: from genetic discoveries to animal models and treatments. *J Child Neurol.* 2015;30:1861–70.
26. Tabet AC, Rolland T, Ducloy M, Lévy J, Buratti J, Mathieu A, et al. A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. *NPJ Genomic Med.* 2017;2:32.
27. Kathuria A, Nowosiad P, Jagasia R, Aigner S, Taylor RD, Andraea LC, et al. Stem cell-derived neurons from autistic individuals with *SHANK3* mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Mol Psychiatry.* 2017;23:735–46.
28. Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, Julita E, Delorme R, 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. *Transl Psychiatry.* 2013;3:e294.
29. Darville H, Poulet A, Rodet-Amsellem F, Chatrousse L, Pernelle J, Boissart C, et al. Human pluripotent stem cell-derived cortical neurons for high throughput medication screening in autism: a proof of concept study in *SHANK3* Haploinsufficiency syndrome. *EBioMedicine.* 2016;9:293–305.
30. Lee Y, Kang H, Lee B, Zhang Y, Kim Y, Kim S, et al. Integrative analysis of brain region-specific *Shank3* interactomes for understanding the heterogeneity of neuronal pathophysiology related to *SHANK3* mutations. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:1–13.
31. Sarowar T, Grabrucker AM. Actin-dependent alterations of dendritic spine morphology in Shankopathies. *Neural Plast.* 2016;2016:8051861.
32. Gouder L, Tinevez J-Y, Goubran-Botros H, Benchoua A, Bourgeron T, Cloëz-Tayarani I. Three-dimensional quantification of dendritic spines from pyramidal neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp.* 2015;(104):1–8. <https://doi.org/10.3791/53197>. <https://www.jove.com/video/53197/three-dimensional-quantification-dendritic-spines-from-pyramidal>.
33. Nefzger CM, Rossello FJ, Chen J, Liu X, Knaupp AS, Firas J, et al. Cell type of origin dictates the route to pluripotency. *Cell Rep.* 2017;21:2649–60.
34. Theunissen TW, Jaenisch R. Molecular control of induced pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2014;14:720–34.
35. Liu LL, Brumbaugh J, Bar-Nur O, Smith Z, Stadtfeld M, Meissner A, et al. Probabilistic modeling of reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 2016;25:3395–406.
36. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y, Li H, Daley Q, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010;7:618–30.
37. Kogut I, McCarthy SM, Pavlova M, Astling DP, Chen X, Jakimenko A, et al. High-efficiency RNA-based reprogramming of human primary fibroblasts. *Nat Commun.* 2018;9:745.
38. Gunhanlar N, Shpak G, van der Kroeg M, Gouty-Colomer LA, Munshi ST, Lendemeijer B, et al. A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells. *Mol Psychiatry.* 2018;23:1336–44.
39. Russo FB, Freitas BC, Pignatari GC, Fernandes IR, Sebat J, Muotri AR, et al. Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. *Biol Psychiatry.* 2017;83:569–78.
40. Imaizumi K, Sone T, Ibata K, Fujimori K, Yuzaki M, Akamatsu W, et al. Controlling the regional identity of hPSC-derived neurons to uncover neuronal subtype specificity of neurological disease phenotypes. *Stem Cell Rep.* 2015;5:1010–22.
41. Park J, Wetzel I, Marriotti I, Dréau D, D'Avanzo C, Kim DY, et al. A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2018;21:941–51.
42. Paşca AM, Sloan SA, Clarke LE, Tian Y, Makinson CD, Huber N, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods.* 2015;12:671–8.
43. Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, et al. Assembly of functional forebrain spheroids from human pluripotent cells. *Nature.* 2017;545:54–9.
44. Heide M, Huttner WB, Mora-Bermúdez F. Brain organoids as models to study human neocortex development and evolution. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;55:8–16.
45. Wang H. Modeling neurological diseases with human brain organoids. *Front Synaptic Neurosci.* 2018;10:1–14.
46. Chailangkarn T, Muotri AR. Modeling Williams syndrome with induced pluripotent stem cells. *Neurogenesis.* 2017;4:e1283187.
47. Piven J, Elison JT, Zylka MJ. Toward a conceptual framework for early brain and behavior development in autism. *Mol Psychiatry.* 2017;22:1385–94.
48. Espuny-Camacho I, Michelsen K a, Gall D, Linaro D, Hasche A, Bonnefont J, et al. Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits. *In Vivo Neuron.* 2013;77:440–56.
49. Michelsen KA, Acosta-Verdugo S, Benoit-Marand M, Espuny-Camacho I, Gaspard N, Saha B, et al. Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Neuron.* 2015;85:982–97.
50. Nagashima F, Suzuki IK, Shitamukai A, Sakaguchi H, Iwashita M, Kobayashi T, et al. Novel and robust transplantation reveals the acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2014;23:2129–42.
51. Falkner S, Grade S, Dimou L, Conzelmann KK, Bonhoeffer T, Götz M, et al. Transplanted embryonic neurons integrate into adult neocortical circuits. *Nature.* 2016;539:248–53.
52. Wuttke TV, Markopoulos F, Padmanabhan H, Wheeler AP. Developmentally primed cortical neurons maintain fidelity of differentiation and establish appropriate functional connectivity after transplantation. *Nat Neurosci.* 2018; 21:517–29.
53. Park CY, Halevy T, Lee DR, Sung JJ, Lee JS, Yanuka O, et al. Reversion of *FMR1* methylation and silencing by editing the triplet repeats in fragile X iPSC-derived neurons. *Cell Rep.* 2015;13:234–41.
54. Mansour AA, Goncalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, Johnston S, Parylak SL, Jin X, Gage FH. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nature Biotechnology.* 2018;36:432–441.

Article 2


A chimeric mouse model to study human iPSC-derived neurons: the case of a truncating *SHANK3* mutation

Aline Vitrac ¹, Stéphanie Pons ², Marta Balkota ², Nathalie Lemièrè ¹, Célia Raïs ^{2,3}, Jean-Pierre Bourgeois ¹, Uwe Maskos ², Thomas Bourgeron ¹ and Isabelle Cloëz-Tayarani ² 

¹ Human Genetics and Cognitive Functions, CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Université de Paris, Institut Pasteur, Paris, France.

² Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Institut Pasteur, Paris, France.

³ Collège Doctoral, Sorbonne Université, Paris, France.

Correspondence and requests for materials should be addressed to I.C.-T. (email: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr)



OPEN

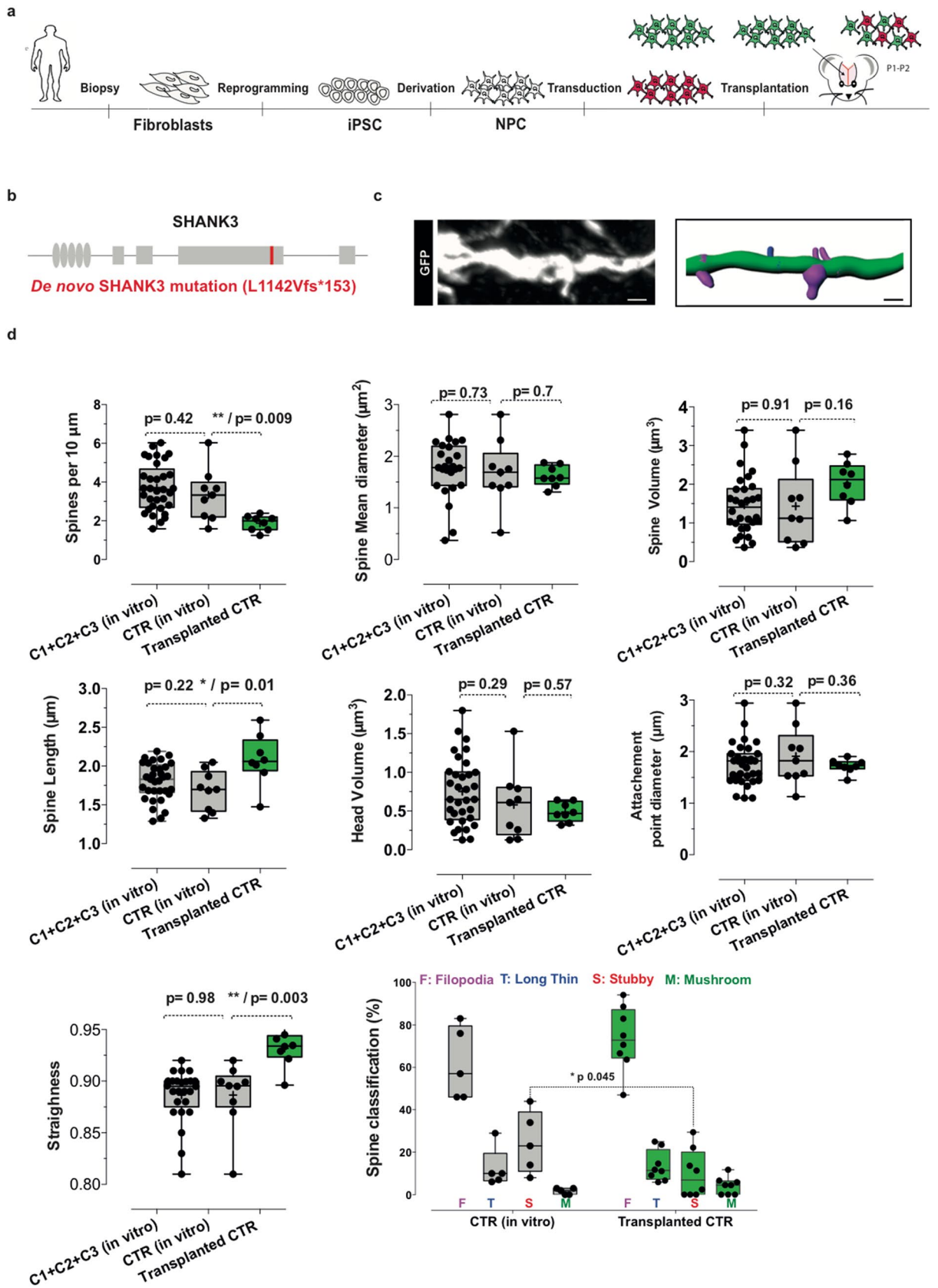
A chimeric mouse model to study human iPSC-derived neurons: the case of a truncating *SHANK3* mutation

Aline Vitrac¹, Stéphanie Pons², Marta Balkota², Nathalie Lemièrè¹, Célia Raïs^{2,3}, Jean-Pierre Bourgeois¹, Uwe Maskos², Thomas Bourgeron¹ & Isabelle Cloëz-Tayarani²✉

Using human induced pluripotent stem cells (iPSC), recent studies have shown that the events underlying autism spectrum disorders (ASD) can occur during neonatal development. We previously analyzed the iPSC-derived pyramidal cortical neurons of a subset of patients with ASD carrying de novo heterozygous mutations in postsynaptic SHANK3 protein, in culture. We reported altered spinogenesis of those neurons. The transplantation of human iPSC-derived neuronal precursors into mouse brain represents a novel option for in vivo analysis of mutations affecting the human brain. In this study, we transplanted the neuronal precursor cells (NPC) into the cortex of newborn mice to analyze their integration and maturation at early stages of development and studied axonal projections of transplanted human neurons into adult mouse brain. We then co-transplanted NPC from a control individual and from a patient carrying a de novo heterozygous *SHANK3* mutation. We observed a reduction in cell soma size of selective neuronal categories and in axonal projections at 30 days post-transplantation. In contrast to previous in vitro studies, we did not observe any alteration in spinogenesis at this early age. The humanized chimeric mouse models offer the means to analyze ASD-associated mutations further and provide the opportunity to visualize phenotypes in vivo.

The use of human-derived cellular models to study neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorders (ASD) is an appropriate approach to link causal genetic alterations to molecular mechanisms that may occur in humans during pre- and postnatal brain development. The “SH3 and multiple ankyrin repeat domain 3” (*SHANK3*) is a member of the *SHANK* gene family located on chromosome 22 in humans which contains multiple structural domains as we previously demonstrated by homology modeling¹. Mutations in *SHANK3* represent some of the best-known genetic causes for ASD and account for the severe intellectual deficiency (ID) and language deficits observed in 1–2% of patients with ASD^{2,3}. *SHANK3* haploinsufficiency also contributes to the clinical symptoms of patients with Phelan-McDermid syndrome which presents a deletion of chromosome 22q13 that includes *SHANK3* in the large majority of cases^{4,5}. *SHANK3* is a critical partner of a major signaling complex expressed at postsynaptic densities (PSD) of glutamatergic synapses which involves cytoskeletal networks at both the soma and the neurites of neuronal cells⁶. *SHANK3* therefore plays a crucial role in synapse formation and dendritic spine maturation. The fundamental role of *SHANK3* at such excitatory synapses was initially investigated by using genetically modified mouse models^{7–9}, or by overexpressing mutated *SHANK3* protein in transfected rat neurons in culture¹⁰. Human induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived neurons represent a valuable model for in vitro analysis of *SHANK3* deficiencies in humans^{11–15}. Accordingly, we recently selected four independent patients with heterozygous truncating de novo *SHANK3* point mutations who had previously been characterized in our laboratory^{1,3}. We generated the corresponding human iPSC for their selective reprogramming into cortical neurons^{13,16}. We then examined the effects of *SHANK3* haploinsufficiency on the levels of *SHANK3* mRNA and on the spine morphogenesis to demonstrate the correlation between spinogenesis defects and *SHANK3* levels¹. In accordance with earlier reported results, our data from these studies with

¹Human Genetics and Cognitive Functions, CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Université de Paris, Institut Pasteur, Paris, France. ²Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Institut Pasteur, Paris, France. ³Collège Doctoral, Sorbonne Université, Paris, France. ✉email: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr



◀ **Figure 1.** Quantitative analysis of primary dendritic spines of human iPSC-derived neurons kept either in culture or transplanted into neonate mice brain. (a, b) Schematic representation of the steps of experimental design, illustrating the production of neuronal precursor cells derived from human iPSC after the initial reprogramming from fibroblasts, the transduction of NPC with fluorescent markers (GFP and/or mCherry), and their transplantation into newborn mice brain. Using confocal microscopy, the study consists of analysis of dendritic spines together with comparative analysis of soma areas and axonal projections between co-transplanted CTR and ASD cells from a male patient with a frameshift mutation in *SHANK3* referred as L1142Vfs*153 located in the proline-rich domain of SHANK3 protein¹. (c) Primary dendrite segment of human pyramidal neuron at 50 days post-transplantation with corresponding 3D reconstruction. Scale bar = 4 μ m. Dendrite segment (green color) are endowed with four categories of spines: Filopodia (pink color), Long Thin (blue color), Stubby (red color) and Mushroom (green color). (d) Comparative quantitative analysis of spine morphological parameters using the Imaris Software as described in Materials and Methods. In vitro data are from our previous study¹ of pyramidal neurons kept for 45–50 days in culture. In vivo data are from two independent mice perfused at 50 days post-transplantation. Number of dendrites is indicated in the graph. Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using a Mann–Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

cultured human neurons confirmed the existence of early synaptic deficits that may occur in the brain of ASD patients who carry *SHANK3* mutations. Together with local synaptic deficits, a defective short-range cortico-cortical wiring was recently reported in a mouse model presenting a homozygous loss of the Shank3B isoform¹⁷. The human cortex is an important region that undergoes multi-developmental processes. Recent findings from animal models suggest that pathological modifications that lead to ASD start before birth at early stages of cortical development¹⁸. Another recent study with iPSC, derived from ASD patients, has shown a dysregulation of specific neurodevelopmental gene modules which occurs at stages of neuronal precursors¹⁹. The neuronal connections that are observed in two-dimensional cultures cannot fully reflect the in vivo conditions, and this represents an important issue for interpretation of data. Recent alternative protocols including the transplantation of human cells, derived either from human embryonic stem cells (ESC) or from human iPSC, offer the possibility to analyze the projection patterns of grafted human cortical neurons within the adult mouse brain²⁰. These transplantation protocols have also been used to repair brain lesions by employing mouse ESC-derived cortical neurons^{21,22}. In the present study, we used a human neuronal-chimeric mouse by transplanting human NPC into the brain of immune-deficient newborn mice. We analyzed the in vivo integration and maturation of cortical cells from a control individual in different regions of mouse brain. We then co-transplanted, for the first time, the neurons from the control individual and from an ASD patient with a heterozygous truncated *SHANK3* mutation to study at early stages of neuronal maturation some key morphological parameters of mutated neurons, under in vivo conditions.

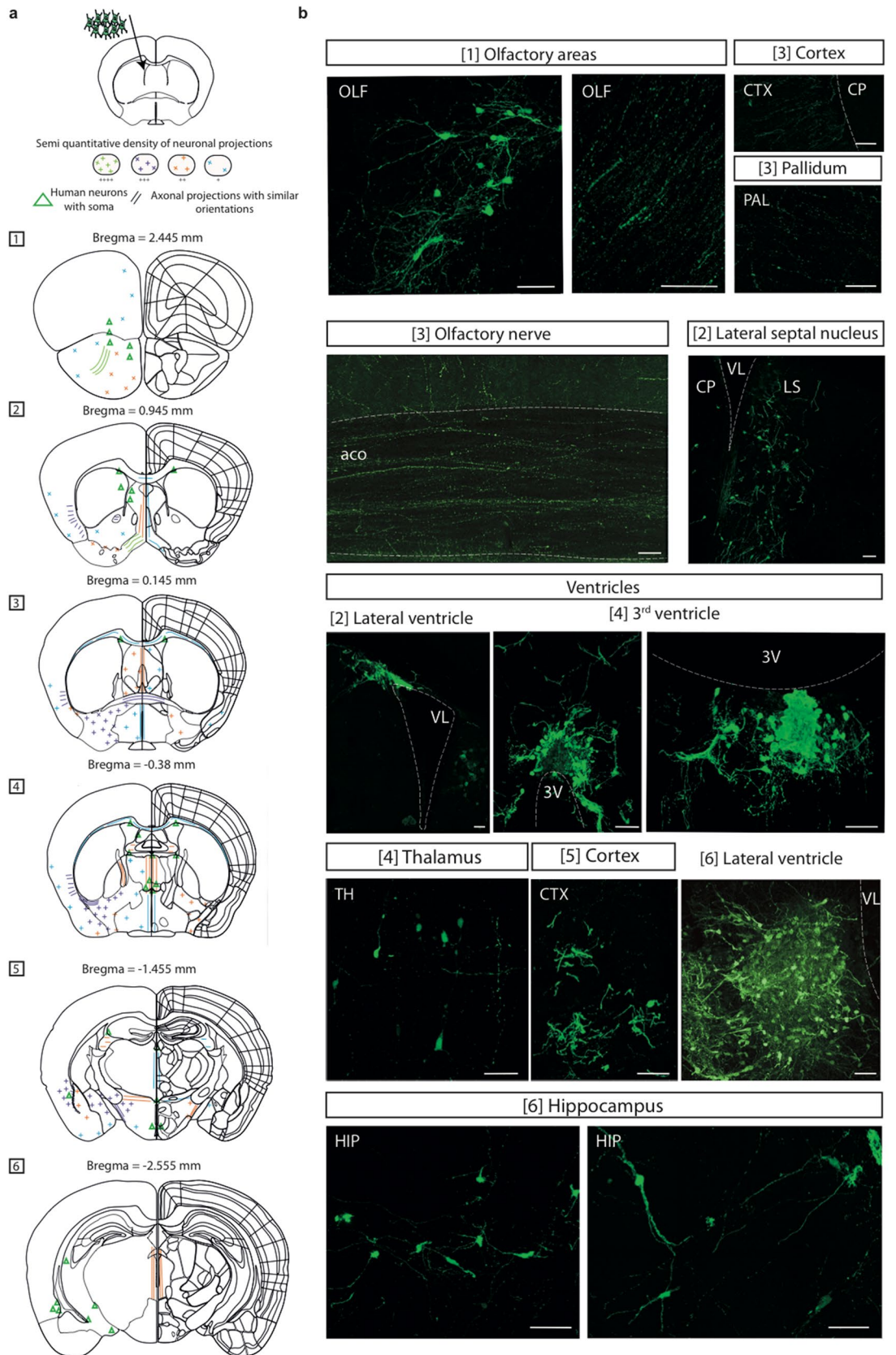
Results

Dendritic spine morphogenesis under in vitro and in vivo conditions. The experimental design of the study as well as the illustration of spine remodeling is depicted in Fig. 1a–c. For transplantation, we used immunodeficient NOD/SCID mice to achieve full integration of cells beyond 2 weeks post-transplantation as described previously^{20,23}.

We transplanted the NPC, without initial differentiation in culture, into the cortex of newborn mice and followed their maturation in vivo. We compared the morphological parameters of dendritic spines in a pool of neurons from three control individuals with the selected control neurons (CTR) which were either kept in vitro for 40–50 days or transplanted into the cortex of newborn mice for analysis at 50-day-old. Our data show a significant reduction in the density of spines as well as a decrease in the percentage of stubby spines in transplanted neurons, as compared to neurons which were kept in vitro. We also observed a significant increase in spine straightness and length in transplanted neurons, as compared to in vitro conditions (Fig. 1d). Other morphological parameters of the spines remained unchanged (Fig. 1d).

Mapping of axonal projections of transplanted neurons and immunofluorescence studies.

The detailed mapping of axonal projections from ventricular transplants is presented in Fig. 2. A semi-quantitative analysis indicates the existence of variable densities of GFP-positive axons within distinct brain areas. The highest densities were observed within ipsilateral regions as compared with contralateral regions. GFP-positive axons were also detected within the brain structures close to the external walls of lateral and third ventricles. This suggests a possible migration of labeled cells within the rostral migratory stream and their integration into distinct olfactory regions comprising the olfactory nerve, olfactory areas, lateral septal nucleus, and piriform cortex also named “olfactory cortex”. GFP-positive axons were also detected in cortex and the subcortical areas including hippocampus, and thalamus (Fig. 2a, b). The detailed mapping of axonal projections from cortical transplants is presented in Fig. 3a. Most of the transplants were located underneath or within the frontal cortex and did not result in a major increase of the cortical surface. Most of the GFP-positive cells remained confined within the transplant. The pattern of axonal projections was different from those observed under ventricular transplantation. Projections arising from different cortical layers were found in thalamus, hypothalamus, striatum (nucleus accumbens), ipsilateral and to a lesser extent in contralateral cortices (Fig. 3a, b). GFP-positive fibers were observed in the stria terminalis (Fig. 3a, b). Our results show an enrichment of axonal projections within the fimbria region with axonal projections which may arise from hippocampus and medial septum (Fig. 3a, b). Single GFP-neurons also settled outside the grafts, with a typical pyramidal morphology (Figs. 2b, 3b, 4d). By immunostaining methods, we were able to detect the expression of the cortical markers Cux1, Cux2



◀ **Figure 2.** Integration of human iPSC-derived neurons into mouse brain ventricles and maturation pattern of axonal projections. **(a)** Camera lucida drawings of the pattern of axonal projections 50 days after transplantation within mouse ventricles. Abbreviations are according to Allen Brain Atlas (<https://mouse.brain-map.org/>). Image credit: Allen Institute. Neuron location, migration and densities are depicted using a code-color schematic representation. Results are from two independent mice, using 72 brain slices of 50 μm each. The illustrated data are from one representative brain. **(b)** Visualization of GFP-positive cells with their cell bodies, dendrites and axons (green color) within the ipsilateral ventricle. Structures from the olfactory system (Bregma 2.445 mm; 0.145 mm), lateral septal nucleus (Bregma 0.945 mm), a medial olfactory area, bed nuclei of the stria terminalis (Bregma 0.145 mm), a relay center composed of high densities of fibers, and piriform cortex (Bregma -0.38mm), receiving back projections from olfactory bulb. Data illustrate the integration of human neurons in structures situated on the outside walls of the lateral ventricles, as well as their possible migration within the rostral migratory stream for integration within olfactory regions. No labeling was observed along the subgranular neurogenic zone of the dentate gyrus. A faint labeling was observed in corpus callosum and in some contralateral lateral areas **(a)**. Scale bars = 50 μm . (aco) Anterior commissure, olfactory limb; (CP) Caudate putamen; (CTX) Cortex; (HIP) Hippocampal region; (OLF) Olfactory areas; (PAL) Pallidum; (VL) Lateral Ventricle; (3V) Third Ventricle (LS) Lateral septal nucleus; (Ipsi) Ipsilateral; (Contra) Contralateral.

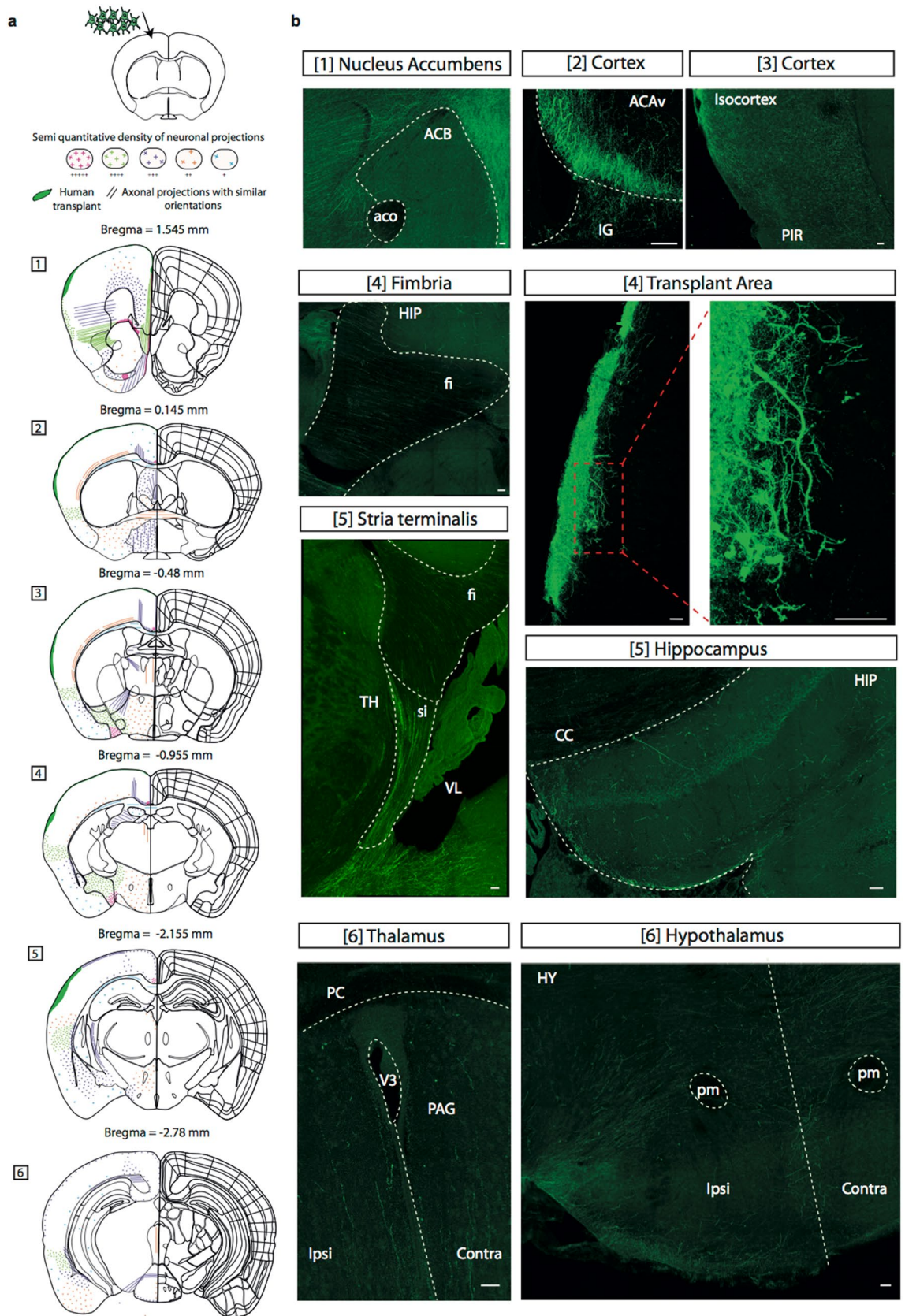
and Brn2 (Supplementary Fig. 2). We also detected individual SOM interneurons that colocalized with GFP. No colocalisation of positive parvalbumin (PV) neurons with GFP-expressing cells was observed (Supplementary Fig. 2). The expression of MAP2 and VGlut-1 proteins is depicted in Supplementary Fig. 3. These data confirm that transplanted NPC can give rise to pyramidal cells at later stages of maturation, as we described previously²³.

Co-transplantation of GFP- and mCherry-labeled NPC and neuronal phenotypic analysis at early stages of maturation.

We co-transplanted human GFP-CTR cells either with mCherry-CTR cells or with mCherry-ASD cells. Labeled NPC were initially purified by FACS sorting in order to obtain equivalent levels of fluorescence in NPC transduced either with a lentivirus expressing GFP or a lentivirus expressing mCherry as detailed in Fig. 4a–c. Under these conditions, equivalent fluorescence levels were quantified within cortical transplants (Fig. 4b, c) as also illustrated in pyramidal neurons from 30-day old mice (Fig. 4d, e). When GFP-CTR and mCherry-ASD cells were co-transplanted, we observed a large decrease in the densities of axonal projections arising from ASD cortical neurons as compared to CTR cortical neurons (Fig. 4f). We did not visualize any cortical projection in mice with smaller and irregular transplants (data not shown). We then measured the neuronal soma size of human grafted CTR and ASD neurons within mouse cortex (Fig. 5a, c). Our results show a reduction in soma areas in grafted ASD neurons as compared to CTR neurons. This phenotype was specifically observed for somas with areas that were smaller than 40 μm^2 (Fig. 5c). We did not observe any difference in cell morphology between human ASD cells grafted either alone or with human control cells (Supplementary Fig. 4). Caspase-3 immunostaining did not reveal any difference between transplanted CTR and ASD cell populations (Supplementary Fig. 4). In addition, we did not observe any apparent structural disaggregation with a well-defined focal nuclear labeling within ASD human cells (Supplementary Fig. 4). Finally, we also quantified diverse dendrite and spine parameters within transplants using the Imaris Software (Fig. 5b). Our results did not reveal any significant difference in morphological parameters of dendrites and spines from transplanted CTR and ASD neurons at 30 days post-transplantation (Fig. 5d).

Discussion

We recently published an *in vitro* characterization of iPSC-derived neurons from control individuals and patients with ASD with single heterozygous *de novo* mutations in SHANK3, which is a scaffolding protein specifically expressed at synapses of excitatory neurons¹. Based on previously published methods, we were able to derive human iPSC into neurons which consisted of up to 80% pyramidal cells, expressing selective markers of supragranular cortical layers II–IV^{1,13,16}. Human neurons developed different dendritic spine categories after 6–7 weeks in culture, however, the spine densities were decreased as a function of SHANK3 expression¹. The recent generation of humanized chimeric mouse brains, repopulated by human neurons²⁰ offers new possibilities to study neuron phenotypes *in vivo*. Our first objective in the present study was to test this approach in the context of ASD, SHANK3, and pyramidal neurons. In a first series of experiments, we analyzed the integration and maturation of grafted control NPC within either the ventricles or the motor cortex of newborn mice. We showed that the transplanted cells expressed Cux1/Cux2 and Brn2 markers corresponding to cortical layers II–IV as observed in *in vitro* studies¹⁶. We also detected a few somatostatin-expressing neurons that are one of the two major classes of inhibitory interneurons in the human neocortex and hippocampus²⁴. However, in the present study we did not detect PV neurons that represent the other main class of inhibitory neocortical cells. This indicates that under our experimental conditions, PV neurons were not derived from NPC, and this is in accordance with the recent results reported by D'Alessio et al.²³. We compared the spinogenesis in human pyramidal neurons which had been previously kept in culture for 40–50 days¹ with spinogenesis of pyramidal neurons derived from transplanted NPC in newborn mice 50 days after transplantation. We observed a significant decrease in spine densities in transplanted pyramidal cells under *in vivo* conditions as compared to those which were kept in culture. By contrast, spine straightness and lengths were significantly increased in these *in vivo* studies as compared with those in *in vitro* conditions. The spine categories were also slightly different with an increase in the percentage of immature spines such as filopodia. We also observed a significant decrease in the percentage of stubby spines, indicating some defects in spine maturation. Our data indicate that under *in vivo* conditions, the maturation of grafted human neurons takes longer than they do under cultured *in vitro* conditions. A higher dendritic spine straightness may result from increased actin dynamics and developmental plasticity within a 3D

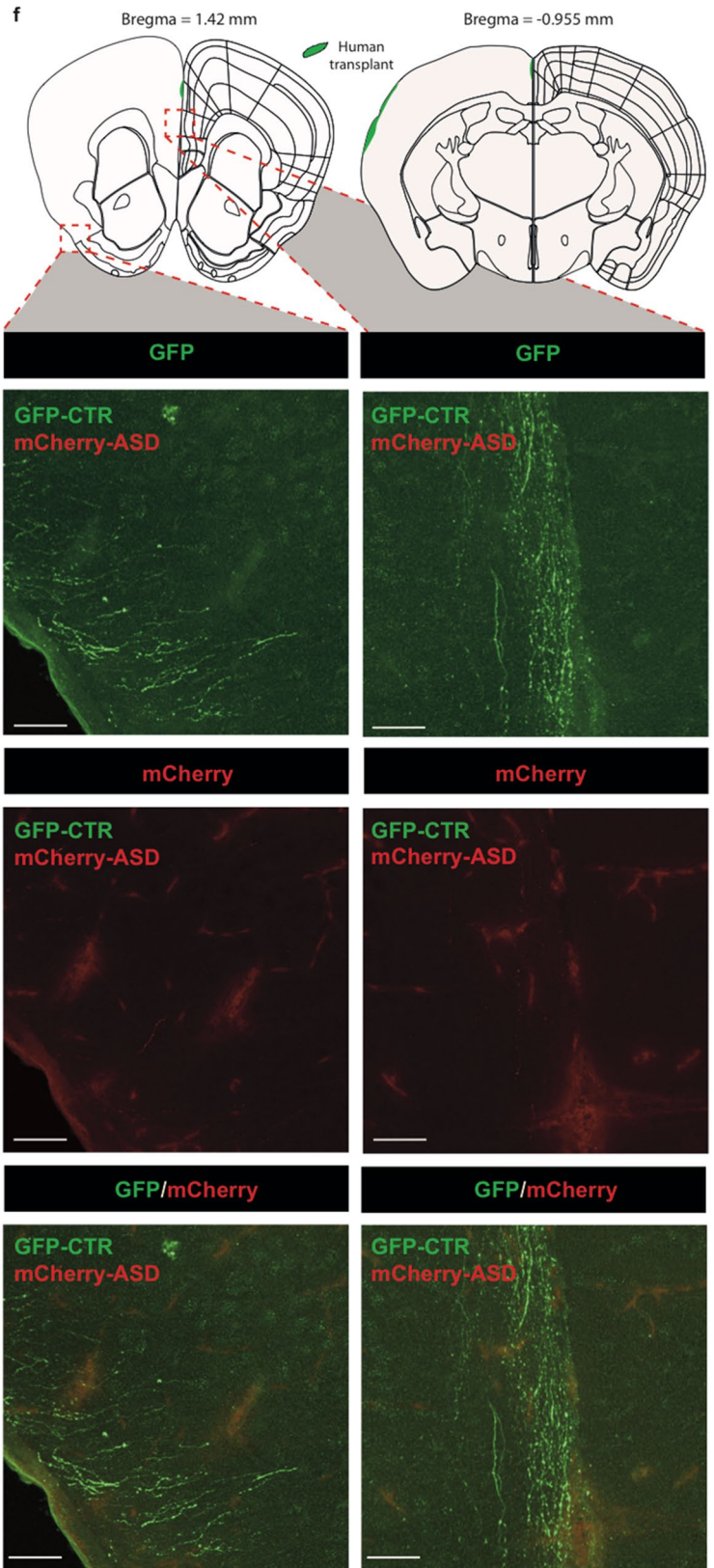
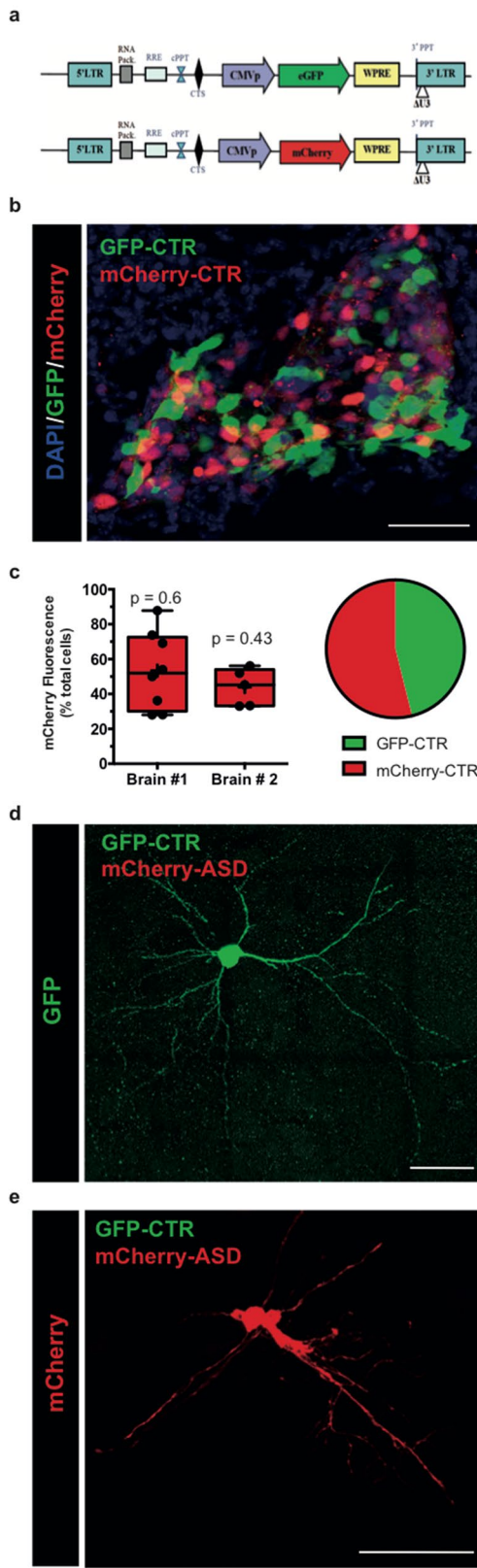


◀ **Figure 3.** Integration of Human iPSC-derived neurons into mouse brain frontal cortex and maturation pattern of axonal projections. **(a)** Camera lucida drawings of the pattern of axonal projections 50 days after transplantation within mouse brain frontal cortex. Abbreviations are according to Allen Brain Atlas (<https://mouse.brain-map.org/>). Image credit: Allen Institute. Neuron location, migration and densities are depicted using a code-color schematic representation. Results are from two independent mice, using 65 brain slices of 50 μm each. The illustrated data are from one representative brain. **(b)** Visualization of GFP-positive cells with their cell bodies, dendrites and axons (green color) within the ipsilateral regions. Axons are found mostly in cortical areas: motor and somatosensory cortical layers, anterior cingulate area (Bregma 1.545 mm), nucleus accumbens, claustrum and endopiriform nucleus (Bregma 1.545 mm), Fimbria (Bregma -0.955 mm) and to a lesser extent in hippocampus, thalamus and hypothalamus (Bregma -2.155 mm). No labeling was observed in substantia nigra (Bregma -2.78 mm). A labeling was observed in corpus callosum and in some contralateral lateral areas **(a)**. Scale bars = 50 μm . (ACAv) Anterior cingulate area ventral part; (aco) Anterior commissure, olfactory limb; (ACB) Nucleus accumbens; (CC) corpus callosum; (HIP) Hippocampal region; (IG) Induseum griseum (supra-callosum gyrus); (Fi) Fimbria; (HY) Hypothalamus; (PIR) Piriform area; (pm) Principal mamillary tract; (PAG) Periaqueductal gray; (V3) Third ventricle; (VL) Lateral ventricle; (PC) Posterior commissure; (TH) Thalamus; (si) Substantia innominata; (Ipsi) Ipsilateral; (Contra) Contralateral.

cell environment²⁵. To our knowledge, there has not been any comparative study on spinogenesis so far. It should be noted that the initial in vitro differentiation steps which were carried out before transplantation in previous studies^{20,26} may have modified the outcome of maturation processes of grafted human precursors at NPC stages.

In order to characterize our method further, we analyzed the axonal projections. We did not observe any graft boundaries initially, suggesting a full integration of human cells within the host brain. For ventricular injection, we showed that the GFP-positive human cells could migrate from the ventricular zone, project their axons towards the cortical target regions and along the rostral migratory stream towards the olfactory bulbs (Fig. 2). For cortical injection, the axon elongation was targeted towards more specific ipsilateral structures including motor cortex, striatum, thalamus, hypothalamus and hippocampus. The pattern of axonal projections was similar to that observed by other authors using human ESC-derived neurons²⁰. Our data show that axonal projections may arise from distinct cortical layers. However, under our experimental conditions and at this stage of analysis, a less intense labeling was observed within the contralateral cortex. This may be due to the presence of low density of fibers within corpus callosum (Fig. 3), a structure connecting the two hemispheres.

The second objective of the present study was to take a further step towards understanding the consequences that are associated with *SHANK3* mutations. Recent reports by Schafer et al. indicate that the events which occur during early brain development, specifically from the stage of NPC, may contribute to the pathogenesis of ASD¹⁹. Since *SHANK3* is expressed in the human fetal brain as early as 35 weeks post-conception (Brain-Span, <https://www.brainspan.org/rnaseq/search/index.html>), it is reasonable to assume that in addition to its synaptic role, it may play other earlier functional roles after its cellular expression. Schafer et al. have shown an aberrant neurodevelopmental growth dynamic in maturing neurons derived from the iPSC of several patients with ASD, triggered by an altered chromatin accessibility¹⁹. In a second set of experiments, we analyzed the role of a *SHANK3* mutation in vivo to determine if transplanted neuronal precursors mutated in *SHANK3* respond to endogenous guidance cues from host brain, and if they behave differently as they do in vitro in culture. We selected a patient with severe autistic traits from our previous study, who presented a frameshift mutation in *SHANK3* which leads to a premature STOP codon¹. For an accurate comparison of phenotypes within cortical transplants, we co-transplanted NPC derived from a CTR individual and those from the patient with ASD. We had initially checked for identical levels of fluorescence between GFP-positive (CTR) and mCherry-positive (CTR) cells. We then quantified the densities of cells with either green or red fluorescence within each transplant and found no significant difference. CTR and ASD neurons displayed a mixed homogeneous distribution within the transplant with no visible boundaries with host cortical cell layers. We analyzed the development and maturation of transplants at 30 days post-injection which is reported to be a sufficient period for the development of cortical and subcortical projections²¹ and a stage at which the early events can be observed. Several morphometric studies have shown a reduction in neuronal size in the neocortex of patients with ASD²⁷. We used the approach which has been developed by Lingley et al. to specifically map neuronal soma size to identify the differences between neuronal cell populations²⁸. By applying the same color code and by ranging neurons within the same size categories, we were able to evaluate the distribution of the soma size of human grafted CTR and ASD neurons within the host cortex. Our results show a reduction in soma areas in grafted ASD neurons as compared to CTR neurons. This phenotype was specifically observed for somas with areas that were smaller than 40 μm^2 . In agreement with our results, other authors have recently reported a reduction in cell soma size in cultured iPSC-derived neurons under *SHANK3* knockdown conditions and during the early stages of maturation^{29,30}. We did not observe any difference in cell morphology between human ASD cells transplanted alone or with the control cells. This indicates that the presence of CTR cells does not modify the survival of ASD cells under our experimental conditions. These data are in accordance with those we obtained using separate cultures of CTR and ASD cells¹. We did not detect any increase in caspase-3 labeling in ASD neurons as compared with CTR neurons. These data suggest that at early stages of neuronal development and maturation, the reduction in cell soma size is neither a consequence of apoptotic events with neuronal death, nor a consequence of the existence of deleterious experimental conditions. In addition, it has been reported that vascularization of transplanted human cerebral organoids reduces cell apoptosis³¹. We have also reported a strong vascularization of transplants from NPC by two-photon imaging²³. This suggests that vascularization may have a strong protective effect as well. We also observed a decrease in the densities of cortical axonal projections from ASD neurons as compared to CTR neurons, as illustrated for the infra-limbic and piriform cortical areas. Our data are in agreement with



◀ **Figure 4.** Co-transplantation of control and mutated human NPC within newborn mouse cortex. **(a)** Schematic representation of lentiviral constructs for transduction of NPC with either the GFP (green fluorescence) or the mCherry (red fluorescence) proteins using a human cytomegalovirus promoter (CMVp). **(b)** Comparative distribution of mCherry and GFP labeled CTR cells within cortical transplant. **(c)** Left: Comparative fluorescence proportions of mCherry and GFP labeled CTR cells among several graft sub areas (the number of values is indicated in the graph). Data are presented using a Box and whiskers graph with plotted “min” and “max” and median values. Mean values are also indicated as “+”. Statistical analysis was performed using a Wilcoxon signed rank test to compare medians to the theoretical value “50”. *p* values are indicated in the graph. Right: Graphic camembert illustrating the percentages of mCherry-labeled control cells and of GFP-labeled control cells. Similar data were obtained between 2 transplants from 30-day old mice. **(d, e)** confocal images of isolated human pyramidal neurons after transplantation of CTR (green) and ASD (red) NPC from 30-day old mice. **(f)** Representative axonal projections of human GFP-labeled CTR neurons and mCherry-labeled ASD neurons in the piriform cortex (left panel) and in the infralimbic cortex (right panel) at 30 days after transplantation. Image credit: Allen Institute. Scale bar = 50 μ m.

those of Pagani et al. who recently reported a defective short-range cortico-cortical wiring in a mouse model presenting a homozygous loss of the Shank3B isoform¹⁷. In contrast to our previous in vitro results, we did not observe any significant difference in morphological parameters of dendrites and spines from transplanted CTR and ASD neurons. Since SHANK3 is known to play a crucial role in both synaptic development and function, our results suggest that compensatory changes may occur under in vivo conditions, as was recently observed in Shank3 knock-out mice having partial deletions of exons³². Other authors also reported unexpected levels of complexity and modularity of SHANK3 functions in vivo using mouse models³³. Our findings confirm that a heterozygous mutation in *SHANK3* associated with a reduced *SHANK3* expression¹ may significantly dysregulate some initial properties of neuronal development and maturation, at least with respect to cortical neurons. The fact that we did not observe any modification in morphological parameters of dendritic spines under in vivo situations as compared to in vitro models, supports the hypothesis of diverse layers of complexity in the function of SHANK3, as well as its isoforms and the other members of SHANK family. These observations are also in line with the diversity of phenotypes, including the lack of behavioral effects that are observed in heterozygous Shank3 mouse models which have been developed^{34,35}.

In conclusion, as compared to in vitro studies, the humanized chimeric mouse models offer the possibility to better understand the role of human mutations that are associated with ASD and provide the opportunity to visualize the neuronal phenotypes in more details.

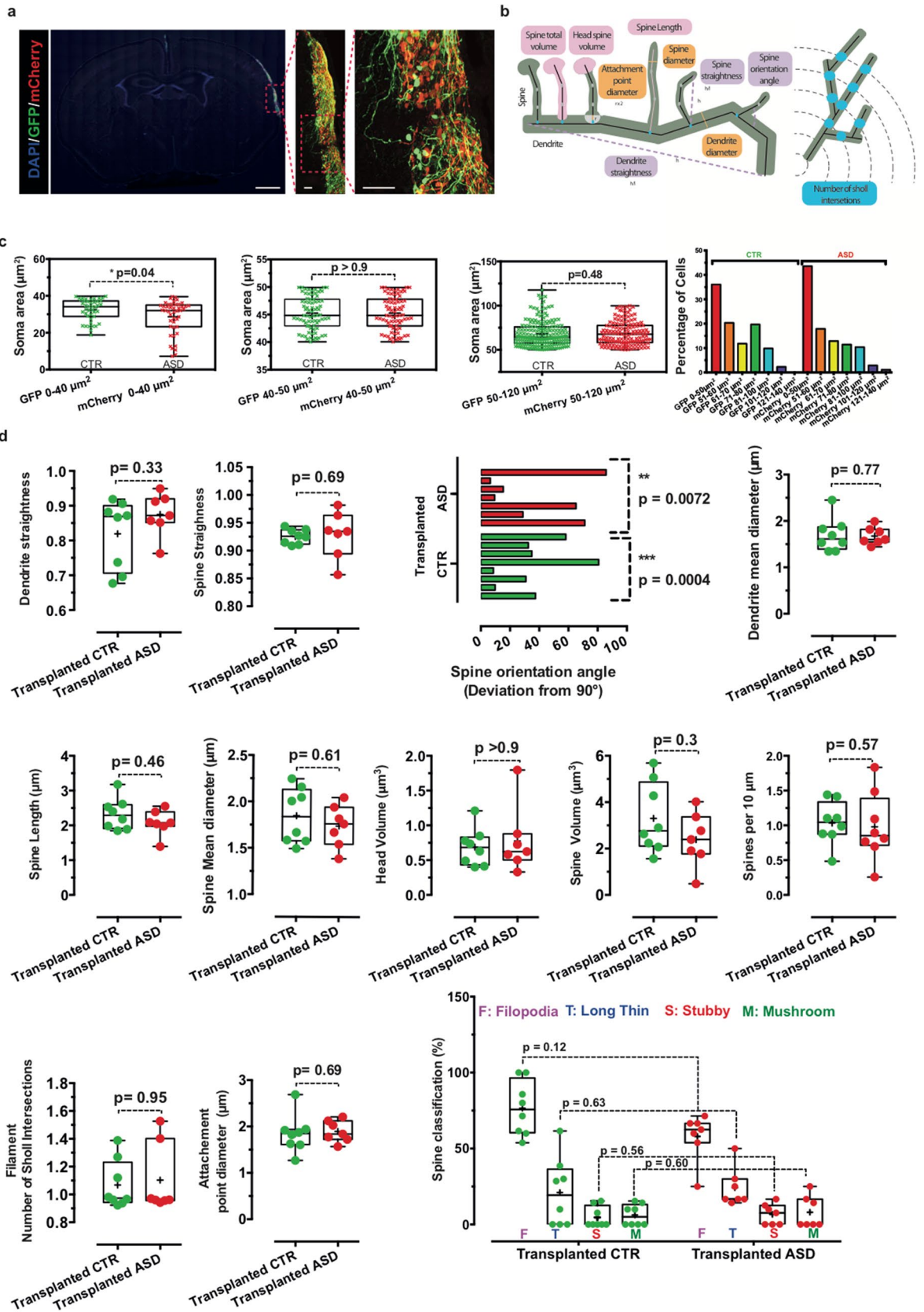
Methods

We confirm that all methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. We also confirm that the experimental protocols were approved by the named institutions. Informed consents were obtained from all subjects as detailed in our previous study¹.

Production of human pluripotent stem cells and their derivation into NPC. The production of iPSC, their characterization, commitment to the neural lineage and derivation of stable NPC were performed according to Boissart et al.¹⁶. For the control iPSC lines, we used GM04603 and GM01869 from Coriell Biorepository (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA). We also used the line PB12, which we described in our previous study. The NPC obtained from the three control individuals for this study were referred to as “C1 + C2 + C3” in the present study. Briefly, 6-well culture plates with glass coverslips were coated under the flow hood with 0.01% poly-ornithine solution diluted to 1/6 in DPBS. After an overnight exposure at 37 °C, the coverslips were washed three times with DPBS. Then we added the laminin stock solution of 1 mg/ml, which was diluted 500 times in DPBS and incubated the coverslips for at least 4 h. at 37 °C. The NPC were then plated at the density of 50,000 cells/cm² in the 6-well culture plates with the glass coverslips in 3 ml of culture medium. The culture medium consisted of 500 ml of DMEM/F-12 mixed with 500 ml of Neurobasal medium and supplemented with 2 vials (5 ml each) of N2 supplement, 2 vials (10 ml each) of B27 supplement, 10 ml of Penicillin-Streptomycin (Penicillin = 10,000 units/ml and Streptomycin = 10,000 units/ml), 1 ml of 50 mM 2-mercaptoethanol Stock solution and laminin (1/500), as described previously¹. After removal of culture medium, fresh N2B27 medium containing 2 μ g/ml of fresh laminin solution was added to keep the neurons attached on the glass coverslips and to avoid clumping. Medium was changed every 3 days.

For the in vivo transplantation into newborn mice, we used NPC derived from the GM04603 control individual (CTR) and from the “AUN291_3/L1142Vfs*153” ASD patient as representative samples from our previous study¹. The patient for this study carried a de novo frameshift mutation which leads to a premature STOP codon. The pedigree of the family carrying the L1142Vfs*153 mutation as well as the clinical features of the patient are presented elsewhere^{1,3}.

Lentiviral transduction. NPC were labeled either by transduction with a CMV-GFP-lentivirus (green fluorescence) or with a CMV-mCherry-lentivirus (red fluorescence) as described in Gouder et al.¹. Lentiviral vectors were prepared according to a published protocol³⁶. The map of the CMV vector is detailed in Fig. 4a. NPC were transduced with 99.5 ng of lentivirus in a 6-well culture plate filled with 500 μ l of fresh culture medium for 3 h. The volume was completed to 2 ml and incubated for the next 48 h, and then rinsed with culture medium. For co-transplantation, transduced NPC were initially purified by FACS in order to inject equivalent levels of green or red fluorescence intensities within cells. Labeled NPC were amplified using the same culture medium



◀ **Figure 5.** Quantitative analysis of morphological parameters of dendrites and dendritic spines from the neurons of transplanted control individual and ASD patient NPC. **(a)** Confocal image of a cortical transplant at different magnification. Scale bar = 100 μm (left panel), Scale bar = 50 μm (middle and right panels). **(b)** Schematic representations of each parameter evaluated using Imaris 9.2 software. **(c)** Classification and measurement of soma areas. **(d)** Measurement of morphological parameters of dendrites and dendritic spines. Dendrite segments are endowed with four categories of spines classified as: Filopodia (pink color), Long Thin (blue color), Stubby (red color) and Mushroom (green color). Number of neuronal dendrites is indicated in the graph. Data are presented using a Box and whiskers graph with plotted “min” and “max” and median values. Mean values are also indicated as “+”. Statistical analysis was performed using a Mann–Whitney test. For the measurement of spine deviation angle, the statistical analysis was performed using a Wilcoxon signed rank test to compare medians to the theoretical value “90”. In all cases, p values are directly indicated in the graph. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

described above supplemented with brain-derived neurotrophic factor ($20 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$), epidermal growth factor ($10 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$) and fibroblast growth factor ($10 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$), then aliquoted in cryotubes using FBS with DMSO (10%) and frozen in liquid nitrogen. Eight to 10 days before transplantation, labeled NPC were thawed, plated and amplified using the same supplemented culture medium described above. Culture steps of NPC are detailed in Figure S1. Products and suppliers are listed in Table S1.

Intracerebral transplantation. Cultured NPC were dissociated and resuspended in DPBS (10^5 cells/ μl) before transplantation according to D’Alessio et al.²³. GFP-labeled cells were transplanted into either the motor cortex or into the lateral ventricle of immunodeficient NOD/SCID mice (Charles Rivers Laboratory), at postnatal day 1–day 2. Pups were first locally anesthetized using a lidocaine gel. The head of newborn pups was gently held horizontally between the operator’s fingers. Bregma was used as a visible landmark to localize the injection site. We used the published coordinates Dorso-Lateral = +1 mm, Antero-Posterior = –1 mm, depth = –1 mm to target the cortex, or depth = –2 mm to target the ventricle²³. Two μl of resuspended cells were injected slowly using a Hamilton syringe (Hamilton, 65460) unilaterally. The syringe needle was set for injecting at 1- or 2-mm depth and was kept in the pups’ brain for 30 s following the injection before it was removed. The injection itself was done over 1 minute. This protocol was approved by the Institut Pasteur Ethics Committee and the French “Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de l’Innovation” under reference APAFiS #20686. The accuracy of injection was monitored by immunofluorescence labeling of GFP-labeled transplants, after brain slicing at different periods post-injection. All pups per litter were injected and their survival was evaluated at 60%. Only the mice which presented well-defined GFP-labeled transplants within the same cortical areas were kept for further analysis. The co-transplantation of equal numbers of CTR and ASD cells was monitored by initial cell counting and immunofluorescence labeling of the distinct cell populations. Brains with small number of labeled transplanted cells were excluded from our analysis, even though they presented similar phenotypes.

Immunofluorescence. Immunofluorescence analysis on brain sections was performed at 30 and 50-days post-transplantation according to our previously described protocol with slight modifications^{1,37}. Animals received a lethal dose of a mixture of Ketamine (Imalgen®, 100 mg/kg, Merial) and Xylazine (Rompun®, 10 mg/kg, Bayer), and were transcardially perfused with 15 ml of DPBS, followed by 50 ml ice-cold paraformaldehyde (PFA 4%) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were dissected and post-fixed overnight at 4 °C in 4% PFA. Fifty μm coronal sections were obtained using a vibratome (Leica Biosystems, VT1000S), collected in 24-well-culture plates, and stored in DPBS at 4 °C until use. Briefly, the free-floating sections were rinsed twice in PBS (pH 7.4) and then incubated in DPBS solution containing 0.5% Triton X-100 and 10% serum at room temperature (RT) for 30 min to block nonspecific binding. Primary antibodies, diluted in blocking solution, were added overnight at 4 °C. The list of primary and secondary antibodies with their respective dilutions is presented in Table S2. In order to improve the labeling of the whole spine morphology, immunofluorescence labeling was performed using either an anti-GFP antibody or an anti-mCherry antibody in permeabilized conditions. An additional incubation with DAPI diluted in DPBS was performed for 10 min at room temperature.

Image quantitative analysis. We have previously reported a stepwise protocol for imaging of dendritic spines after immunofluorescence in a video journal³⁷. Briefly, confocal imaging was performed using a confocal laser-scanning microscope with a 40X oil NA = 1.3 objective, a 488 nm laser for GFP excitation, and a 555 nm laser for mCherry excitation. A Z spacing ranging from 150 to 300 nm was used for Z-stack acquisitions. A semi-automatic tracing of dendrites and automated segmentation of spines was performed using the Filament Tracer module of Imaris 9.5 software (Bitplane AG, Zürich). Spine categories were defined by their morphology as follows: Stubby: length < 1 μm ; Mushroom: Length (spine) < 3 μm and Max width (head) > mean width (neck) $\times 2$; Long thin: Mean width (head) \geq Mean width (neck); Filopodia-like: length $\leq 4 \mu\text{m}$ (no head). For the quantification of cell soma areas of transplanted cells, Z-stacks were acquired under the same microscopic parameters. Soma size areas were measured using Fiji software.

Statistics. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 6 software (GraphPad, San Diego, California, USA). Statistical analyses are reported in each figure legend. 95% confidence levels have been used.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in the published article (and its Supplementary Information file).

Received: 20 March 2020; Accepted: 17 July 2020

Published online: 07 August 2020

References

- Gouder, L. *et al.* Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations. *Sci. Rep.* **9**, 94 (2019).
- Durand, C. M. *et al.* Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* **39**, 25–27 (2007).
- Leblond, C. S. *et al.* Meta-analysis of SHANK mutations in autism spectrum disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet.* **10**, e1004580 (2014).
- Phelan, M. C. *et al.* 22Q13 deletion syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **101**, 91–99 (2001).
- Tabet, A.-C. *et al.* A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. *NPJ Genom. Med.* **2**, 32 (2017).
- Alexandrov, P. N., Zhao, Y., Jaber, V., Cong, L. & Lukiw, W. J. Deficits in the proline-rich synapse-associated Shank3 protein in multiple neuropsychiatric disorders. *Front. Neurol.* **8**, 1–7 (2017).
- Bozdagi, O. *et al.* Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol. Autism* **1**, 15 (2010).
- Peça, J. *et al.* Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* **472**, 437–442 (2011).
- Jiang, Y. H. & Ehlers, M. D. Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron* **78**, 8–27 (2013).
- Durand, C. M. *et al.* SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry* **17**, 71–84 (2012).
- Shcheglovitov, A. *et al.* SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* **503**, 267–271 (2013).
- Bidinosti, M. *et al.* CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency. *Science* **351**, 1–8 (2016).
- Darville, H. *et al.* Human pluripotent stem cell-derived cortical neurons for high throughput medication screening in autism: a proof of concept study in SHANK3 haploinsufficiency syndrome. *EBioMedicine* **9**, 293–305 (2016).
- Yi, F. *et al.* Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. *Science* **352**, aaf2669 (2016).
- Pfaender, S. *et al.* Zinc deficiency and low enterocyte zinc transporter expression in human patients with autism related mutations in SHANK3. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
- Boissart, C. *et al.* Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl. Psychiatry* **3**, e294 (2013).
- Pagani, M. *et al.* Deletion of autism risk gene Shank3 disrupts prefrontal connectivity. *J. Neurosci.* **39**, 5299–5310 (2019).
- Nagode, D. A. *et al.* Abnormal development of the earliest cortical circuits in a mouse model of autism spectrum disorder. *Cell Rep.* **18**, 1100–1108 (2017).
- Schafer, S. T. *et al.* Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. *Nat. Neurosci.* **22**, 243–255 (2019).
- Espuny-Camacho, I. *et al.* Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* **77**, 440–456 (2013).
- Ballout, N. *et al.* Development and maturation of embryonic cortical neurons grafted into the damaged adult motor cortex. *Front. Neural Circuits* **10**, 1–12 (2016).
- Michelsen, K. A. *et al.* Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Neuron* **85**, 982–997 (2015).
- D'Alessio, R. *et al.* Long-term development of human iPSC-derived pyramidal neurons quantified after transplantation into the neonatal mouse cortex. *Dev. Biol.* **461**, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.01.009> (2020).
- Urban-Ciecko, J. & Barth, A. L. Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 401–409 (2016).
- Arenallo, J. I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J. & Yuste R. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front. Neurosci.* **1**, 131–143 (2007).
- Vitrac, A. & Cloëz-Tayarani, I. Induced pluripotent stem cells as a tool to study brain circuits in autism-related disorders. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0966-2> (2018).
- Wegiel, J. *et al.* Brain-region-specific alterations of the trajectories of neuronal volume growth throughout the lifespan in autism. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 28 (2014).
- Lingley, A. J., Bowdridge, J. C., Farivar, R. & Duffy, K. R. Mapping of neuron soma size as an effective approach to delineate differences between neural populations. *J. Neurosci. Methods* **304**, 126–135 (2018).
- Kathuria, A. *et al.* Stem cell-derived neurons from autistic individuals with SHANK3 mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Mol. Psychiatry* **23**, 735–746. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.185> (2018).
- Huang, G. *et al.* Uncovering the functional link between SHANK3 deletions and deficiency in neurodevelopment using iPSC-derived human neurons. *Front. Neuroanat.* **13**, 23 (2019).
- Daviaud, N., Friedel, R. H. & Zou, H. Vascularization and engraftment of transplanted human cerebral organoids in mouse cortex. *eNeuro* **5**, 1–18 (2018).
- Jin, C. *et al.* Unexpected compensatory increase in Shank3 transcripts in Shank3 knock-out mice having partial deletions of exons. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 228 (2019).
- Wang, L. *et al.* An autism-linked missense mutation in SHANK3 reveals the modularity of Shank3 function. *Mol. Psychiatry* <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0324-x> (2019).
- Wang, X. *et al.* Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nat. Commun.* **7**, 11459 (2016).
- Drapeau, E., Dorr, N. P., Elder, G. A. & Buxbaum, J. D. Absence of strong strain effects in behavioral analyses of Shank3-deficient mice. *Dis. Model. Mech.* **7**, 667–681 (2014).
- Avale, M. E. *et al.* Interplay of $\beta 2^*$ nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15991–15996 (2008).
- Gouder, L. *et al.* Three-dimensional quantification of dendritic spines from pyramidal neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/53197> (2015).

Acknowledgements

The authors are thankful to the Clinical Investigation Center of Robert Debré hospital for assistance with patient recruitment and to Dr. Alexandra Benchoua who performed the initial iPSC reprogramming. The French Ministry of Education and the LabEx BioPsy provided the funding for AV's PhD. Other funding for this study were provided by grants from the French National Research Agency ANR (ANR-13-SAMA-0006; SynDivAutism), the Bettencourt-Schueller Foundation, the Cognacq Jay Foundation, the Fondamental Foundation and the Fondation pour la Recherche Médicale "FRM Equipe 2019". We gratefully acknowledge the UtechS Photonic Bioimaging (Imagopole), C2RT, Institut Pasteur, supported by the French National Research Agency (France BioImaging; ANR-10-INSB-04; Investments for the future). We also gratefully acknowledge the help of Image Analysis Hub of the Institut Pasteur for this work. NINDS Repository sample numbers corresponding to the sample used in this study is GM04603 ("4603").

Author contributions

I.C.-T, U.M., and T.B. conceived the study. A.V., S.P, N.L., and M.B. performed the experiments. C.R. contributed to the experimental design. A.V drew the images. J.-P.B. contributed to critical discussion and data interpretation. I.C.-T and A.V. drafted and edited the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70056-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to I.C.-T.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

**A chimeric mouse model to study human iPSC-derived neurons:
the case of a truncating *SHANK3* mutation**

Aline Vitrac ¹, Stéphanie Pons ², Marta Balkota ², Nathalie Lemière ¹, Célia Raïs ^{2,3}, Jean-Pierre Bourgeois ¹, Uwe Maskos ², Thomas Bourgeron ¹ and Isabelle Cloëz-Tayarani ^{2*}

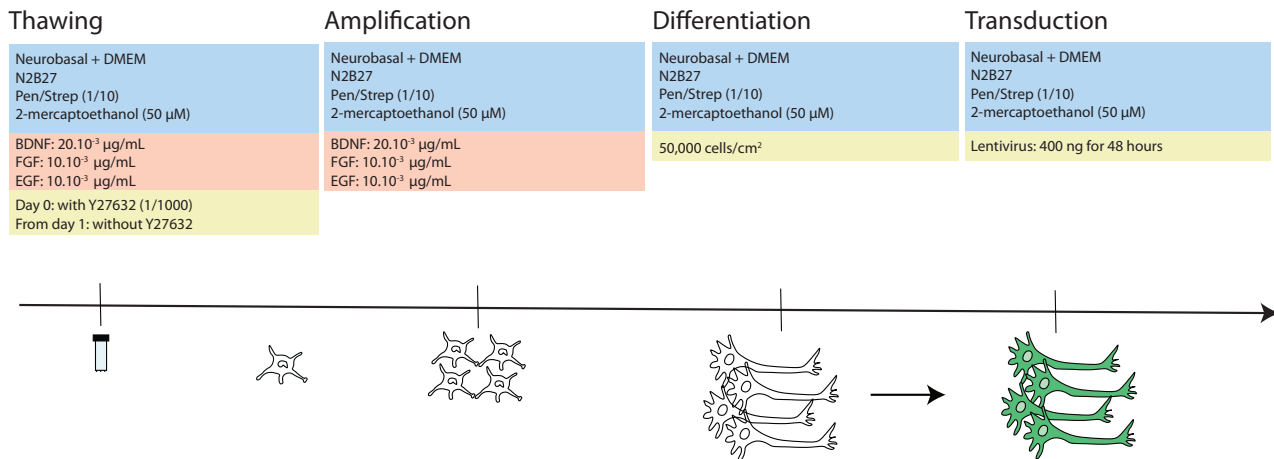
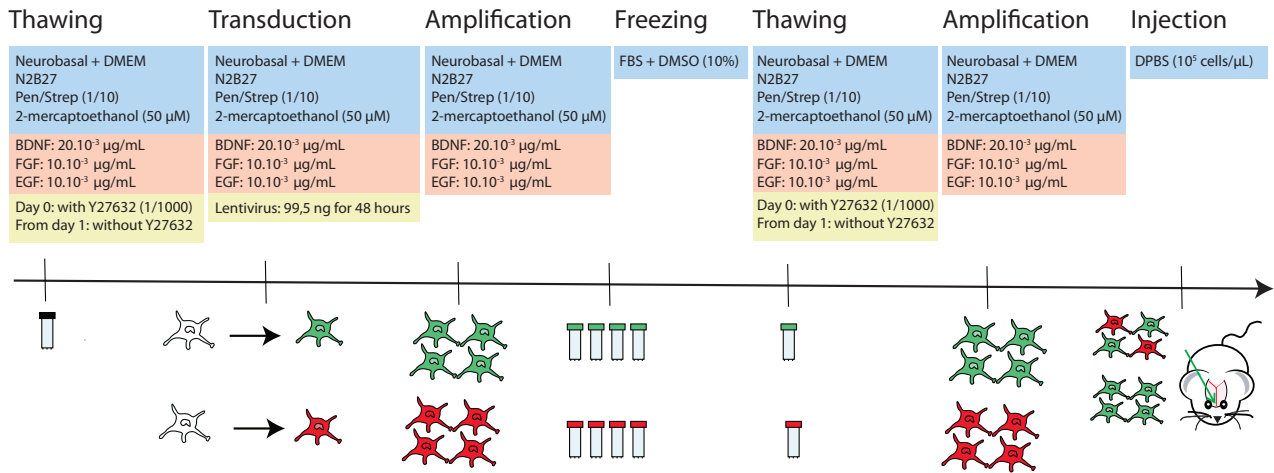
¹Human Genetics and Cognitive Functions, CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Université de Paris, Institut Pasteur, Paris, France. ²Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, CNRS UMR 3571 « Genes, Synapses and Cognition », Institut Pasteur, Paris, France.

³Collège doctoral, Sorbonne Université, Paris, France.

*Correspondence and requests for materials should be addressed to I.C.-T. (email: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr)

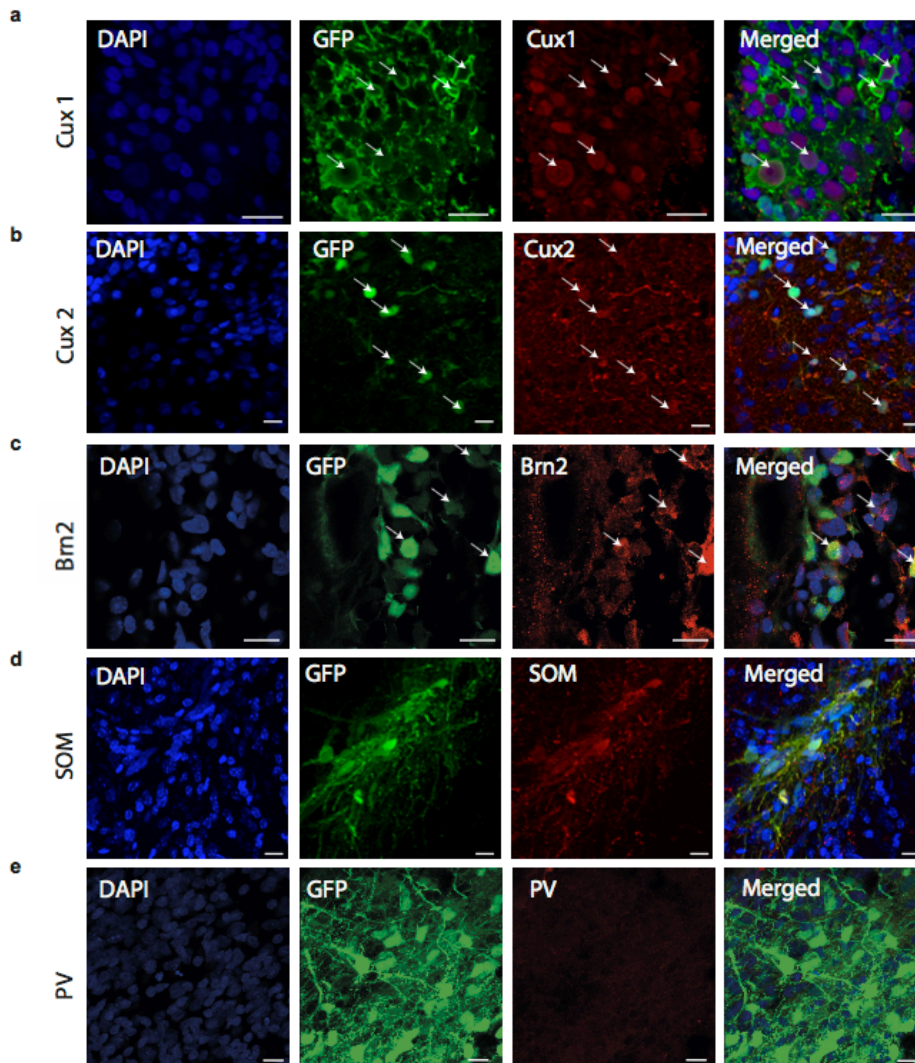
Supplementary Figure 1:

Culture steps for the *in vitro* and *in vivo* analysis of iPSC-derived neuronal precursors (NPC).



Supplementary Figure 2:

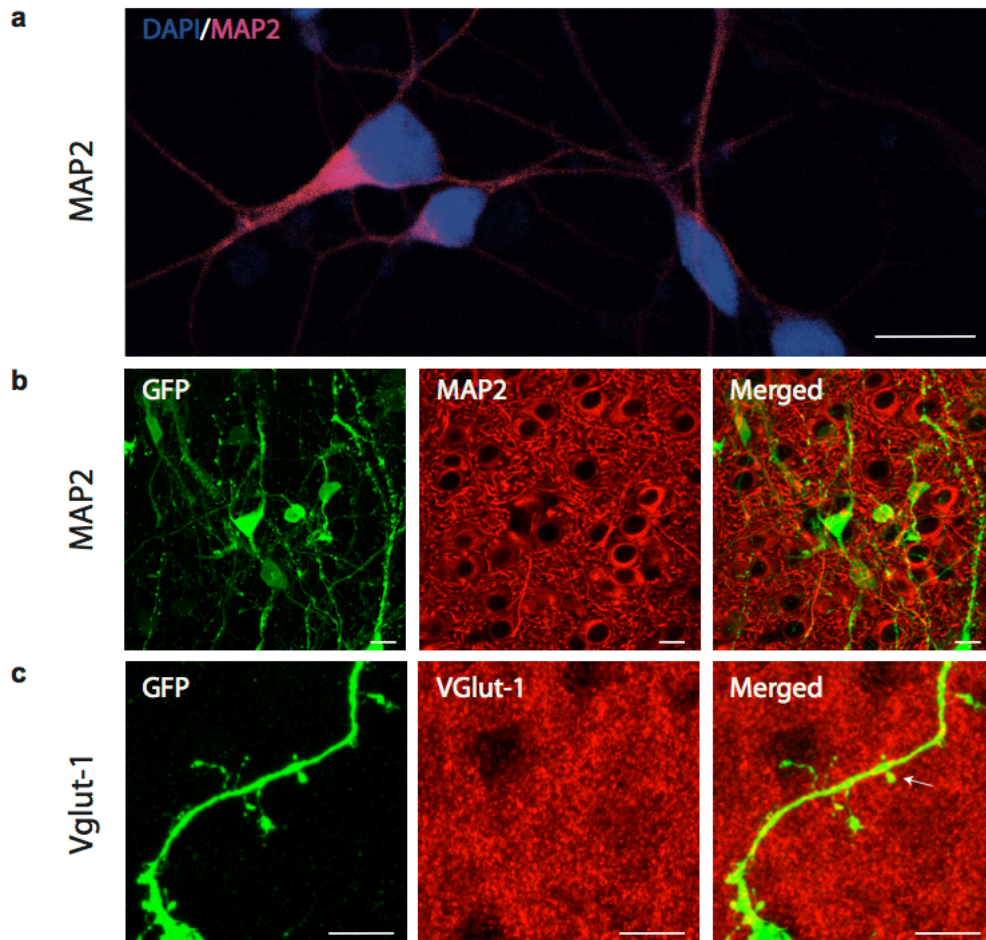
Immunofluorescence staining of human iPSC-derived neurons transplanted into the brain cortex of newborn mice, at 60-80 days post-transplantation.



Legend to Supplementary Figure 2: Immunofluorescence staining of human iPSC-derived neurons transplanted into the brain cortex of newborn mice, at 60-80 days post-transplantation. (a-c) Immunofluorescence staining of grafted GFP-cells with Cux1, Cux2 and Brn2 antibodies, markers of the cortical layers II-IV. Cellular co-labeling of transplanted human cells which shows the expression of Cux1, Cux2 and Brn2 markers in human neuronal cells. (d-e) Immunofluorescence staining of grafted GFP-cells with Parvalbumin (PV) and Somatostatin (SOM) antibodies that are selective markers of interneurons. Cellular co-labeling shows the presence of human SOM positive cells but the human PV cells are absent. Scale bars = 15 μ m.

Supplementary Figure 3:

Immunofluorescence staining of human iPSC-derived neurons either kept *in vitro* or transplanted into the mouse brain cortex.

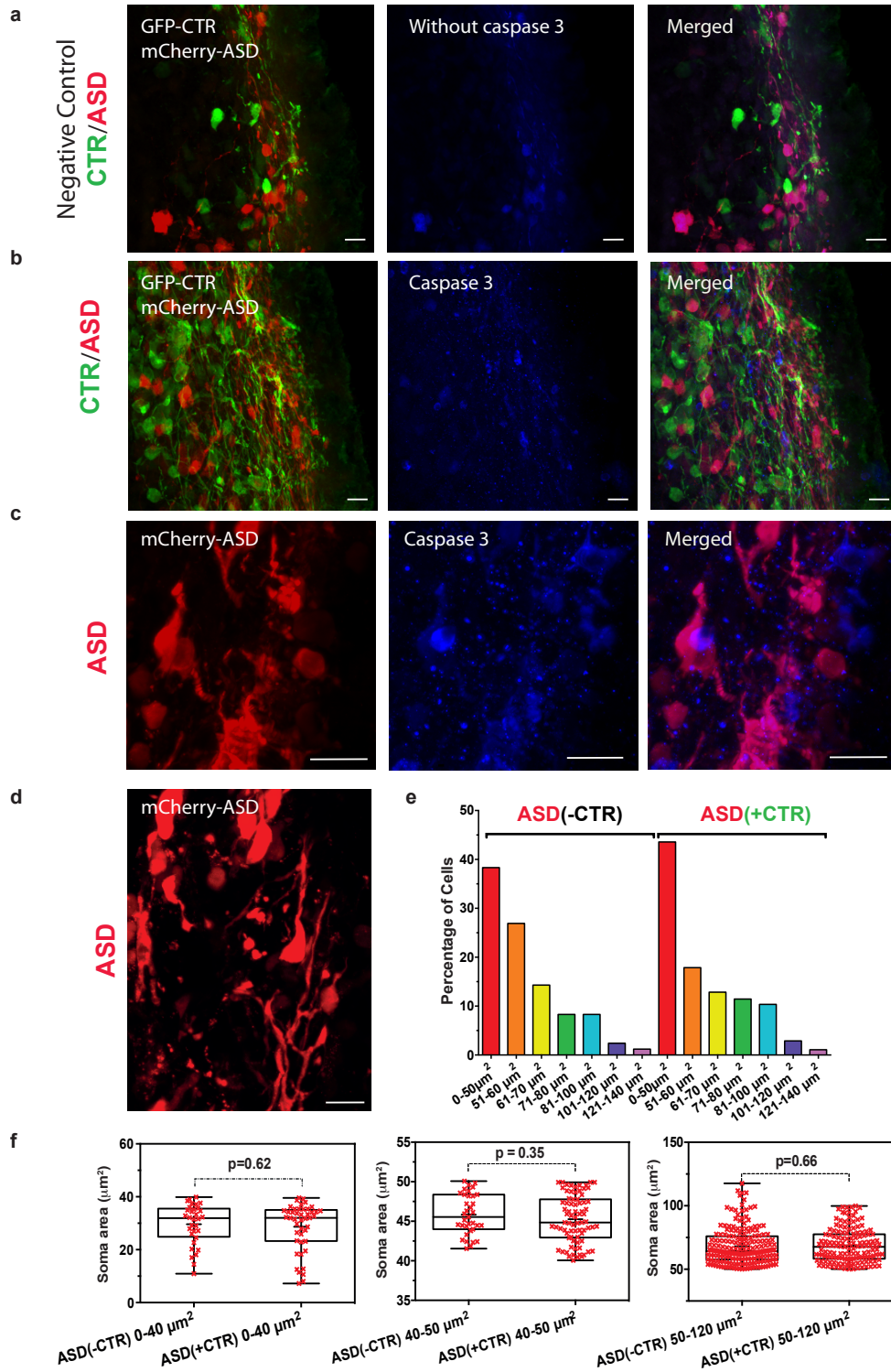


Legend to Supplementary Figure 3: Immunofluorescence staining of human iPSC-derived neurons either kept *in vitro* or transplanted into the mouse brain cortex.

(a) Immunofluorescence staining of cultured human control iPSC-derived cortical neurons by MAP2 antibody at 24 days after NPC differentiation. MAP2 antibody labels the perikaryal and dendrites of neuronal cells. (b) MAP2 staining of GFP-labeled human cells transplanted into the brain cortex of newborn mice, at 7 months post-transplantation. (c) Vglut-1 staining of GFP-labeled human cells transplanted into the brain cortex of newborn mice, at 7 months post-transplantation. Vglut-1 antibody is a selective marker of excitatory glutamatergic neurons. Target indicates the presence of human Vglut-1 positive cells within the mouse brain. Scale bars = 15 μ m.

Supplementary Figure 4:

Immunofluorescence staining of human iPSC-derived neurons transplanted into the brain cortex of newborn mice, at 30 days post-transplantation.



Legend to Supplementary Figure 4: Immunofluorescence staining of human iPSC-derived neurons transplanted into the brain cortex of newborn mice, at 30 days post-transplantation.

(a-b) Immunofluorescence staining of co-transplanted control GFP- and ASD mCherry cells labeled with Caspase-3 antibody, a marker of cell apoptosis. Negative control was performed in the absence of primary antibody. Despite some background staining, no well-defined focal nuclear labeling of Caspase-3 is detected within human cells (c) Immunofluorescence staining of transplanted mCherry cells labeled with Caspase-3. (d) Immunofluorescence staining of mCherry labeled human ASD neurons within a cortical transplant. (e-f) Comparative classification and measurement of soma areas between ASD cells transplanted either alone or with control cells. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. Scale bars = 15 μ m.

Table S1: List and references of products.

PRODUCT	REFERENCE	SUPPLIER
Cell culture		
Neurobasal™	21103-049	Gibco
DMEM/F-12 (1:1)+ GlutaMAX™ -I	31331-028	Gibco
B27® -Supplement (100X)	12587-010	Gibco
N2 - Supplement (50X)	17502-048	Gibco
2-Mercaptoethanol 50 mM	31350-10	Gibco
DPBS (1X)	14190-094	Gibco
Pen Strep	15140-148	Gibco
Poly L-ornithine	P4957	Sigma Aldrich
Laminine	23017-015	Invitrogen
Geltrex	A14133_02	Gibco
Y27632	04-0012-02	Stemgent
BDNF	450-02 100µg	Peprotech
EGF	AF-100-15-500 µg	Peprotech
FGF-basic	100-18b-50µg	Peprotech
DMSO	D2438	Sigma Aldrich
0,05% Trypsin-EDTA (1X)	25300-054	Gibco
FBS	P30-3306	PAN Biotech
Immunofluorescence		
Triton® X-100	X100 1L	Sigma Aldrich
Donkey serum	D9663	Sigma Aldrich
DAPI (1mg/ml)	62248	Thermoscientific
Prolong™ Gold antifade reagent	P36930	Invitrogen

Table S2: Commercial antibodies used for immunofluorescence labeling.

Antibodies	HOST	REFERENCE	SUPPLIER	DILUTION
Primary Antibodies				
GFP	Rabbit	A6455	Invitrogen	1/750
GFP	Chicken	13970	Abcam	1/2000
mCherry	Rat	M11217	Invitrogen	1/500
Cux1	Mouse	ab54583	Abcam	1/500
Cux2	Rabbit	bs-1182R	Bioss	1/50
SOM	Mouse	sc-5565	Santa Cruz Biotechnology	1/500
PV	Rabbit	PV27	Swant	1/500
MAP2	Mouse	sc-5359	Santa Cruz Biotechnology	1/200
Vglut-1	Rabbit	135 303	Synaptic System	1/500
Caspase-3	Rabbit	9661S	Cell Signaling	1/300
Secondary Antibodies				
Anti Rabbit Alexa 488	Donkey	A21206	Invitrogen	1/200
Anti Rat Alexa 594	Donkey	A21209	Invitrogen	1/200
Anti Rabbit Alexa 594	Donkey	A21207	Invitrogen	1/200
Anti Chicken Alexa 488	Goat	A11039	Invitrogen	1/200
Anti Mouse Alexa 594	Goat	A11005	Invitrogen	1/200
Anti Rabbit Alexa 647	Goat	A21244	Invitrogen	1/200

DISCUSSION

Les TSA sont des troubles complexes caractérisés par une grande variabilité de symptômes et à ce jour aucun traitement n'est connu pour en soigner les déficits majeurs. Les recherches scientifiques démontrent l'existence d'une forte composante génétique dans les TSA, avec la découverte de gènes codant des protéines impliquées directement dans la communication des neurones dans le cerveau. Actuellement, plus de 900 gènes ont été impliqués dans les TSA mais la plupart ne possèdent qu'un faible effet sur leur développement, ce qui représente un défi pour le développement de traitements efficaces. D'autres gènes ont au contraire un fort impact. C'est le cas du gène codant la protéine SHANK3 qui participe au maintien de l'échafaudage moléculaire post-synaptique dans les épines dendritiques.

Afin de mieux comprendre le rôle de SHANK3 dans le développement des TSA, il est possible, grâce au modèle des iPSC d'étudier les conséquences de mutations directement dans les neurones de patients autistes, porteurs de la version modifiée du gène altéré. Ce modèle permet de conserver le fond génétique des patients, ce qui est essentiel lors de l'étude de maladies aussi complexes que les TSA, pour lesquelles l'expression de l'ensemble des variations génétiques portées par le patient peut moduler les effets des mutations touchant le gène d'intérêt. La dérivation des iPSC dans le type cellulaire approprié pour l'étude des TSA constitue donc un modèle pertinent pour l'étude de l'impact des mutations de SHANK3.

Caractérisation du modèle in vitro

Le protocole de dérivation utilisé au cours de cette thèse permet l'obtention de cultures composées d'environ 80% de neurones glutamatergiques excitateurs et de 15 à 20% de neurones gabaergiques inhibiteurs (Boissart *et al*, 2013, Gouder*, Vitrac* *et al*, 2019), ce qui correspond aux proportions physiologiques retrouvées dans le cerveau humain. D'autres protocoles aboutissent à des proportions similaires (Vazin *et al*, 2014; Jin-Chong Xu *et al*, 2017).

Ces neurones appartiennent majoritairement aux couches corticales superficielles comme le témoigne l'expression des marqueurs CUX1, CUX2, BRN1 et BRN2 observé par le laboratoire de I-Stem, au sein duquel la production des cellules souches neurales a été réalisée pour notre étude (Boissart *et al*, 2013). Il a été montré que les protéines codées par les facteurs génétiques de risques des TSA sont majoritairement exprimés au niveau des neurones des couches corticales superficielles (Parikshak *et al*, 2013). D'autre part, cette catégorie de neurones d'association cortico-corticale est impliquée dans les fonctions cognitives et apparaît donc intéressante à étudier dans le cadre de la modélisation des TSA (Hutsler *et al*, 2005). Les patients inclus dans l'étude présentent des déficiences intellectuelles sévères, ces neurones pourraient donc participer au développement de leur phénotype, ce qui justifie d'autant plus leur analyse dans ce projet (Leblond *et al*, 2014; Gouder*, Vitrac* *et al*, 2019).

Une quantité variable d'astrocytes est également présente selon le temps de maintien des cellules en culture. Cette catégorie de cellules présente dans le cerveau est produite à partir du même pool de cellules (les cellules de glie radiaire) que les neurones corticaux excitateurs (Noctor *et al*, 2004). Les astrocytes apparaissent plus tardivement que les neurones car ils sont générés après un nombre de divisions cellulaire plus élevé. Ces derniers sont peu nombreux en début de culture. Après 7 jours, ils ne représentent en effet qu'environ 1% de la totalité des cellules. Leur quantité augmente au cours du temps démontrant le maintien de leur capacité à se diviser dans le milieu de culture. Leur présence est importante à prendre en compte car ce type cellulaire intervient dans divers aspects de la maturation neuronale (Song *et al*, 2002; Clarke & Barres, 2013).

Il a par exemple été montré qu'un substrat astroglial permet d'accélérer le neurodéveloppement (Shecheglovitov *et al*, 2013; Prè *et al*, 2014; Burke *et al*, 2020). Une autre étude réalisée sur des hiPSC a mis en évidence que la présence d'astrocytes permet de synchroniser l'activité des cellules (Tukker *et al*, 2018). Cette présence pourrait ainsi exercer une influence sur l'environnement local dans lequel les neurones se développent. Enfin, d'autres équipes ont incriminé un rôle des astrocytes dans des troubles liés aux TSA, dont le syndrome de Rett et la trisomie 21 (Marchetto *et al*, 2010). Néanmoins les astrocytes exprimant SHANK3, une source additionnelle de complexité s'ajoute pour l'interprétation des résultats (figure 27). Une étude a montré que des modèles de souris invalidées pour le gène Shank3 ne présentaient pas de modification du nombre d'astrocytes (Cope *et al*, 2016). Pour autant, cela ne signifie pas que la version mutée de SHANK3 ne puisse pas modifier la façon dont ces astrocytes interfèrent avec les neurones. De plus, ces derniers sont majoritaires dans le cerveau humain ce qui n'est pas le cas dans notre modèle. La modification de leur proportion dans les cultures analysées pourrait alors également biaiser les résultats observés.

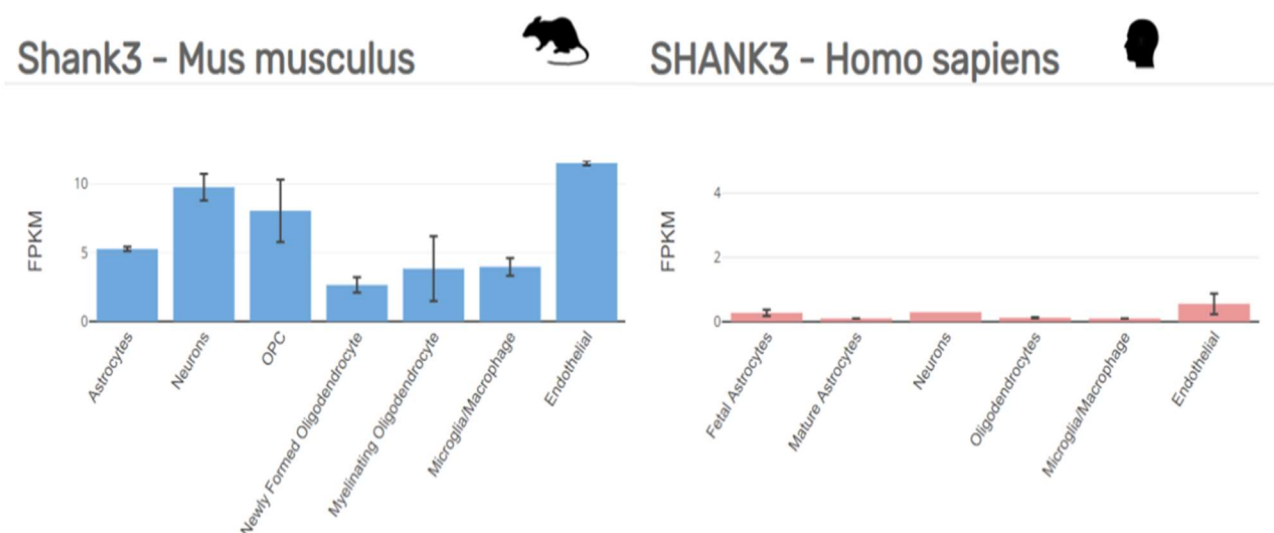


Figure 27 : Expression de SHANK3 chez la souris et l'humain dans les différentes catégories cellulaires cérébrales.

(a) Résultats de séquençage complet d'ARN réalisé dans diverse populations cellulaires purifiées à partir du cortex de souris (astrocytes, neurones, OPC (précurseurs des oligodendrocytes),

oligodendrocytes nouvellement formés, oligodendrocytes matures (myélinisant), microglie, cellules endothéliales). (b) Résultats de séquençage complet d'ARN réalisé dans diverse populations cellulaires purifiées à partir d'extrait corticaux humains récupérés au cours de chirurgies (astrocytes fœtaux, astrocytes matures, neurones, oligodendrocytes, microglie, cellules endothéliales). Les données concernant SHANK3 ainsi que plus de 22 000 autres gènes sont accessibles sur le site internet <https://www.brainrnaseq.org/> et ont été obtenues dans les travaux de Zhang et al (2014) pour la souris et dans les travaux de Zhang et al (2016) pour l'humain (Zhang et al, 2014, 2016b).

Une observation supplémentaire révèle la présence de deux types de distribution des astrocytes au sein des cultures : dans certaines régions les astrocytes sont dispersés autour des neurones alors que dans d'autres régions ces derniers sont organisés en colonies (figure 28). A l'intérieur de ces colonies, les astrocytes arborent une morphologie atypique avec des prolongements plus courts (figure 28). Ce constat est particulièrement intéressant car cette disposition des astrocytes pourrait aussi influencer l'activité électrique des neurones (Sasaki *et al*, 2011).

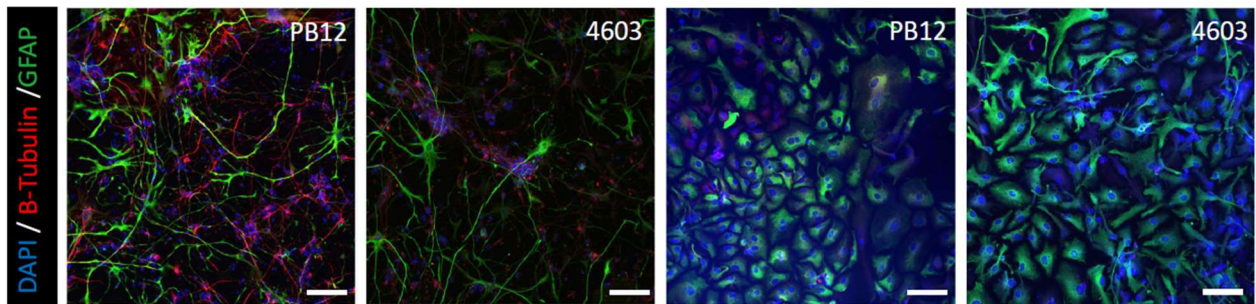


Figure 28 : Distributions des astrocytes humains au sein des cultures *in vitro*

Marquages immunologiques contre la GFAP, un marqueur des astrocytes, des cultures cellulaires de deux individus contrôles, maintenues 40 jours in vitro. L'échelle représente 100µm. Deux types d'organisation des astrocytes sont illustrés par ces données : une organisation dispersée et une organisation en colonie. Les astrocytes dispersés dans les cultures présentent de longs prolongements, tandis que ceux organisés en colonies sont caractérisés par une absence de prolongements.

Par ailleurs, le développement de ces neurones paraît reproductible car sur trois cultures différentes d'une même lignée, aucune variabilité n'a été décelée sur 4 paramètres mesurés : la longueur totale des neurites, la longueur du plus long neurite, le nombre de points de ramifications et le nombre d'extrémités. L'analyse de la synaptogenèse a démontré la formation du compartiment pré-synaptique après 15 jours de différenciation *in vitro*, tandis que le compartiment post-synaptique commence à apparaître aux alentours des 30 jours. Ces données sont difficilement comparables à celles obtenues par d'autres protocoles car le début de la différenciation neuronale n'est pas défini de la même manière selon les études. Néanmoins, l'ordre d'apparition des compartiments pré et post-synaptique sont en accord avec des résultats obtenus précédemment sur des cultures primaires de neurones glutamatergiques de rongeurs (Friedman *et al*, 2000; Okabe *et al*, 2001).

Analyse de l'expression de SHANK3

Les mutations dans SHANK3 sont en général très délétères et entraînent un TSA à l'état hétérozygote, en raison d'une haploinsuffisance de SHANK3. Dans la partie *in vitro* de ce projet, 4 patients diagnostiqués autistes à l'hôpital Robert Debré de Paris ont été inclus. Ils sont tous porteurs d'une mutation *de novo* hétérozygote tronquante dans l'exon 21 de SHANK3. Au niveau protéique, ces mutations ciblent le domaine riche en prolines de SHANK3 impliqué dans l'interaction de SHANK3 avec les protéines HOMER et Cortactine. Deux de ces mutations sont des substitutions non-sens générant un codon stop prématuré (mutation E809X et Q1142X). La troisième mutation est une délétion de deux nucléotides (L1142Vfs*153), tandis que la quatrième mutation correspond à une insertion de cinq nucléotides (G1271Afs*15), produisant ainsi toutes deux un décalage du code de lecture avec apparition d'un codon stop prématuré.

En théorie, les ARN porteurs d'un codon stop prématuré sont éliminés par le mécanisme du NMD (Non sense mediated decay). Pourtant, nos données de séquençage par Sanger des cDNA indiquent que la mutation est encore présente au stade ARN en quantité équivalente à celle de l'allèle sauvage. Le mécanisme du NMD apparaît donc non fonctionnel dans les cellules des patients, ce qui rejoint l'hypothèse selon laquelle ce système serait inactivé pendant le neurodéveloppement (Nickless *et al*, 2017). D'autres facteurs peuvent moduler l'efficacité des mécanismes du NMD comme la longueur des séquences 3'UTR, la longueur des exons dans lesquels sont situés les codons stop prématurés et la longueur des séquences codantes (Decourty *et al*, 2014; Lindeboom *et al*, 2016). Nos données suggèrent ainsi que les formes protéiques tronquées de SHANK3 pourraient être exprimées dans les neurones des patients. Les mutations portées par les 4 patients de notre étude étant localisées dans le domaine riche en prolines, on peut alors supposer que seuls ce domaine ainsi que le domaine SAM sont moins exprimés dans les neurones des patients.

Avant d'analyser les conséquences des mutations dans SHANK3, il est important d'évaluer son niveau d'expression afin d'identifier quelles isoformes sont présentes dans les neurones des patients et en quelle quantité. La meilleure approche est de quantifier l'expression des protéines. Il a ainsi été possible de constater que la protéine SHANK3 est exprimée dès le stade NSC (Neural stem cell). Cette observation reflète les données de l'Allen Brain Atlas indiquant une expression prénatale de SHANK3 (figure 9). La présence de multiples signaux visualisés grâce à 7 anticorps distincts dans les neurones des individus contrôles, ainsi que chez ceux des patients laisse suggérer l'expression de différentes isoformes de SHANK3 (données non présentées). Néanmoins, il a été difficile d'étendre cette analyse quantitative, en raison d'un manque de reproductibilité entre les différents anticorps commerciaux testés et du manque de connaissances concernant les poids moléculaires relatifs aux isoformes sauvages et tronquées de SHANK3 chez l'humain. Il serait fortement utile de développer des anticorps capables de reconnaître spécifiquement les différentes isoformes de SHANK3. L'expression de SHANK3 a donc été exclusivement mesurée, dans cette étude, au niveau des ARN.

Nous avons ainsi montré par deux approches que l'ARNm de *SHANK3* des patients était réduit de 25 à 50%. Dans la technique de digital droplet PCR, l'échantillon sous forme d'ADNc est partitionné en approximativement 20 000 gouttelettes et la quantification se base sur une loi de poisson. Cette technique permet d'obtenir des résultats plus précis et plus reproductibles que la PCR quantitative classique (Taylor *et al*, 2017). La diminution de l'expression de *SHANK3* a été observée aussi bien par la PCR ciblant une région au niveau de l'exon 21 porteur des mutations tronquantes que par les PCR ciblant la partie N-terminale de *SHANK3*. Ces résultats semblent à première vue étonnants si on considère que les formes tronquées de *SHANK3* sont exprimées dans les neurones des patients. Néanmoins le séquençage complet des ARN a permis, en plus de confirmer la baisse d'expression des ARN de *SHANK3* dans les neurones des patients, d'apporter des informations complémentaires à notre analyse. En particulier, cette approche a révélé que parmi les gènes les moins exprimés dans les cellules des patients, il y a un enrichissement des gènes synaptiques régulés par la protéine FMRP. Aucun enrichissement n'a été observé pour les gènes de ménage exprimés dans l'ensemble du neurone. Ces résultats seront discutés dans la sous-partie suivante à la lumière des données relatives aux épines dendritiques.

Impact de SHANK3 sur la spinogénèse in vitro

Pendant le développement et tout au long de la vie d'un individu, les épines dendritiques jouent un rôle essentiel en permettant aux neurones de se connecter entre eux et de véhiculer des messages électriques et chimiques. La formation des épines dendritiques se produit pendant l'enfance. En parallèle, les nouvelles synapses formées sont soumises à l'environnement et certaines d'entre elles finissent par disparaître par manque de stimulation. A l'âge adulte, les épines dendritiques utilisent leurs propriétés plastiques pour se modifier et adapter leur morphologie aux signaux extra-cellulaire et intra-cellulaire (Gipson & Olive, 2017). C'est cette plasticité qui est à l'origine des mécanismes d'apprentissages. Une altération de ces mécanismes à un stade donné peut alors aboutir à des déficits cognitifs et à divers troubles neurologiques. Ainsi, de nombreuses maladies neuropsychiatriques sont caractérisées par des altérations des capacités intellectuelles, parmi lesquelles on peut citer la schizophrénie, la maladie d'Alzheimer et les TSA. La manifestation de ces troubles varie en fonction de la période où apparaissent les dysfonctions des épines dendritiques : enfance pour les TSA, adolescence pour la schizophrénie et adulte pour la maladie d'Alzheimer (Penzes *et al*, 2011).

SHANK3 est exprimé au cœur des épines dendritiques et interagit avec de nombreuses autres protéines synaptiques. *SHANK3* permet ainsi de relier entre eux, les divers acteurs de la transmission synaptique. Du fait de son interaction avec les protéines du cytosquelette d'actine, *SHANK3* a aussi été impliqué dans la formation et la plasticité des épines dendritiques.

Un grand nombre d'études *in vitro* ont analysé les conséquences de mutations dans *SHANK3* sur la formation et la morphologie des épines dendritiques. L'une d'entre elles a mis en évidence une

spécificité des altérations observées selon le domaine protéique de SHANK3 muté. Ainsi lorsque le domaine PDZ est muté cela induit une baisse de la densité des épines dendritiques tandis que lorsque le domaine Ank est muté cela induit une diminution du volume de la tête des épines (Roussignol *et al*, 2005). A ce jour, seul un modèle de souris mutées sur le domaine riche en prolines a été généré, mais aucune anomalie des épines dendritiques n'a été détectée sur ce modèle et ce malgré l'homozygotie de la mutation entraînant l'absence des isoformes majeurs de Shank3 (Kouser *et al*, 2013; Speed *et al*, 2015). De plus, la majorité des modèles iPSC ciblés sur SHANK3 a porté sur l'analyse de cellules de patients PMDS pour lesquels la séquence entière du gène SHANK3 est absente (Shcheglovitov *et al*, 2013). Dans l'étude de Kathuria *et al* les patients avec TSA sont porteurs de délétions dans SHANK3 entraînant, là encore, une hémizygotie du gène *SHANK3* car la délétion touche l'ensemble des domaines (Kathuria *et al*, 2018).

Notre étude se distingue donc des études précédentes par le fait que les mutations des patients inclus se localisent dans le domaine riche en prolines. Par ailleurs, la présence de la mutation au niveau des ARN suggère que les formes tronquées des isoformes SHANK3 pourraient être exprimées et moduler le phénotype par opposition aux études menées sur les patients hémizygotés pour SHANK3.

L'analyse approfondie des épines dendritiques a été effectuée par une méthodologie développée au laboratoire et basée sur l'utilisation du logiciel Imaris (Gouder *et al*, 2015). Elle a permis de montrer une réduction de 50 % de la densité des épines dendritiques ainsi que diverses modifications de leur morphologie en 3D. Dans notre étude, la taille des épines n'est pas significativement différente. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés à partir de divers modèles de souris ou rats exprimant une version mutée de Shank3 (Durand *et al*, 2012; Bidinosti *et al*, 2016), chez des souris portant une délétion dans Shank3 (Mei *et al*, 2016; Guo *et al*, 2019) ainsi que dans les neurones de patients PMDS (Shcheglovitov *et al*, 2013). Ils permettent en outre d'expliquer les déficits liés à la connectivité et à la transmission synaptique observés chez plusieurs patients avec TSA.

Nos données indiquent également que les 4 principales catégories d'épines dendritiques sont représentées sur les neurones des individus contrôles et des patients avec TSA. La figure 29 illustre les paramètres morphologiques utilisées pour distinguer les différents types d'épines dendritiques. Néanmoins, dans nos conditions, il a été constaté une proportion plus importante de filopodia à la fois sur les neurones des patients et sur ceux des individus contrôles, suggérant la présence de neurones encore immatures. La répartition des différentes classes d'épines dendritiques se démarque cependant chez un patient qui présente une proportion de filopodia significativement réduite par rapport aux trois autres patients. Il serait intéressant de pouvoir relier les anomalies synaptiques détectées chez ce patient au phénotype électrophysiologique de ses neurones.

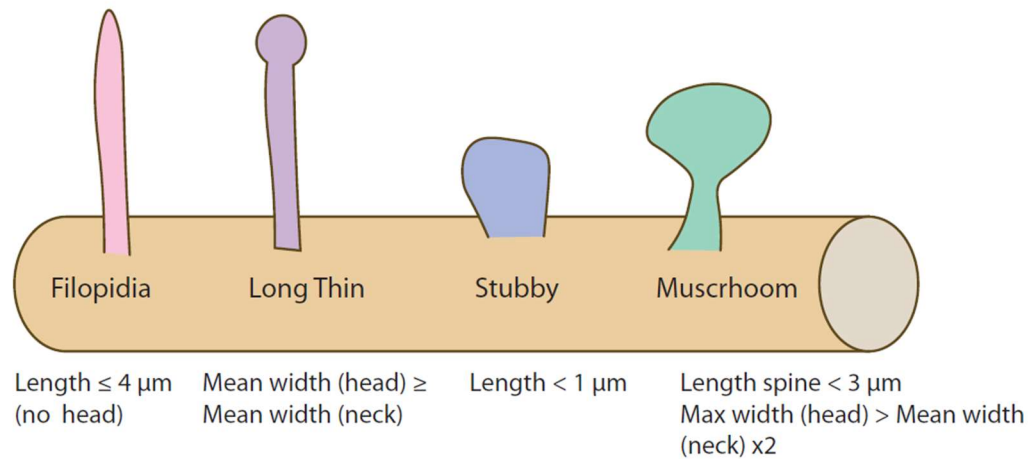


Figure 29 : Paramètres morphologiques des différentes classes d'épines dendritiques

Représentation des divers paramètres morphologiques utilisés dans notre étude pour distinguer les différentes classes d'épines dendritiques et décrits dans l'article de Gouder et al (2015)

De nombreuses études ont été réalisées précédemment pour étudier le rôle de SHANK3 dans la spinogénèse, mais la plupart d'entre elles correspond à des analyses en 2D (Roussignol *et al*, 2005; Durand *et al*, 2012). Selon l'orientation de l'épine non sphérique dans le plan, certaines informations concernant la présence, la morphologie ou la longueur des épines dendritiques, peuvent être biaisée ou absentes. L'analyse en 3D permet de plus d'élargir les paramètres étudiés en incluant des mesures relatives au volume des différentes parties de l'épine. En particulier, nous avons observé une réduction significative du volume de la tête des épines, ainsi qu'une diminution significative de leur volume total. Les anomalies des épines dendritiques observées dans notre étude pourraient être la conséquence d'une diminution de l'expression du domaine SAM à l'origine de la dimérisation des protéines SHANK3 et du domaine riche en proline qui permet une interaction indirecte des protéines SHANK3 avec les récepteurs mGluR5 et avec le cytosquelette d'actine. Ce dernier, de par sa nature dynamique, est étroitement lié à la morphologie des épines dendritiques et il serait alors également intéressant d'évaluer la localisation ainsi que l'activité des protéines impliquées dans les réactions de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine qui pourraient être moins fonctionnelles dans les neurones des patients.

Nos résultats confortent ainsi l'idée que les TSA sont des maladies liées aux synapses via des mécanismes impliquant les protéines SHANK3.

Ces observations donnent, en outre, un éclairage sur la baisse du niveau d'ARN de SHANK3 détectée dans les cellules des patients. Afin de réguler la traduction des protéines synaptiques et de les synthétiser rapidement en réponse à une activité électrique, les ARN de ces protéines sont transportés vers les épines dendritiques et sont traduits localement grâce à un mécanisme impliquant les protéines FMRP (Kao *et al*, 2010). Il en résulte une localisation spécifique des ARNm de ces protéines au niveau des épines dendritiques. La diminution des transcrits de SHANK3 pourrait ainsi être liée à la réduction

de la densité des épines dendritiques et du volume de leur tête. Les données obtenues sur l'expression des protéines synaptiques régulées par les protéines FRMP tendent en ce sens. L'observation, sur des neurones dérivés d'iPSC d'un patient avec autisme portant une microdélétion de SHANK3, d'une baisse des ARN de SHANK3 au niveau dendritique par rapport aux neurones d'un individu contrôle et d'un niveau similaire de ces ARN au niveau du soma appuie également cette hypothèse (Taylor *et al*, 2018).

Afin de limiter les variabilités interindividuelles fréquemment relevées lors de l'analyse de cellules dérivées d'iPSC, nous avons inclus, dans cette étude, 4 patients ainsi que 3 contrôles dont les fibroblastes ont été reprogrammés en iPSC au laboratoire d'I-Stem. En effet, un nombre minimum d'individus est requis pour obtenir un pouvoir statistique suffisant pour la détection de différences significatives entre un échantillon de cas comparé à un échantillon de témoins. Certaines équipes concentrent leur analyse sur un nombre restreint d'individus par échantillon (1 ou 2) en intégrant plusieurs clones (Shecheglovitov *et al*, 2013). Une étude publiée récemment a toutefois démontré qu'une augmentation du nombre de clones n'est pas toujours optimale et nécessite un minimum de 3 individus par groupe ainsi qu'une approche statistique intégrant l'interdépendance des clones (Germain & Testa, 2017). Lorsque seul un clone est étudié, il est recommandé d'utiliser au moins 4 individus par échantillon (Germain & Testa, 2017). C'était l'objectif initial de notre étude car au moment de la conception du projet, 4 patients et 5 individus contrôles étaient envisagés. Malheureusement, pour 2 des individus contrôles inclus, les protocoles de reprogrammation et de dérivation n'ont pas permis d'obtenir des résultats cohérents avec les trois autres individus et ceux-ci ont donc été écartés des analyses. Une autre approche pour améliorer le pouvoir statistique de telles études consiste à utiliser les individus apparentés des patients comme contrôles. Ceux-ci partageant une plus grande proportion du génome du patient, la variabilité causée par le fond génétique est ainsi réduite. La meilleure stratégie reste cependant l'inclusion de contrôles isogéniques grâce au rétablissement de la version sauvage du gène muté dans les cellules des patients, par le moyen d'outils génétiques comme CRISPR/cas9 ou la méthode des TALENS (Germain & Testa, 2017; Volpato *et al*, 2018).

Conclusions sur l'approche in vitro

Les études réalisées *in vitro* de ce projet ont permis de montrer une diminution des taux d'ARN de SHANK3 dans les cellules des patients corrélés à différentes altérations morphologiques des épines dendritiques. Les 4 patients présentent une diminution de la densité des épines dendritiques et de leur morphologie, rendant ainsi ce phénotype robuste dans le cas des TSA caractérisés par des mutations dans SHANK3. Les neurones pyramidaux des couches superficielles analysés dans cette étude développent des projections intracortico-corticales associationnelles sur de longues distances. La baisse de la densité des épines dendritiques pourrait donc expliquer les déficits corticaux et, en particulier,

l'hypoconnectivité associationnelle longue mesurée chez les patients avec TSA. Néanmoins, les analyses sont limitées par l'aspect 2D du système de culture *in vitro* utilisé dans notre projet.

Une structure 3D peut être apportée par diverses approches. L'une d'entre-elles consiste à recréer des mini-cerveaux grâce aux protocoles de dérivation d'organoïdes. Ces derniers ont été employés afin de modéliser les TSA à des stades précoces et ont mis en évidence des anomalies de la prolifération cellulaire et de la balance excitation/inhibition (Mariani *et al*, 2015; Jong *et al*, 2019). Cependant, les cellules se développant au centre des organoïdes font face à un manque de nutriments et d'oxygène, ce qui altère certaines étapes de leur développement. Cela est dû à l'absence de vascularisation difficile à reproduire dans ces systèmes. Bien qu'il existe aujourd'hui divers moyens de résoudre ces problèmes (Grebenyuk & Ranga, 2019), une autre stratégie pour analyser le neurodéveloppement humain dans un environnement en 3D correspond à la transplantation de cellules humaines dans le cerveau de souris.

Ainsi, afin d'étudier le neurodéveloppement humain dans un contexte *in vivo*, nous avons mis en place un modèle de xénotransplantation. Ce modèle a ensuite été appliqué au cas des TSA via l'analyse de mutations dans SHANK3. En raison de la complexité de ce deuxième projet et de la durée de mon projet, nous avons choisi de n'étudier qu'un des trois individus contrôles et qu'un des quatre patients inclus dans la précédente étude. Les deux individus sélectionnés sont néanmoins représentatifs de leur groupe respectif dans le sens où chacun de ces deux groupes ont montré peu de variabilité interindividuelle dans les valeurs de la plupart des paramètres testés (Gouder*, Vitrac* *et al*, 2019).

Mise en place et caractérisation du modèle d'étude in vivo

Le modèle de transplantation offre un large panel d'options permettant d'adopter la meilleure stratégie selon la question posée par le projet. Les options à prendre en compte concernent :

- Le stade d'injection : Injection *in utero*, injection périnatale, injection chez l'adulte.
- Le site d'injection : Injection dans les ventricules, injection dans une région cérébrale spécifique.
- Le choix de l'animal hôte : Utilisation de lignées Immuno déficientes/Immuno compétentes sous traitement immunodépresseur.
- Le type de cellules injectées : ESC, iPSC, progéniteurs neuraux, neurones.

Il est en particulier important de bien choisir le moment où les cellules sont greffées dans le cerveau de l'animal hôte. Dans le cas de l'étude de maladies neurodéveloppementales, le moment de la greffe détermine les conditions, en termes de facteurs et de population cellulaire, dans lesquelles les cellules humaines vont se développer. Sur la base des données obtenues par l'équipe de Uwe Maskos, avec laquelle nous avons collaboré, une greffe au stade périnatal nous a paru pertinente pour l'analyse du développement de progéniteurs neuronaux greffés (D'Alessio *et al*, 2020, Raïs *et al*, article en

préparation). Un avantage de la greffe au stade périnatal est qu'à ce stade le crâne des souris est mou et transparent, ce qui facilite l'identification des repères anatomiques du cerveau (bregma, lambda) et permet d'éviter de passer par une étape chirurgicale pour percer le tissu osseux de l'animal, facilitant de ce fait la procédure d'injection.

Un grand nombre d'études sur les TSA ont relevé des altérations des mécanismes se tenant place pendant la période prénatale (Courchesne *et al*, 2020). Par ailleurs, certaines formes de TSA sont caractérisées par des profils transcriptionnels anormaux lors des étapes précoces du neurodéveloppement cortical et en particulier au stade NSC précédant la différenciation neuronale (Schafer *et al*, 2019). La greffe de cellules au stade progéniteurs neuronaux sans différenciation préalable nous permet donc de nous placer dans des fenêtres temporelles appropriées pour étudier l'impact de mutations dans SHANK3 sur le développement neuronal humain à des stades précoces.

Pour ce projet, les progéniteurs neuronaux ont été marqués par transfection d'un lentivirus exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Cette étape nous a permis de visualiser les cellules humaines dans le cerveau murin à différents stades de leur développement. Néanmoins il est important de noter, que selon le site d'intégration génomique du vecteur viral, l'expression de la GFP peut s'éteindre au cours de la différenciation (Muotri *et al*, 2005). Une approche alternative serait d'avoir recours à des cellules génétiquement modifiées pour exprimer la fluorescence (Real *et al*, 2018; D'Alessio *et al*, 2020).

De plus, afin d'éviter tout rejet de greffe et de s'assurer d'une intégration et d'un maintien des cellules humaines greffées sur de longues périodes, nous avons sélectionné la lignée de souris immunodéficientes NOD-SCID^{PRKD} pour recevoir la greffe. Cette lignée de souris a précédemment été utilisée dans plusieurs protocoles de greffes de cellules humaines dans le cerveau de souris. Ces travaux ont permis de démontrer que le neurodéveloppement humain pouvait être reproduit dans le cerveau de ces souris sans signes de rejet des cellules humaines greffées (Espuny-Camacho *et al*, 2013; D'Alessio *et al*, 2020), confortant notre choix pour ce modèle.

De la même façon, nous avons pu observer une bonne intégration des neurones humains au sein du cerveau murin et une survie jusqu'à des temps tardifs, pouvant atteindre les 12 mois. Les marquages immunologiques des neurones humains greffés ont permis de retrouver une identité corticale caractéristique des couches II à IV du cortex. Les progéniteurs neuronaux greffés peuvent aussi se développer en neurones inhibiteurs exprimant la Somatostatine. Par contre aucun interneurone de type Parvalbumine n'a été visualisé dans notre modèle. Des observations identiques ont été publiées cette année par l'équipe de Uwe Maskos à la suite de greffes de progéniteurs corticaux obtenus par un protocole distinct de celui utilisé dans notre étude (D'Alessio *et al*, 2020). L'absence d'interneurones Parvalbumine pourrait s'expliquer par un engagement des cellules qui ne permet pas la différenciation de ce type de neurones ou par le site d'injection ne réunissant pas tous les facteurs nécessaires à leur

différentiation. Il serait ainsi intéressant d'interroger la présence ou non d'interneurones exprimant la Parvalbumine *in vitro*, ou alors de comparer le devenir des progéniteurs neuronaux greffés dans différentes régions du cerveau murin ou greffés à différents stades développementaux de la souris. Une réduction de la Parvalbumine a été détectée chez des souris mutées sur Shank3 et lors d'analyses de cerveaux *post-mortem* d'individus avec TSA (Filice *et al*, 2016; Hashemi *et al*, 2017). Il serait ainsi intéressant de savoir si ce phénotype est reproduit chez les patients inclus dans notre étude.

Tout comme nous l'avons visualisé dans la partie *in vitro*, les progéniteurs neuronaux humains greffés sont capables de se différencier en astrocytes. Cela a été mis en évidence grâce à des immunomarquages ciblant la GFAP humaine spécifiquement (figure 30). Ces données montrent que la voie de différenciation des progéniteurs neuronaux suit un programme similaire *in vivo* comparé aux conditions *in vitro*. Nous avons observé, en outre, un agencement particulier des astrocytes probablement d'origine murine autour de la greffe avec des densités plus élevées que dans le reste de l'ensemble du cerveau de la souris (figure 27). Ceux-ci sont probablement recrutés au niveau de la greffe suite à l'introduction de l'aiguille d'injection dans le cerveau murin pour former ce qu'on appelle la cicatrice gliale (Silver & Miller, 2004). De fortes densités de cellules astrocytaires murines ont également été détectées au sein de la greffe humaine de nos collaborateurs (Raïs *et al*, article en préparation).

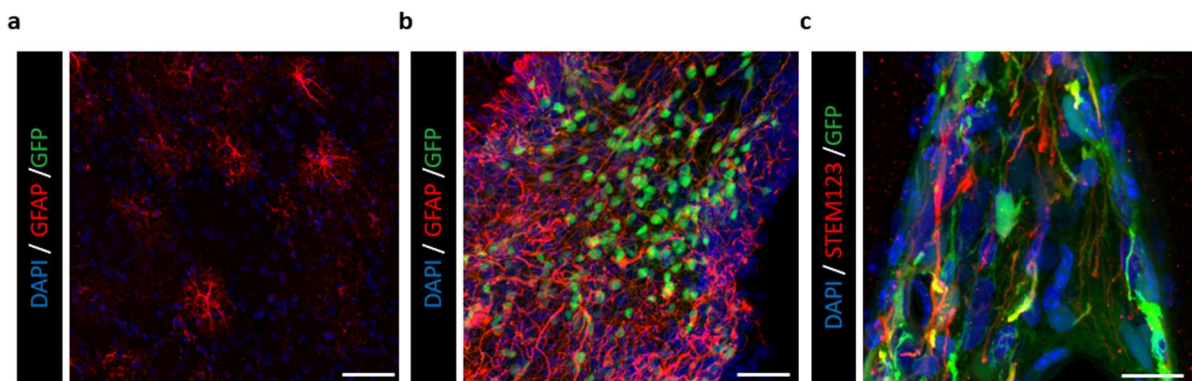


Figure 30 : Astrocytes humains et murins dans le cerveau de souris et dans la greffe humaine

Marquages immunologiques contre la GFAP, un marqueur des astrocytes. Visualisation des astrocytes (a) dans le cerveau murin et (b) autour de la greffe humaine. L'anticorps utilisé sur ces deux exemples marque à la fois la GFAP murine et humaine. L'échelle représente 50µm. (c) Immunomarquage avec STEM 123 reconnaissant spécifiquement la GFAP humaine. L'échelle représente 15 µm.

Contrairement à l'étude de Real *et al*, nous n'avons pas repéré la présence de cellules humaines s'organisant en rosettes (Real *et al*, 2018). Une structure tout aussi particulière et semblable au compartiment de la SVZ mis en place pendant la corticogenèse a été visualisée par nos collaborateurs (Raïs *et al*, article en préparation). Ces structures sont constituées de cellules murines exprimant SOX2, un facteur exprimé dans les cellules de la glie radiaire, et développant de longs prolongements agencés parallèlement les uns par rapport aux autres (Raïs *et al*, article en préparation). Nos résultats pourraient s'expliquer par un stade d'engagement neuronal plus poussé utilisé dans le cadre de nos greffes.

Après 50 jours de développement *in vivo*, les somas des neurones présentent une morphologie pyramidale avec un long dendrite apical et quelques dendrites basaux. Quelques épines sont également présentes à la surface de leurs dendrites. Cette même morphologie a été visualisée mais plus ou moins tardivement dans les études précédentes : au bout de 4 mois dans le cas de l'équipe de Uwe Maskos et de 2 mois dans le cas des travaux de Espuny-Camacho *et al* (Espuny-Camacho *et al*, 2013; D'Alessio *et al*, 2020). L'analyse des épines dendritiques a montré une réduction de leur densité par rapport aux conditions *in vitro* et un retard de leur maturité malgré un temps plus long de développement *in vivo*, confirmant que le neurodéveloppement humain est ralenti *in vivo* (Gouder*, Vitrac* *et al*, 2019). Une étude comparative de la fonctionnalité de neurones se développant *in vitro* ou *in vivo* a également mis en évidence un ralentissement du développement et de la maturité des neurones transplantés dans le cerveau de rats par rapport à ceux cultivés *in vitro* (Yin *et al*, 2019). D'autres paramètres relatifs aux épines dendritiques ont révélé des différences entre les conditions *in vitro* et *in vivo*. Il s'agit de la taille et de la rectitude des épines dendritiques plus élevées pour les neurones issus des progéniteurs greffés par rapport aux neurones cultivés *in vitro*.

Des immunomarquages contre MAP2 et VGLUT-1 ont été réalisés 7 mois après la transplantation des progéniteurs neuronaux humains. Quelques colocalisations entre la GFP marquant les cellules humaines et MAP2 ainsi qu'entre la GFP et VGlut-1 ont été observées mais en faible quantité (peu de marquage par cellule et peu de cellules marquées) compte tenu du temps de développement des neurones. L'expression de ces protéines en immunofluorescence est en effet visible après seulement 7 jours de différenciation de ces mêmes progéniteurs neuronaux en conditions *in vitro* pour MAP2 et 10 jours pour Vglut-1 (Gouder*, Vitrac* *et al*, 2019). Ceci pourrait suggérer un manque de maturité important des neurones greffés à 7 mois ou résulter d'une difficulté à marquer certaines protéines humaines dans ce type d'échantillon. Une variabilité du marquage de protéines humaines a déjà été signalée à la suite d'analyses immunologiques de cellules humaines greffées dans des cerveaux de souris (Muotri *et al*, 2005).

D'autre part, une observation au microscope électronique de la greffe des neurones issus de l'individu contrôle, 10 mois après la transplantation des progéniteurs neuronaux, a montré la présence de profils synaptiques. L'aspect immature de l'ultrastructure des neurites (axones et dendrites), des contacts synaptiques, ainsi que la présence d'espaces intercellulaires encore larges, suggèrent que la maturation de cette xéngreffe humaine de 10 mois est légèrement en retard par rapport à ce que l'on observe *in vivo* dans un cortex cérébral humain, 10 mois après la conception (figure 31).

D'autres moyens d'évaluer le degré de maturation des neurones est d'enregistrer leur activité calcique ou d'effectuer des analyses électrophysiologiques de type « patch clamp ». En effet, les profils d'activités calcique et électrique des cellules évoluent au cours du développement et se différencient en partie par leur dynamique (Allène *et al*, 2008). En début de développement, l'activité des neurones est spontanée, sporadique et asynchrone. Puis, au cours du développement, l'activité calcique concerne de

plus en plus de cellules et se synchronise progressivement. Ces expériences ont été effectuées dans le laboratoire de nos collaborateurs ce qui a permis de montrer une activité calcique dans les neurones issus de progéniteurs neuronaux greffés mais qui apparait plutôt sporadique et instable entre les différents temps d'analyses, signes à nouveau d'une immaturité de la greffe humaine (Rais *et al*, article en préparation). Une synchronicité des signaux calciques peut être observée au niveau de greffes humaines dans le cerveau de souris lorsque sont transplantés des neurones déjà différenciés (Real *et al*, 2018).

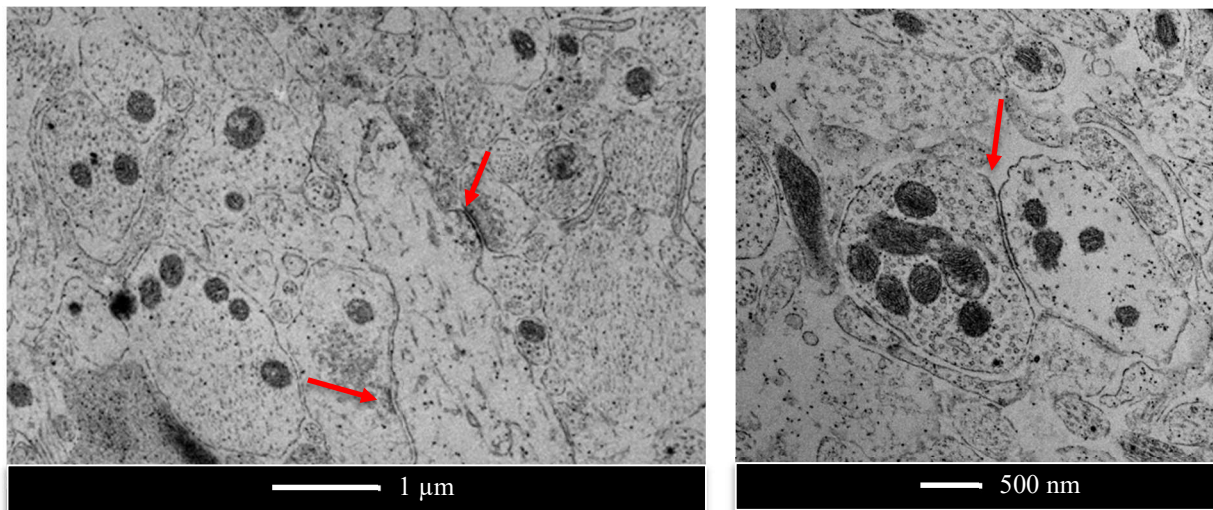


Figure 31 : Profils synaptiques visualisés dans la greffe de neurones humains en ME

Exemples profils synaptiques observés en microscopie électronique après 10 mois de greffe. Le cerveau utilisé a été perfusé par une solution composée de 2,5% de Glutaraldéhyde et de 2% de Paraformaldéhyde dilués dans du PBS. Après section du cerveau perfusé, par un vibratome, les lipides ont été fixés par incubation des coupes dans une solution contenant 1% de tétraoxyde d'osmium dilué dans du PBS pendant 1h. Après déshydratation des coupes, ces dernières ont été incluses dans des blocs de résine. La zone contenant la greffe de cellules humaines a été isolée puis observée en ME. Les profils synaptiques identifiés sont indiqués par des flèches.

La distribution des neurones humains et de leurs projections au sein du cerveau murin a été détaillée dans différentes conditions : suite à une injection des progéniteurs neuronaux ciblée dans les ventricules ou ciblée dans le cortex moteur.

Lorsque les cellules humaines sont injectées dans les ventricules en partie rostrale du cerveau de la souris, les neurones greffés humains sont principalement retrouvés au niveau des parois ou à proximité du système ventriculaire (ventricules latéraux et 3^{ème} ventricule) sur tout l'axe antéropostérieur mais également au niveau des bulbes olfactifs. Cela indique que les neurones humains greffés peuvent utiliser le système ventriculaire pour migrer dans le cerveau murin et que ceux-ci peuvent également emprunter certains circuits formés par les neurones de la souris pour atteindre des régions spécifiques. Nos données suggèrent en particulier que les neurones humains ont la capacité de suivre le circuit de migration rostrale (RMS) qui part des ventricules latéraux pour atteindre les bulbes olfactifs (figure 29) comme cela a

précédemment été observé (D'Alessio *et al*, 2020). Dans le cerveau murin adulte, ce circuit est utilisé par les cellules nouvellement formées au niveau de la SVZ pour rejoindre les bulbes olfactifs où elles se différencient en interneurones. Pendant leur migration, les neuroblastes s'organisent en chaîne (figure 29). Leur migration s'effectue à l'intérieur de tubes formés par des cellules gliales grâce à des signaux répulsifs et attractifs médiés par les protéines SLIT et Nétrine respectivement (Figure 32, Ghashghaei *et al*, 2007). D'autres facteurs interviennent, comme les intégrines $\beta 1$ permettant l'organisation en chaîne des neuroblastes en migration (Figure 29, Belvindrah *et al*, 2007). Ce circuit est également présent dans le cerveau humain pendant l'enfance et est organisé de façon similaire à celui existant chez les rongeurs mais les mécanismes sous-jacents à la migration post-natale des cellules humaines sont encore peu connus (Curtis *et al*, 2007; Kam *et al*, 2009; Wang *et al*, 2011a). Les résultats de cette analyse indiquent ainsi que les neurones humains greffés semblent être capables de répondre aux signaux de guidage présents dans le cerveau murin (Korecka *et al*, 2016).

Des projections axonales sont aussi visualisées dans différentes régions corticales et subcorticales comme le thalamus et le pallidum.

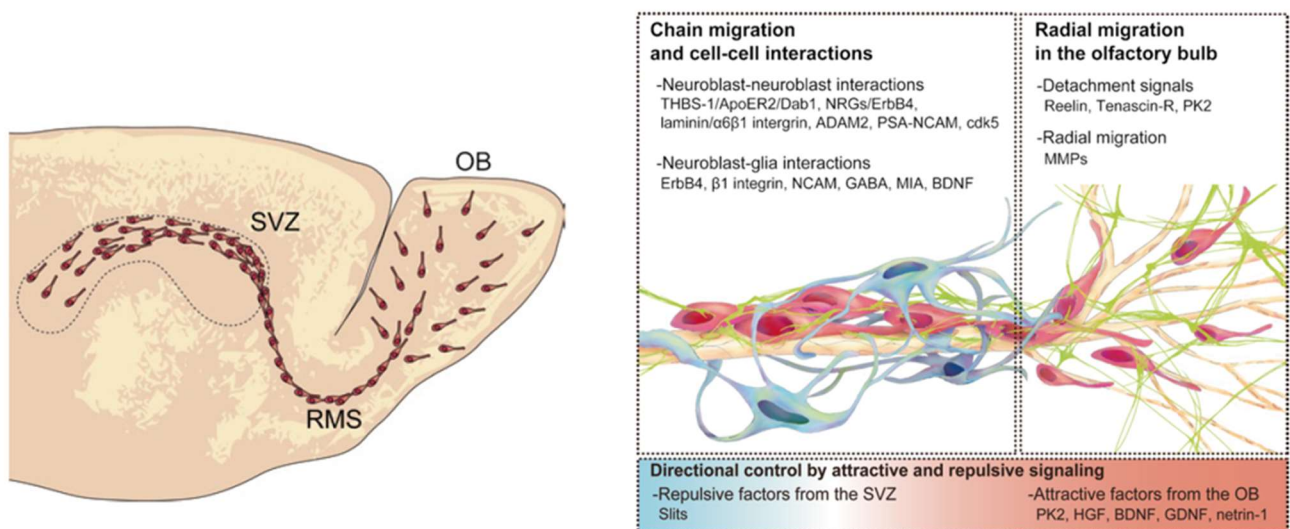


Figure 32 : Représentation du circuit de migration rostral murin

Cette figure montre schématiquement la localisation du circuit RMS au sein du cerveau murin et les différents modes de migration adoptés par les neuroblastes formés au niveau de la SVZ. Au début de leur migration, les neuroblastes (représentés en rouge) s'organisent en chaîne et se déplacent à l'intérieur de tubes formés par des cellules gliales (représentés en bleu). Lorsqu'ils arrivent au niveau des bulbes olfactifs, la chaîne se désorganise et les neuroblastes migrent radialement vers leur position finale. Plusieurs facteurs interviennent dans la migration des neuroblastes. Certains sont impliqués dans l'interaction intercellulaire des neuroblastes tandis que d'autres participent à des interactions entre les neuroblastes et les cellules gliales. La migration des neuroblastes est également contrôlée par des signaux répulsifs localisés au niveau de la SVZ et des signaux attractifs localisés au niveau des bulbes olfactifs. Figures issues de Sawada *et al*, 2011

Lorsqu'elles sont injectées dans le cortex moteur, les cellules restent confinées dans la greffe mais envoient leurs projections dans un grand nombre de régions corticales et subcorticales, dont le thalamus et l'hypothalamus, deux régions pourtant très éloignées de la greffe. Dans l'étude de Espuny-Camacho *et al*, les neurones humains projetant dans le thalamus expriment pour la plupart d'entre eux des marqueurs des couches corticales 6 (Espuny-Camacho *et al*, 2013). Cela suggère qu'une partie des progéniteurs neuronaux greffés dans notre étude se sont également différenciés en neurones corticaux de couches plus profondes. La majorité des projections est détectée dans l'hémisphère ipsilatéral.

Le peu de signal observé dans l'hémisphère contralatéral se limite principalement aux régions situées dans les zones médiales du cerveau. Des prolongements axonaux ont pourtant été visualisés dans le corps calleux qui sert à faire le lien entre les deux hémisphères mais pas de façon suffisante pour atteindre les régions corticales de l'hémisphère contralatéral.

Comme observé précédemment, la greffe repose sur le cortex murin et s'étend des aires motrices aux aires somatosensorielles sur l'axe dorso ventral et sur de longues distances sur l'axe antéropostérieur (D'Alessio *et al*, 2020). Par contre, bien que la quantité de cellules transplantées soit la même (~200 000 cellules), l'épaisseur du greffon humain est nettement inférieure à celle mesurée par nos collaborateurs pour lesquels les délimitations de la greffe peuvent être visualisées à l'œil nu, par comparaison de l'hémisphère greffé et de l'hémisphère non greffé de la souris (D'Alessio *et al*, 2020). Cela suggère que les progéniteurs neuronaux que nous avons greffés prolifèrent moins ou moins longtemps *in vivo*. Des expériences d'injection de BrdU pourraient permettre de confirmer ces hypothèses. Il nous paraît néanmoins important de trouver un moyen de contrôler l'épaisseur du greffon en limitant, par exemple, la prolifération post transplantation car une greffe trop imposante pourrait modifier l'architecture et le développement du cerveau murin. De plus, les progéniteurs neuronaux ont tendance à mieux se différencier lorsque ceux-ci sont à faible densité (données non incluses, observées lors du projet *in vitro* de cette thèse).

Un point relevé au cours de ces travaux est la difficulté d'obtenir une localisation reproductible de la greffe au sein du cerveau. Nous avons en effet observé une variabilité importante du positionnement de la greffe au sein du cerveau murin, parfois située en partie ventrale du cerveau murin voire absente du cerveau murin. Cela est probablement dû à la méthode d'injection utilisée qui est manuelle. Bien que les repères anatomiques soient visibles à l'œil nu et directement sur la tête du souriceau, réaliser une injection sans appareil stéréotaxique peut rendre le site d'injection plus ou moins imprécis. Concernant les localisations de la greffe en partie ventrale du cerveau ou l'absence de greffe cela peut être dû au cerveau du souriceau qui est mou ce qui complique le contrôle de la profondeur de l'injection malgré l'utilisation d'une seringue comportant un système de butoir. Néanmoins, afin d'exclure tout biais pouvant résulter de cette variabilité, nous avons sélectionné des cerveaux dont la localisation de la greffe est similaire pour toutes les analyses de caractérisation de la greffe, de l'organisation des projections

axonales ainsi que pour les analyses comparatives entre les neurones de l'individu contrôle et du patient, présentées dans la partie suivante.

Exploitation du modèle de xénotransplantation pour l'étude de mutations impliquées dans les TSA

Le modèle de xénotransplantation permet d'étudier le neurodéveloppement chez l'homme et peut être appliqué à la modélisation de troubles affectant les étapes précoces du neurodéveloppement humain (Real *et al*, 2018). Ce modèle nous offre donc l'opportunité d'analyser l'impact de mutations touchant le gène *SHANK3*, dans un contexte plus représentatif de la physiologie cérébrale humaine que ne le sont les systèmes de culture *in vitro*. Une question qui se pose en premier lieu, est de savoir si les neurones greffés des patients dans le cortex de souris sont capables de reproduire les déficits observés *in vitro*. De plus, l'identification de projections axonales développées par les neurones de l'individu contrôle, capables de s'intégrer au cerveau de la souris et de se connecter à différentes structures cérébrales parfois très éloignées de la greffe, donne la possibilité d'étudier de nouveaux aspects reliés aux problèmes d'hypoconnectivité observés entre des régions éloignées dans le cerveau et fréquemment associés aux TSA. Dans la première partie, nous avons observé que les neurones humains greffés de l'individu contrôle présentent un retard de maturation. Etant donné, l'apparition précoce des diverses altérations liées au développement des TSA évoquée précédemment, ceci ne présente pas un problème pour cette deuxième partie de notre étude pour laquelle nous avons choisi de nous intéresser aux étapes précoces du neurodéveloppement humain.

Dans le but de modéliser les TSA et d'étudier l'impact de mutations dans *SHANK3* sur le neurodéveloppement humain, les progéniteurs neuronaux de l'individu contrôle et du patient avec TSA ont été transplantés simultanément, au même endroit et en quantité égale, dans le cortex moteur de souris au stade périnatal, entre P0 et P2. Une transplantation simultanée des deux populations de cellules permet d'effectuer une analyse comparative dans laquelle les neurones de l'individu contrôle et les neurones du patient évoluent dans le même environnement et d'exclure toute influence liée à la variabilité pouvant exister entre les cerveaux de différentes souris. Ce type d'analyse a déjà été appliqué *in vitro* pour l'étude de patients PMDS (Shcheglovitov *et al*, 2013), mais aucun groupe n'a à ce jour appliqué cette approche pour comparer le comportement de neurones issus d'individus contrôles et de patients dans un contexte *in vivo*.

Afin de pouvoir clairement distinguer les neurones contrôles et les neurones du patient avec TSA, les cellules du patient avec TSA ont été marquées par un lentivirus exprimant la mCherry dont les spectres d'excitation et d'émissions sont distincts de ceux des neurones contrôles marqués par la GFP. Pour obtenir une analyse comparative précise entre les neurones contrôles marqués à la GFP et les neurones des patients avec TSA marqués à la mCherry, les cellules ont préalablement été triées par la

technique de tri cellulaire induit par fluorescence (FACS : « Fluorescence Activated Cell Sorting »). Cette technique permet de purifier des populations cellulaires distinctes en les sélectionnant selon l'intensité de leur fluorescence. Cette étape est essentielle pour une quantification précise des signaux de fluorescence entre les neurones contrôles et les neurones des patients avec TSA.

Plusieurs points intéressants ont été mis en évidence dans notre étude. Premièrement, les neurones du patient ont pu être greffés avec succès dans le cortex des souris et développer une morphologie pyramidale *in vivo*. Ces derniers restent confinés dans le greffon humain mais, à l'inverse des neurones de l'individu contrôle, ils n'envoient pas, ou alors très peu, de projections dans le cerveau murin. Cette observation suggère des anomalies de l'axonogenèse chez les neurones des patients. Ce phénotype a précédemment été mis en évidence chez des patients avec TSA grâce à l'analyse de cerveaux *post-mortem*. Une étude a notamment permis de montrer une réduction du nombre d'axones impliqués dans la communication entre des régions cérébrales éloignées physiquement (Zikopoulos & Barbas, 2010). La croissance axonale a aussi été étudiée à partir de neurones dérivés d'iPSC issus de patients atteints du syndrome FXS, un syndrome présentant des symptômes communs aux TSA. Les neurones de ces patients cultivés *in vitro* présentent une altération de l'initiation et de l'extension des neurites suggérant des anomalies de l'axonogenèse (Doers *et al*, 2014). L'identification de mutations touchant des gènes intervenant dans le guidage axonal tels que *SEMA5A*, apportent des preuves supplémentaires que les TSA pourraient, dans certains cas, résulter d'un dysfonctionnement du développement axonal (Hussman *et al*, 2011; Mosca-Boidron *et al*, 2016). Des données de transcriptomique évaluées sur des neurones dérivés d'iPSC de patients avec TSA ont en outre révélé une dérégulation de l'expression de certains gènes participant aux mécanismes d'axonogenèse (Derosa *et al*, 2018; Griessi-Oliveira *et al*, 2020). Nos résultats suggèrent ainsi un rôle de SHANK3 dans la croissance axonale ce qui confirme des données précédemment obtenus au laboratoire sur des neurones de rats en cultures (Durand *et al*, 2012).

Enfin, une diminution de la taille des somas a été mesurée dans notre étude chez les neurones du patient par rapport aux neurones de l'individu contrôle. Dans certains cas, la diminution de la taille des somas et des projections axonales peut indiquer la présence de neurones en état de mort cellulaire. Nos données d'immunomarquage dirigé contre la caspase 3 tendent à montrer que les altérations que nous avons observées ne sont pas la conséquence d'évènements apoptotiques. Une réduction de la surface des somas a précédemment été observé *in vitro* dans des neurones de patients portant une délétion de SHANK3 (Kathuria *et al*, 2018) ainsi que dans des neurones humains dans lesquels une diminution de l'expression de SHANK3 a été induite (Huang *et al*, 2019). Un phénotype similaire a aussi été visualisé dans un modèle simien porteur de délétion dans SHANK3 (Zhao *et al*, 2017).

Ces résultats ont été obtenus après seulement 30 jours de développement *in vivo* ce qui indique que SHANK3 semble intervenir à des stades précoces du développement comme cela a déjà été montré dans différents modèles (Zhao *et al*, 2017; Peixoto *et al*, 2019; Huang *et al*, 2019).

Par contre, les données obtenues par l'analyse comparative de la spinogénèse entre les neurones de l'individu contrôles et les neurones du patient n'ont révélé aucune différence significative pour chacun des 8 paramètres testés.

Du fait de la co-transplantation des neurones de l'individu contrôle et du patient, il serait possible d'envisager que les deux populations cellulaires s'influencent de manière réciproque via différents mécanismes qu'il serait intéressant de déterminer. Ainsi, les neurones contrôles pourraient booster la formation des synapses des neurones du patient ou bien les neurones du patient pourraient ralentir ce processus chez les neurones contrôles. Cela aboutirait alors à un équilibre entre les deux génotypes. Cet effet n'a cependant pas été observé dans les travaux de Shcheglovitov *et al* qui ont mis en évidence des défauts synaptiques importants sur des neurones de patients co-cultivés *in vitro* avec des neurones contrôles (Shcheglovitov *et al*, 2013).

Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus reflètent l'absence de phénotype fréquemment observé chez les souris portant une mutation hétérozygote sur Shank3 (Wang *et al*, 2016; Drapeau *et al*, 2018) et pourraient suggérer que l'environnement murin est capable de compenser certaines altérations causées par une réduction du niveau d'expression de SHANK3 voire d'activer l'expression de certaines isoformes de SHANK3 comme cela a récemment été suggéré dans deux modèles de souris porteuses d'une délétion de plusieurs exons dans *Shank3* (Jin *et al*, 2019). Une autre possibilité serait une meilleure stabilité des protéines SHANK3, exprimées dans les neurones humains greffés du patient, qui portent dans leur séquence un grand nombre de résidus phosphorylables. Une étude de criblage publiée récemment a ainsi identifié un total de 18 kinases capables de stabiliser les protéines SHANK3 (Wang *et al*, 2019a). Il serait alors intéressant de voir si ces kinases sont plus actives chez les neurones du patient et si l'environnement murin est capable de moduler leur activité.

Un autre facteur pouvant expliquer nos observations est le stade moins avancé auquel nous avons effectué nos analyses comparativement aux études *in vitro*. Une analyse à des temps plus tardifs a été envisagée afin de répondre à cette question mais n'a pas été possible en raison du manque de cerveaux disponibles et comportant une greffe localisée dans le cortex à ces temps (à cause de la variabilité observée dans le positionnement des greffes mais aussi à cause de la santé de ces souris, mortes trop prématurément).

L'analyse des épines dendritiques des neurones se développant *in vivo* a été effectuée par l'utilisation de la même approche que celle adoptée dans le projet *in vitro*. Le logiciel Imaris a ainsi été utilisé pour reconstruire en 3D les dendrites ainsi que les épines dendritiques des neurones de l'individu contrôle et de ceux du patient et a permis de mesurer les différents paramètres inclus dans notre étude (Gouder *et al*, 2015). Néanmoins il est apparu certaines complications lors de la visualisation des données. Du fait d'une densité importante de neurones au sein même de la greffe, il a parfois été difficile d'identifier et de suivre les prolongements d'un neurone donné. Un nouvel outil en cours de développement par l'équipe de Jean-Baptiste Masson dans notre département a été testé. Basée sur la

technologie de réalité virtuelle, cet outil nommé DIVA (Data Integration and Visualization in Augmented and Virtual Environments) nous a permis une meilleure reconnaissance des prolongements des neurones résultant en un suivi et une reconstruction des dendrites plus aisés (El Beheiry *et al*, 2020). La figure 33 montre l'application de cette technologie sur les coupes de cerveaux greffés par les cellules de l'individu contrôle (marquées en vert par la GFP) et du patient (marquées en rouge par la mCherry), obtenues dans mon projet. Divers algorithmes pourront par la suite compléter cet outil de visualisation et faciliter les analyses de certains échantillons en 3D pour lesquels les outils classiques sont moins adaptés.

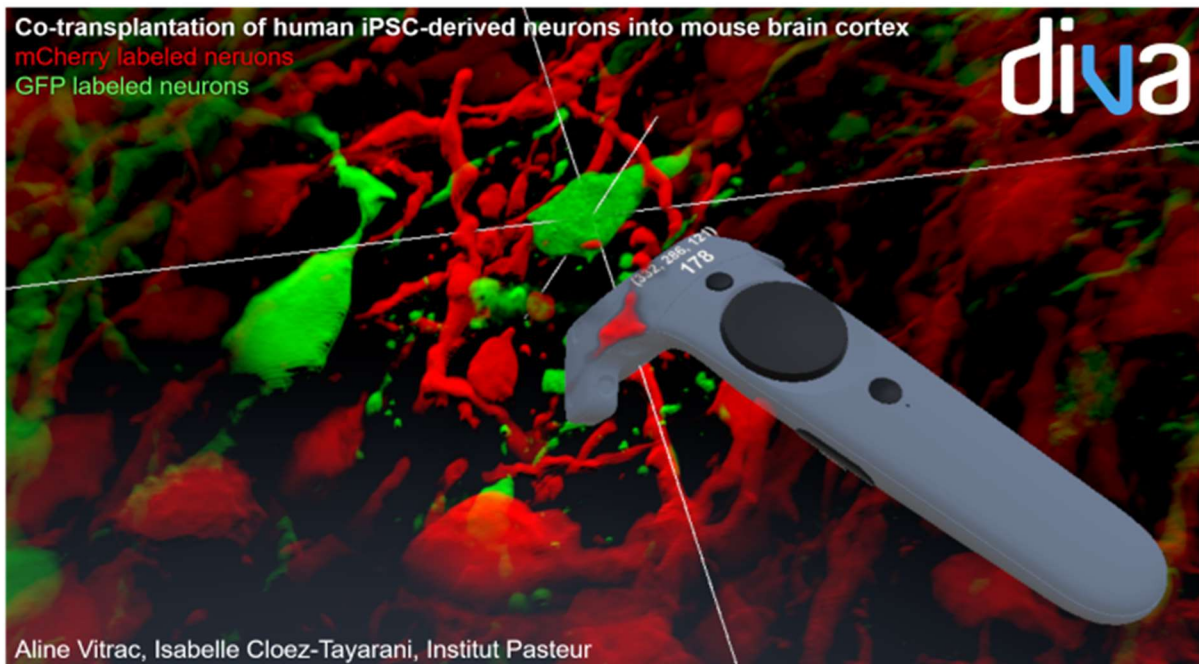


Figure 33 : Visualisation des coupes de cerveaux greffés par les cellules de l'individu contrôle et du patient grâce à l'outil DIVA

Image réalisée par M. El Beheiry (Laboratoire JB Masson)

Une autre difficulté rencontrée lors de cette analyse et engendrée par le sectionnement du cerveau transplanté, en coupes de 50 μm , concerne la visualisation des branches dendritiques dans leur intégralité. Une large proportion de prolongements dendritiques observés sur les coupes sont, en effet, tronqués lors du sectionnement au vibratome et il est alors difficile de connaître leur position par rapport au soma ainsi que leur longueur totale. Nous avons ainsi uniquement sélectionné et analysé les dendrites dont le rattachement à un soma était visible afin d'effectuer les analyses sur des portions de dendrites comparables. Il aurait également été possible d'opter pour une approche de clarification, une technique permettant de rendre les tissus transparents, et d'obtenir une visualisation des dendrites neuronaux humains dans la totalité du cerveau murin. Plusieurs protocoles existent : CLARITY (Chung *et al*, 2013), CUBIC (Susaki *et al*, 2014) et iDISCO (Renier *et al*, 2014). Nous avons testé ce dernier et avons pu observer la greffe de neurones humains ainsi que certaines projections axonales dans des demi-cerveaux

de souris. Néanmoins les dispositifs d'imagerie à notre disposition ne nous ont pas permis d'avoir une résolution suffisamment élevée pour analyser les épines dendritiques.

Conclusions et perspectives de l'étude in vivo

Le modèle de xénotransplantation a montré un fort potentiel pour le traitement des maladies neurodégénératives et commence à être employé pour la modélisation du neurodéveloppement humain. Un grand nombre de données a été obtenu dans des situations non pathologiques et a montré que le neurodéveloppement humain pouvait être récapitulé *in vivo* de façon fidèle et reproductible. Néanmoins, à ce jour, ce modèle n'a été que très peu utilisé pour la modélisation de troubles du neurodéveloppement. Dans ce projet de thèse, nous avons voulu bénéficier des connaissances acquises ces dernières années pour mettre en place un modèle expérimental permettant l'analyse du rôle de mutations fortement pénétrantes dans l'établissement de phénotypes pathologiques.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que les neurones humains se développent *in vivo* et se différencient dans les mêmes types cellulaires que *in vitro* (neurones corticaux des couches superficiels, interneurones et astrocytes). Cependant, un ensemble de données suggèrent que la maturation des neurones humains greffés est ralentie et incomplète à des temps tardifs de développement *in vivo*.

Plusieurs études récentes ont montré la possibilité de greffer des organoïdes dans le cerveau de souris (Mansour *et al*, 2018; Daviaud *et al*, 2018). Contrairement aux organoïdes cultivés *in vitro*, les organoïdes greffés ont accès à la vascularisation fournie par l'animale hôte. Il en résulte de meilleurs taux de survie et une baisse de l'apoptose. Un résultat intéressant est que la maturation des neurones composant l'organoïde apparaît accélérée en conditions *in vivo* par rapport aux conditions *in vitro*, par opposition à ce que nous avons observé pour la transplantation des progéniteurs neuronaux (Mansour *et al*, 2018). De plus, il a été constaté une meilleure survie et une amélioration de la différenciation neuronale dans le cas des organoïdes greffés par rapport aux progéniteurs neuronaux greffés (Daviaud *et al*, 2018). Les données apportées par ces deux études permettent de considérer ce modèle comme une solution alternative intéressante à la greffe de progéniteurs neuronaux.

Un phénotype robuste des TSA retrouvé dans la plupart des modèles animaux mutés sur SHANK3 et identifié *in vitro* dans les cellules du patient inclus dans notre étude *in vivo* correspond à une altération de la formation et de la morphologie des épines dendritiques. L'absence de reproductibilité de ce phénotype observée dans notre analyse *in vivo* doit donc être mieux comprise pour adapter et améliorer notre modèle d'étude. Une perspective de ce projet orientée dans ce but serait d'élargir l'analyse des épines dendritiques *in vitro* à différents temps de différenciation afin de déterminer plus précisément à quel stade les anomalies entre cellules de patients et cellules d'individus contrôles apparaissent. De

même, étant donné les cinétiques de maturation plus lentes observées *in vivo*, il nous apparaît important d'examiner les différents paramètres relatifs aux épines dendritiques *in vivo*, à des temps plus tardifs de développement. L'influence du cerveau murin sur l'expression du génome humain et en particulier de SHANK3 pourrait, de plus, être évaluée par séquençage complet des ARN d'origine humaine. D'autres expériences pourraient également être menées pour caractériser et comparer la fonctionnalité des neurones des patients par rapport à ceux de l'individu contrôlé par des mesures électrophysiologiques ou bien par l'étude de l'activité calcique des neurones.

Des travaux publiés récemment ont mis en évidence une amélioration à long terme des performances cognitives de souris modélisant la maladie d'Alzheimer suite à l'injection de cellules souches neurales humaines dans la fimbria, un réseau de substance blanche localisé près de l'hippocampe (McGinley *et al*, 2018). Cette étude pré-clinique suggère que les neurones humains ont la capacité de rétablir des fonctions altérées chez la souris lors du développement de certains troubles. Cette approche pourrait alors être appliquée aux formes de TSA dont le développement est dû à un déficit de certaines populations neuronales spécifiques.

Par ailleurs, différentes régions cérébrales et circuits neuronaux ont été reliés à certains déficits caractéristiques des TSA. Ainsi, des études portant sur des souris mutées sur *Shank3* ont démontré que les stéréotypies pourraient être dues à une altération du circuit cortico-striatal et que les problèmes d'interactions sociales pourraient provenir d'anomalies au niveau du cortex antérieur cingulaire (Wang *et al*, 2017; Guo *et al*, 2019). Il serait alors également intéressant de voir si l'injection de cellules souches neurales humaines d'individus contrôlés dans ces régions spécifiques du cerveau de souris mutées sur *Shank3* permet la correction ou non des phénotypes de ces souris.

Les études pré-cliniques sur des modèles animaux sont nécessaires avant l'initiation d'essais visant à évaluer l'effet thérapeutique chez l'humain et permettent d'évaluer leurs faisabilités et d'optimiser les conditions afin d'écarter tous les risques liés à leur mise en œuvre (risques oncogéniques, risque de rejets, effets secondaires). Les premiers essais de ces approches dites de médecines régénératives chez l'humain ont fait appel à des transplantations de cellules fœtales ou dérivées d'ESC humaines avec des résultats encourageants mais ont été peu poursuivies en raison de critères éthiques. La publication récente des résultats de plusieurs tests de transplantations autologues, de cellules dérivées d'iPSC, dans le cadre du traitement des dégénérescences maculaires liées à l'âge et de la maladie de Parkinson, offre de nouveaux espoirs sur le développement de thérapies personnalisées (Mandai *et al*, 2017; Schweitzer *et al*, 2020; Song *et al*, 2020). Néanmoins, leur application à plus large échelle paraît difficile en raison du temps requis pour la production des cellules destinées à la transplantation : prélèvement des cellules somatiques sur le patient, reprogrammation, redérivation et caractérisation de ces cellules, tests de transplantation chez l'animal (Parmar & Björklund, 2020). Une alternative serait de recourir à des transplantations de type allogénique ce qui permettrait de constituer des banques de cellules déjà testées et qui pourraient être utilisées à la demande (Parmar & Björklund, 2020).

Une autre perspective d'ordre thérapeutique serait l'administration, à des souris greffées par des cellules du patient de notre étude, de composés pharmacologiques capables de franchir la barrière hématoencéphalique afin de voir s'il est possible d'effacer les différentes anomalies que nous avons mis en évidence dans notre étude.

Différents composés ont déjà été testés *in vitro* sur des neurones dérivés d'iPSC de patients hémizygotés pour SHANK3 et ont montré une certaine efficacité pour la réversion des phénotypes observés. Parmi ces composés, on peut citer l'IGF-1 et le lithium tous deux capables de franchir la barrière hématoencéphalique. L'IGF-1 a notamment permis rétablir les courants post-synaptiques excitateurs et l'expression des récepteurs glutamatergiques à un niveau similaire à celui existant dans les cellules d'individus contrôles (Shcheglovitov *et al*, 2013). Concernant le lithium, il a été testé sur les cellules de deux patients inclus dans notre étude *in vitro* et a permis d'augmenter le nombre de synapses positives pour SHANK3 ainsi que la fréquence et l'intensité des oscillations calciques spontanées (Darville *et al*, 2016).

Chez les souris invalidées pour le gène *Shank3*, un traitement au lithium permet de réduire les stéréotypies fréquemment observées dans ce modèle (Tatavarty *et al*, 2020). Ces travaux suggèrent, de plus, que ce comportement est corrigé grâce au rétablissement de la plasticité homéostatique qui est profondément altérée lorsque l'expression de *Shank3* est réduite (Tatavarty *et al*, 2020).

Plusieurs études ont aussi montré un effet positif d'un traitement au lithium chez des patients avec TSA (Serret *et al*, 2015; Darville *et al*, 2016; Mintz & Hollenberg, 2019; Johannessen *et al*, 2019). Initialement, le lithium a été prescrit après apparition de troubles bipolaires chez des patients avec TSA et suite à divers autres traitements s'étant révélés inefficaces. Cette thérapie a permis à deux patients mutés sur SHANK3 (dont l'une incluse est dans notre étude *in vitro*) de diminuer à la fois leurs symptômes relatifs aux troubles bipolaires mais aussi certains liés aux TSA comme la sociabilisation, la communication et l'autonomie (Serret *et al*, 2015; Darville *et al*, 2016). Une baisse de la sévérité des divers troubles de patients avec TSA a été également observée sur un échantillon de 19 patients ayant reçu un traitement au lithium (Mintz & Hollenberg, 2019). Un essai clinique pour évaluer l'effet du lithium sur des patients porteurs de mutations dans SHANK3 est actuellement mis en place à l'hôpital Robert Debré par les psychiatres travaillant au laboratoire.

Une limitation majeure relevée dans notre étude est liée à l'utilisation de la lignée immunodéficiente NOD-SCID. Cette lignée de souris nous a permis d'assurer une bonne intégration des neurones et une survie cellulaire sur des temps prolongés. Cependant, ce sont des souris très fragiles et vulnérables à la moindre infection ce qui a desservi ce projet à différentes périodes. Un fort taux de mortalité a en effet été observé chez ces souris à des stades précoces aussi bien chez les souris d'élevage que chez les souris greffées, limitant ainsi le nombre de cerveaux analysés et restreignant les temps d'analyses. Un modèle alternatif est représenté par les greffes *in utero* ne nécessitant pas l'utilisation de

lignées murines immunodéficientes du fait de l'absence, à ce stade, de cellules immunitaires capables de reconnaître le non soi. La procédure d'injection est plus compliquée à réaliser avec ce modèle mais les souris dépassant ce stade sont plus résistantes et plus faciles à maintenir sur de longues périodes. De plus, l'environnement cellulaire du cerveau fœtal murin se rapproche davantage du stade développemental auquel les progéniteurs que nous greffons appartiennent. Ce modèle a été mis en place par le groupe d'Isabelle Cloëz-Tayarani au sein du laboratoire de Uwe Maskos, avec les mêmes cellules contrôles et montre des résultats prometteurs.

Dans ce nouveau projet, les progéniteurs neuronaux sont injectés dans le cerveau de fœtus de souris Swiss OF1 au stade E14-E15 au niveau d'un ventricule. Un mois post-transplantation, des cellules neuronales humaines ont été visualisées à proximité des ventricules latéraux au niveau antérieur et postérieur du cerveau murin (figure 34). Ces résultats préliminaires montrent le potentiel de cette nouvelle approche pour la modélisation des troubles neurodéveloppementaux tels que les TSA.

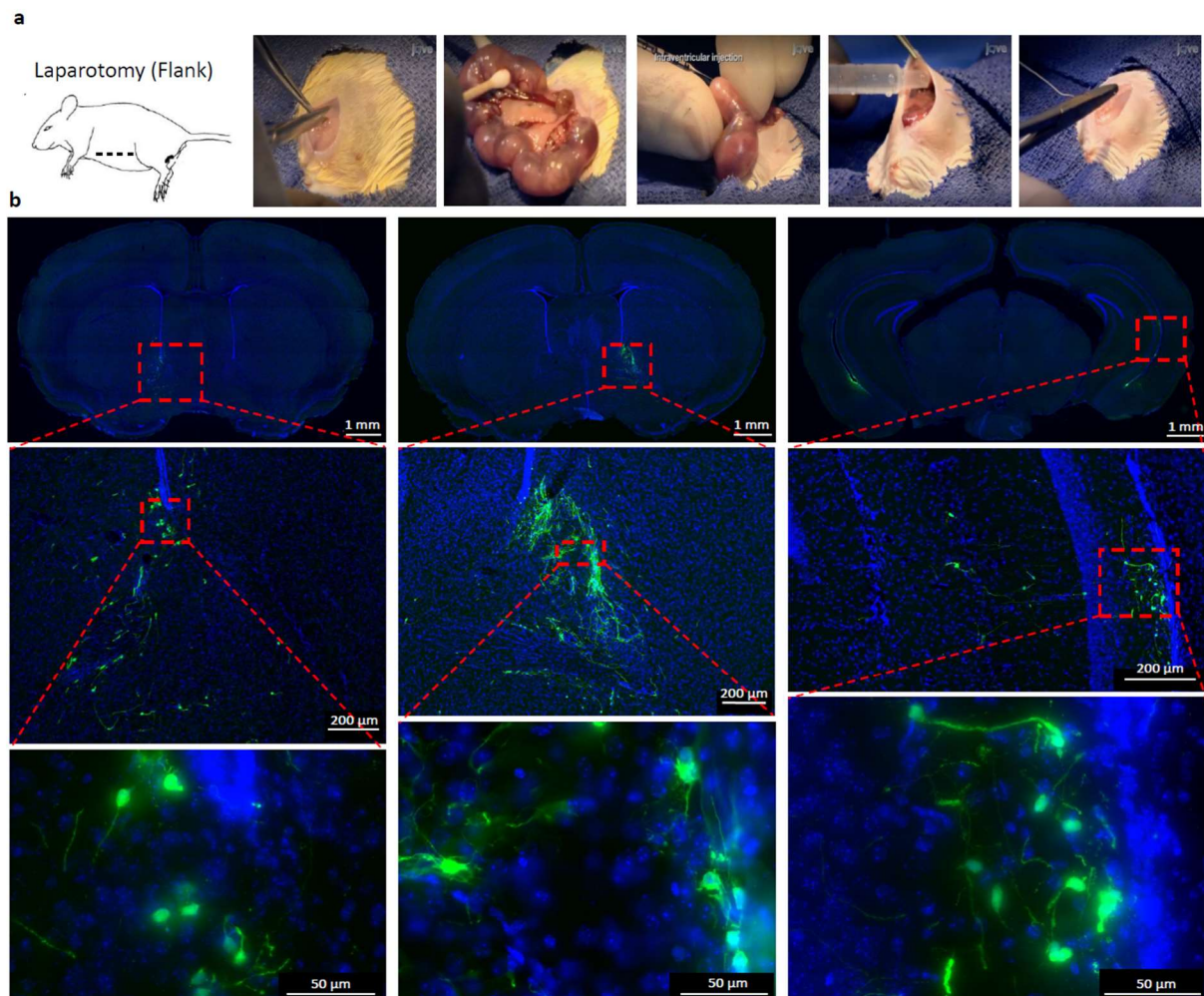


Figure 34 : Résultats préliminaires obtenus par injection *in utero* de précurseurs neuronaux
 (a) Illustration de la procédure d'injection *in utero* (Images issues de (Nijagal *et al*, 2010)) (b) Immunomarquages avec des anticorps dirigés contre la GFP des cellules humaines greffées *in utero* après 1 mois de développement *in vivo* effectués à différents niveaux de l'axe antéropostérieur (Thiberge C et Llach M, résultats non publiés).

En conclusion, les approches de xénotransplantation avec le développement de souris humanisées donnent accès à un modèle novateur pour la modélisation des troubles du neurodéveloppement et l'étude de l'impact de mutations impliquées dans ces troubles. Les neurones humains ainsi greffés dans le cerveau murin se développent dans un environnement physiologiquement plus proche du cerveau humain que ne le sont les systèmes de culture *in vitro*. Ces modèles permettent en particulier de reproduire l'organisation et l'environnement cellulaire du tissu cérébral. Cette approche a été appliquée, pour la première fois dans notre étude, à l'analyse du développement de progéniteurs neuronaux d'un patient co-transplantés avec des progéniteurs neuronaux d'un individu contrôle. Cela nous a permis d'identifier une contribution précoce de SHANK3 dans l'apparition d'anomalies développementales dans les neurones du patient. La transplantation de progéniteurs neuronaux humains dans le cerveau de souris offre ainsi la possibilité de mieux comprendre le rôle de mutations humaines associées aux TSA et permet la visualisation de phénotypes supplémentaires liés à la connectivité des neurones.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N & Nakanishi S (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* **267**: 13361–13368
- Abmayr SM & Pavlath GK (2012) Myoblast fusion: Lessons from flies and mice. *Development* **139**: 641–656
- Abrahams BS & Geschwind DH (2008) Advances in autism genetics: On the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 341–355
- Alexandrov PN, Zhao Y, Jaber V, Cong L & Lukiw WJ (2017) Deficits in the proline-rich synapse-associated Shank3 protein in multiple neuropsychiatric disorders. *Front. Neurol.* **8**: 1–7
- Allène C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y & Cossart R (2008) Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J. Neurosci.* **28**: 12851–12863
- Altman J & Das DG (1965) Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *J. Comp. Neur.*
- Van den Aemele J, Tiberi L, Vanderhaeghen P & Espuny-Camacho I (2014) Thinking out of the dish: What to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends Neurosci.* **37**: 334–342 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005>
- American Psychiatric Association (1952) Mental Disorders, Diagnostic and Statistical Manual. *Acad. Med.* **27**: 365
- American Psychiatric Association (2013) Mental Disorders, Diagnostic and Statistical Manual
- Anderson AJ, Haus DL, Hooshmand MJ, Perez H, Sontag CJ, Cummings BJ, Gross B, Cell S, Road HS & Irvine UC (2012) Achieving stable human stem cell engraftment and survival in the CNS. **6**: 367–406
- Anderson JM (1996) Cell signalling: MAGUK magic. *Curr. Biol.* **6**: 382–384
- Andreotti JP, Silva WN, Costa AC, Picoli CC, Bitencourt FCO, Coimbra-Campos LMC, Resende RR, Magno LAV, Romano-Silva MA, Mintz A & Birbrair A (2019) Neural stem cell niche heterogeneity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **95**: 42–53 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.01.005>
- Angevine JB & Sidman RL (1961) Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in the Mouse. **192**: 766–768
- Anney R, Klei L, Pinto D, Almeida J, Bacchelli E, Baird G, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Casey J, Conroy J, Correia C, Corsello C, Crawford EL, De jonge M, Delorme R, Duketis E, et al (2012) Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.* **21**: 4781–4792
- Antoine MW, Langberg T, Schnepel P & Feldman DE (2019) Increased Excitation-Inhibition Ratio Stabilizes Synapse and Circuit Excitability in Four Autism Mouse Models. *Neuron* **101**: 648-661.e4

- Apostolou E, Ferrari F, Walsh RM, Bar-Nur O, Stadtfeld M, Cheloufi S, Stuart HT, Polo JM, Ohsumi TK, Borowsky ML, Kharchenko P V., Park PJ & Hochedlinger K (2013) Genome-wide chromatin interactions of the nanog locus in pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Cell Stem Cell* **12**: 699–712
- Apostolou E & Hochedlinger K (2013) Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* **502**: 462–471
- Apostolou E & Stadtfeld M (2018) Cellular trajectories and molecular mechanisms of iPSC reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **52**: 77–85 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.06.002>
- Arai Y & Taverna E (2017) Neural progenitor cell polarity and cortical development. *Front. Cell. Neurosci.* **11**: 1–11
- Arons MH, Lee K, Thynne CJ, Kim SA, Schob C, Kindler S, Montgomery JM & Garner CC (2016) Shank3 is part of a zinc-sensitive signaling system that regulates excitatory synaptic strength. *J. Neurosci.* **36**: 9124–9134
- Aschrafi A, Cunningham BA, Edelman GM & Vanderklish PW (2005) The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 2180–2185
- Ashby MC, Maier SR, Nishimune A & Henley JM (2006) Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J. Neurosci.* **26**: 7046–7055
- Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H & Alitalo K (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.* **212**: 991–999
- Asperger H (1944) Die ‘Autistischen Psychopathen’ im Kindesalter. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* **117**: 76–136
- Astick M & Vanderhaeghen P (2018) From Human Pluripotent Stem Cells to Cortical Circuits 1st ed. Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.011>
- Atladóttir HÓ, Henriksen TB, Schendel DE & Parner ET (2012) Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: An exploratory study. *Pediatrics* **130**: 1–18
- Avni E, Ben-Itzhak E & Zachor DA (2018) The Presence of Comorbid ADHD and Anxiety Symptoms in Autism Spectrum Disorder: Clinical Presentation and Predictors. *Front. Psychiatry* **9**: 1–12
- Bader PL, Faizi M, Kim LH, Owen SF, Tadross MR, Alfa RW, Bett GCL, Tsien RW, Rasmusson RL & Shamloo M (2011) Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 15432–15437
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade

- HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW & Echelard Y (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* **17**: 456–461
- Bai D, Yip BHK, Windham GC, Sourander A, Francis R, Yoffe R, Glasson E, Mahjani B, Suominen A, Leonard H, Gissler M, Buxbaum JD, Wong K, Schendel D, Kodesh A, Breshnahan M, Levine SZ, Parner ET, Hansen SN, Hultman C, et al (2019) Association of Genetic and Environmental Factors with Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry* **76**: 1035–1043
- Baieli S, Pavone L, Meli C, Fiumara A & Coleman M (2003) Autism and phenylketonuria. *J. Autism Dev. Disord.* **33**: 201–204
- Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Rosenberg CR, White T, Durkin MS, Imm P, Nikolaou L, Yeargin-Allsopp M, Lee LC, Harrington R, Lopez M, Fitzgerald RT, Hewitt A, Pettygrove S, et al (2020) Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 Years - Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill. Summ.* **67**:
- Baj G, Patrizio A, Montalbano A, Sciancalepore M & Tongiorgi E (2014) Developmental and maintenance defects in Rett syndrome neurons identified by a new mouse staging system in vitro. *Front. Cell. Neurosci.* **8**: 1–15
- Balaan C, Corley MJ, Eulalio T, Leite-ahyo K, Alina PS, Fang R, Khadka VS, Maunakea AK & Ward MA (2019) Juvenile Shank3b deficient mice present with behavioral phenotype relevant to Autism Spectrum Disorder. *Behav Brain Res*: 137–147
- Ballester P, Martínez MJ, Javaloyes A, Inda M del M, Fernández N, Gázquez P, Aguilar V, Pérez A, Hernández L, Richdale AL & Peiró AM (2018) Sleep problems in adults with autism spectrum disorder and intellectual disability. *Autism Res.* **12**: 66–79
- Bandini LG, Anderson SE, Curtin C, Cermak S, Evans EW, Scampini R, Maslin M & Must A (2010) Food selectivity in children with autism spectrum disorders and typically developing children. *J. Pediatr.* **157**: 259–264
- Bär J, Kobler O, Van Bommel B & Mikhaylova M (2016) Periodic F-actin structures shape the neck of dendritic spines. *Sci. Rep.* **6**: 1–9
- Baron-Cohen S (2002) The extreme male brain theory of autism. *Trends Cogn. Sci.* **6**: 248–254
- Baron-Cohen S, Johnson D, Asher J, Wheelwright S, Fisher SE, Gregersen PK & Allison C (2013) Is synaesthesia more common in autism? *Mol. Autism* **4**: 2–7
- Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya MR, Salyer D, Eckart D, Gundelfinger James U, Bowie Marisa K, Baron TMB, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya MR, Salyer D, Gundelfinger ED & Bowie JU (2006) An Architectural Framework That May Lie at the Core of the Postsynaptic Density. *J. Chem. Inf. Model.* **53**: 1689–1699
- Barrett S, Beck JC, Bernier R, Bisson E, Braun TA, Casavant TL, Childress D, Folstein SE, Garcia M, Gardiner MB, Gilman S, Haines JL, Hopkins K, Landa R, Meyer NH, Mullane JA, Nishimura DY, Palmer P, Piven J, Purdy J, et al (1999) An autosomal genomic screen for autism. *Am. J.*

- Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* **88**: 609–615
- Barry DI, Kikvadze I, Brundin P, Bolwig TG, Bjorklund A & Lindvall O (1987) Grafted noradrenergic neurons suppress seizure development in kindling-induced epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 8712–8715
- Barttfeld P, Wicker B, Cukier S, Navarta S, Lew S & Sigman M (2011) A big-world network in ASD: Dynamical connectivity analysis reflects a deficit in long-range connections and an excess of short-range connections. *Neuropsychologia* **49**: 254–263 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.11.024>
- Bateup HS, Takasaki KT, Saulnier JL, Denefrio CL & Sabatini BL (2011) Loss of Tsc1 in vivo impairs hippocampal mGluR-LTD and increases excitatory synaptic function. *J. Neurosci.* **31**: 8862–8869
- Bats C, Groc L & Choquet D (2007) The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron* **53**: 719–734
- Bediz CS, Baltaci AK & Mogulkoc R (2003) Both zinc deficiency and supplementation affect plasma melatonin levels in rats. *Acta Physiol. Hung.* **90**: 335–339
- Beggiato A, Peyre H, Maruani A, Scheid I, Rastam M, Amsellem F, Gillberg CI, Leboyer M, Bourgeron T, Gillberg C & Delorme R (2017) Gender differences in autism spectrum disorders: Divergence among specific core symptoms. *Autism Res.* **10**: 680–689
- El Beheiry M, Godard C, Caporal C, Marcon V, Ostertag C, Sliti O, Doutreligne S, Fournier S, Hajj B, Dahan M & Masson JB (2020) DIVA: Natural Navigation Inside 3D Images Using Virtual Reality. *J. Mol. Biol.* Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.05.026>
- Belichenko P V., Kleschevnikiv AM, Salehi A, Epstein CJ & Mobley WC (2007) Synaptic and cognitive abnormalities in Mosues models of Down Syndrome: Exploring genotype-Phenotype relationships. *J. Comp. Neurol.* **346**: 339–346
- Beltrão-Braga PCB & Muotri AR (2017) Modeling autism spectrum disorders with human neurons. *Brain Res.* **1656**: 49–54
- Belvindrah R, Hankel S, Walker J, Patton BL & Müller U (2007) B1 Integrins Control the Formation of Cell Chains in the Adult Rostral Migratory Stream. *J. Neurosci.* **27**: 2704–2717
- Ben-Ari Y (2014) The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey. *Neuroscience* **279**: 187–219 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.001>
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT & Cherubini E (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* **18**: 467–486
- Benabou M, Rolland T, Leblond CS, Millot GA, Huguet G, Delorme R, Leboyer M, Pagan C, Callebort J, Maronde E & Bourgeron T (2017) Heritability of the melatonin synthesis variability in autism spectrum disorders. *Sci. Rep.* **7**: 1–10
- Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, DiCicco-Bloom E, Brzustowicz LM & Millonig JH (2005) Support for the

- homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am. J. Hum. Genet.* **77**: 851–868
- Benke TA, LuThi A, Isaac JTR & Collindridge GL (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* **393**: 748–749
- Bennett JA, Germani T, Haqq AM & Zwaigenbaum L (2015) Autism spectrum disorder in Prader-Willi syndrome: A systematic review. *Am. J. Med. Genet. Part A* **167**: 2936–2944
- Benthani F, Tran PN, Currey N, Ng I, Giry-Laterriere M, Carey L, Kohonen-Corish MRJ & Pangon L (2015) Proteogenomic analysis identifies a novel human SHANK3 Isoform. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 11522–11530
- Beri S, Tonna N, Menozzi G, Bonaglia MC, Sala C & Giorda R (2007) DNA methylation regulates tissue-specific expression of Shank3. *J. Neurochem.* **101**: 1380–1391
- Berninghausen O, Rahman MA, Silva JP, Davletov B, Hopkins C & Ushkaryov YA (2007) Neurexin I β and neuroligin are localized on opposite membranes in mature central synapses. *J. Neurochem.* **103**: 1855–1863
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL & Lander ES (2006) A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* **125**: 315–326
- Berry KP & Nedivi E (2017) Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron* **96**: 43–55
- Berry M & Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* **99**: 691–709 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325778>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1270716>
- Bhat S, Acharya UR, Adeli H, Bairy GM & Adeli A (2014) Automated diagnosis of autism: In search of a mathematical marker. *Rev. Neurosci.* **25**: 851–861
- Bidinosti M, Botta P, Kruttner S, Proenca CC, Stoehr N, Bernhard M, Fruh I, Mueller M, Bonenfant D, Voshol H, Carbone W, Neal SJ, McTighe SM, Roma G, Dolmetsch RE, Porter J, Caroni P, Bouwmeester T, Luthi a. & Galimberti I (2016) CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with SHANK3 deficiency. *Science (80-.)*. **5487**: 1–8 Available at:
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad5487>
- Björklund A & Stenevi U (1979) Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* **177**: 555–560
- Bliss TVP & Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**: 357–374
- Boccuto L, Lauri M, Sarasua SM, Skinner CD, Buccella D, Dwivedi A, Orteschi D, Collins JS, Zollino M, Visconti P, Dupont B, Tiziano D, Schroer RJ, Neri G, Stevenson RE, Gurrieri F & Schwartz CE (2013) Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism

- spectrum disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**: 310–316 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2012.175>
- Böckers TM, Mameza MG, Kreutz MR, Bockmann J, Weise C, Buck F, Richter D, Gundelfinger ED & Kreienkamp HJ (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 TM, Segger-Junius M, Iglauer P, Bockmann J, Gundelfinger ED, Kreutz MR, Richter D, Kindler S & Kreienkamp HJ (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
- Bodfish JW, Symons FJ, Parker DE & Lewis MH (2000) Varieties of repetitive behavior in autism: Comparisons to mental retardation. *J. Autism Dev. Disord.* **30**: 237–243
- Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR & Gundelfinger ED (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 TM, Liedtke T, Spilker C, Dresbach T, Bockmann J, Kreutz MR & Gundelfinger ED (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 & 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 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/tp.2013.71>
- Bolton PF, Carcani-Rathwell I, Hutton J, Goode S, Howlin P & Rutter M (2011) Epilepsy in autism: Features and correlates. *Br. J. Psychiatry* **198**: 289–294
- Bolton PF, Park RJ, Higgins JNP, Griffiths PD & Pickles A (2002) Neuro-epileptic determinants of autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. *Brain* **125**: 1247–1255
- Bonaglia MC, Giorda R, Beri S, de Agostini C, Novara F, Fichera M, Grillo L, Galesi O, Vetro A, Ciccone R, Bonati MT, Giglio S, Guerrini R, Osimani S, Marelli S, Zucca C, Grasso R, Borgatti R, Mani E, Motta C, et al (2011) Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with phelan/mcdermid syndrome. *PLoS Genet.* **7**:
- Bonati MT, Russo S, Finelli P, Valsecchi MR, Cogliati F, Cavalleri F, Roberts W, Elia M & Larizza L (2007) Evaluation of autism traits in Angelman syndrome: A resource to unfold autism genes. *Neurogenetics* **8**: 169–178
- Borisy GG & Svitkina TM (2000) Actin machinery: Pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 104–112
- Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M & Hayashi Y (2014) Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* **82**: 444–459

Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>

- Bosma GC, Custer RP & Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**: 527–530
- Bourgeois JP (2008) Synaptogenèses normales, pathologiques et amendables dans le cortex cérébral. *Psn* **6**: 124–136
- Bourgeron T (2015) From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**: 551–563 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3992>
- Bourne J & Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**: 381–386
- Bowie D (2008) Iontropic Glutamate Receptors & CNS Disorders. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **7**: 129–143
- Bowles KR, Julia TCW, Qian L, Jadow BM & Goate AM (2019) Reduced variability of neural progenitor cells and improved purity of neuronal cultures using magnetic activated cell sorting. *PLoS One* **14**: 1–18 Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0213374>
- Boyer LA, Lee IT, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R & Young RA (2005) Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **12**: 144–147
- Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein DL, Takahashi N, Kajiwara Y, Yang M, Katz AM, Scattoni ML, Harris MJ, Saxena R, Silverman JL, Crawley JN, Zhou Q, Hof PR & Buxbaum JD (2010) Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol. Autism* **1**: 15 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3019144&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bozdagi O, Tavassoli T & Buxbaum JD (2013) Insulin-like growth factor-1 rescues synaptic and motor deficits in a mouse model of autism and developmental delay. *Mol. Autism* **4**:
- Brakeman PR, Lanahan AA, Roche K, Barnes CA, Huganir RL & Worley PF (1997) Homer : a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. **386120**:
- Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H & Jaenisch R (2008) Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell* **2**: 151–159
- Breen MS, Browne A, Hoffman GE, Stathopoulos S, Brennand K, Buxbaum JD & Drapeau E (2019) Transcriptional signatures of participant-derived neural progenitor cells and neurons implicate altered Wnt signaling in Phelan McDermid syndrome and autism. *bioRxiv*
- Bridgemohan C, Cochran DM, Howe YJ, Pawlowski K, Zimmerman AW, Anderson GM, Choueiri R, Sices L, Miller KJ, Ultmann M, Helt J, Forbes PW, Farfel L, Brewster SJ, Frazier JA & Neumeyer AM (2019) Investigating Potential Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Front. Integr. Neurosci.* **13**: 1–11

- Briggs R & King TJ (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **38**: 455–463
- Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, Cheyne C, Clayton-smith J, García-fiñana M, Lucas SB, Shallcross R & Baker GA (2014) The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs Rebecca. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **84**: 637–643
- Bruining H, Hardstone R, Juarez-Martinez EL, Sprengers J, Avramiea AE, Simpraga S, Houtman SJ, Poil SS, Dallares E, Palva S, Oranje B, Matias Palva J, Mansvelder HD & Linkenkaer-Hansen K (2020) Measurement of excitation-inhibition ratio in autism spectrum disorder using critical brain dynamics. *Sci. Rep.* **10**: 1–15
- Brundin P, Barbin G, Strecker RE, Isacson O, Prochiantz A & Björklund A (1988) Survival and function of dissociated rat dopamine neurones grafted at different developmental stages or after being cultured in vitro. *Dev. Brain Res.* **39**: 233–243
- Burke EE, Chenoweth JG, Shin JH, Collado-Torres L, Kim SK, Micali N, Wang Y, Colantuoni C, Straub RE, Hoepfner DJ, Chen HY, Sellers A, Shibbani K, Hamersky GR, Diaz Bustamante M, Phan BDN, Ulrich WS, Valencia C, Jaishankar A, Price AJ, et al (2020) Dissecting transcriptomic signatures of neuronal differentiation and maturation using iPSCs. *Nat. Commun.* **11**: 1–14 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-14266-z>
- Butler CP (2007) Critical Review: The Effectiveness of TEACCH on Communication and Behaviour in Children with Autism.
- Butler MG, Dazouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R & Eng C (2005) Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J. Med. Genet.* **42**: 318–321
- Cai G, Edelmann L, Goldsmith JE, Cohen N, Nakamine A, Reichert JG, Hoffman EJ, Zurawiecki DM, Silverman JM, Hollander E, Soorya L, Anagnostou E, Betancur C & Buxbaum JD (2008) Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: Efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT. *BMC Med. Genomics* **1**: 1–14
- Campbell MK & Sheng M (2018) USP8 deubiquitinates SHANK3 to control synapse density and SHANK3 activity-dependent protein levels. *J. Neurosci.* **38**: 5289–5301
- Canitano R (2007) Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **16**: 61–66
- Cantor RM, Kono N, Duvall JA, Alvarez-Retuerto A, Stone JL, Alarcón M, Nelson SF & Geschwind DH (2005) Replication of autism linkage: Fine-mapping peak at 17q21. *Am. J. Hum. Genet.* **76**: 1050–1056
- Cao SY, Hu Y, Chen C, Yuan F, Xu M, Li Q, Fang KH, Chen Y & Liu Y (2017) Enhanced derivation of human pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons by a small molecule. *Sci. Rep.* **7**: 1–11

- Cassidy S, Hannant P, Tavassoli T, Allison C, Smith P & Baron-Cohen S (2016) Dyspraxia and autistic traits in adults with and without autism spectrum conditions. *Mol. Autism* **7**: 1–6 Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13229-016-0112-x>
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M & Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**: 275–280
- Chanda S, Marro S, Wernig M & Sudhof TC (2013) Neurons generated by direct conversion of fibroblasts reproduce synaptic phenotype caused by autism-associated neuroligin-3 mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 16622–16627
- Chao H-T, Zoghbi HY & Rosenmund C (2008) MeCP2 Controls Excitatory Synaptic Strength by Regulating Glutamatergic Synapse Number. *Neuron* **23**: 1–7
- Chapleau CA, Boggio EM, Calfa G, Percy AK, Giustetto M & Pozzo-Miller L (2012) Hippocampal CA1 pyramidal neurons of Mecp2 mutant mice show a dendritic spine phenotype only in the presymptomatic stage. *Neural Plast.* **2012**:
- Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC, Albertson AJ, Larimore JL, Kudo S, Armstrong DL, Percy AK & Pozzo-Miller L (2009) Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol. Dis.* **35**: 219–233 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.001>
- Charman T, Pickles A, Simonoff E, Chandler S, Loucas T & Baird G (2011) IQ in children with autism spectrum disorders: Data from the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Psychol. Med.* **41**: 619–627
- Cheh MA, Millonig JH, Roselli LM, Ming X, Jacobsen E, Kamdar S & Wagner GC (2006) En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res.* **1116**: 166–176
- Chen C, Kim W-Y & Jiang P (2016a) Humanized neuronal chimeric mouse brain generated by neonatally engrafted human iPSC-derived primitive neural progenitor cells. *JCI Insight* **1**: 1–12
- Chen G, Trombley PQ & Van Den Pol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J. Physiol.* **494**: 451–464
- Chen J, Chen X, Li M, Liu X, Gao Y, Kou X, Zhao Y, Zheng W, Zhang X, Huo Y, Chen C, Wu Y, Wang H, Jiang C & Gao S (2016b) Hierarchical Oct4 Binding in Concert with Primed Epigenetic Rearrangements during Somatic Cell Reprogramming. *Cell Rep.* **14**: 1540–1554 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.013>
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS & Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* **408**: 936–943
- Chen MH, Su TP, Chen YS, Hsu JW, Huang KL, Chang WH, Chen TJ & Bai YM (2013) Comorbidity of allergic and autoimmune diseases in patients with autism spectrum disorder: A nationwide

- population-based study. *Res. Autism Spectr. Disord.* **7**: 205–212 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rasd.2012.08.008>
- Chen NN, Zhao DJ, Sun YX, Wang DD & Ni H (2019) Long-Term Effects of Zinc Deficiency and Zinc Supplementation on Developmental Seizure-Induced Brain Damage and the Underlying GPR39/ZnT-3 and MBP Expression in the Hippocampus. *Front. Neurosci.* **13**: 1–10
- Chen X, Levy JM, Hou A, Winters C, Azzam R, Sousa AA, Leapman RD, Nicoll RA & Reese TS (2015) PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: E6983–E6992
- Cheslack Postava K & Winter AS (2015) Short and Long Interpregnancy Intervals: Correlates And Variations by Pregnancy Timing Among U.S. Women. *Perspect. Sex. Reprod. Health* **47**: 19–26
- Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L & Renard J-P (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**: 86–90
- Ching TT, Maunakea AK, Jun P, Hong C, Zardo G, Pinkel D, Albertson DG, Fridlyand J, Mao JH, Shchors K, Weiss WA & Costello JF (2005) Epigenome analyses using BAG microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3. *Nat. Genet.* **37**: 645–651
- Cho KO, Hunt CA & Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* **9**: 929–942
- Choi S-Y, Pang K, Kim JY, Ryu JR, Kang H, Liu Z, Kim W-K, Sun W, Kim H & Han K (2015) Post-transcriptional regulation of SHANK3 expression by microRNAs related to multiple neuropsychiatric disorders. *Mol. Brain* **8**: 74 Available at:
<http://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-015-0165-3>
- Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh JI & Kim SU (2014) Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS One* **9**:
- Christensen J, Grønborg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen HL & Vestergaard M (2014) Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **99**: 198
- Chronis C, Fiziev P, Papp B, Butz S, Bonora G, Sabri S, Ernst J & Plath K (2017) Cooperative Binding of Transcription Factors Orchestrates Reprogramming. *Cell* **168**: 442-459.e20 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.016>
- Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR & Südhof TC (2007) Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. *Neuron* **54**: 919–931
- Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V & Deisseroth K (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* **497**: 332–337

- Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP & West MD (2001) Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *E-Biomed* **2**: 25–31
- Clarke LE & Barres B a (2013) Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**: 311–21 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595014>
- Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins R, Taylor AK & Loesch DZ (2007) Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *J. Autism Dev. Disord.* **37**: 738–747
- Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, Buxbaum JD, Boeckers TM & Schmeisser MJ (2015) Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Mol. Autism* **6**: 1–13 Available at: <http://www.molecularautism.com/content/6/1/23>
- Collingridge GL, Kehl SJ & McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the shaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* **334**: 33–46 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1197298/pdf/jphysiol00666-0045.pdf><http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Collins AL, Ma D, Whitehead PL, Martin ER, Wright HH, Abramson RK, Hussman JP, Haines JL, Cuccaro ML, Gilbert JR & Pericak-Vance MA (2006) Investigation of autism and GABA receptor subunit genes in multiple ethnic groups. *Neurogenetics* **7**: 167–174
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ & Greenough WT (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: Maturation and pruning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 5401–5404
- Conover JC & Todd KL (2017) Neuronal Stem Cell Niches of the Brain Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802734-9.00006-8>
- Constantino JN, Gruber CP, Davis S, Hayes S, Passanante N & Przybeck T (2004) The factor structure of autistic traits. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* **45**: 719–726
- Cook EH, Courchesne RY, Cox NJ, Lord C, Gonen D, Guter SJ, Lincoln A, Nix K, Haas R, Leventhal BL & Courchesne E (1998) Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1077–1083
- Cope EC, Briones BA, Brockett AT, Martinez S, Vigneron P-A, Opendak M, Wang SS-H & Gould E (2016) Immature Neurons and Radial Glia, But Not Astrocytes or Microglia, Are Altered in Adult Cntnap2 and Shank3 Mice, Models of Autism. *eNeuro* **3**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27785461>
- Cortesi F, Giannotti F, Sebastiani T, Panunzi S & 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.pdf.
- Courchesne E, Gazestani VH & Lewis NE (2020) Prenatal Origins of ASD: The When, What, and How of ASD Development. *Trends Neurosci.* **43**: 326–342 Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.03.005>

- Cruz-Martín A, Crespo M & Portera-Cailliau C (2010) Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J. Neurosci.* **30**: 7793–7803
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C, Holtås S, Van Roon-Mom WMC, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisén J, Dragunow M, Faull RLM & Eriksson PS (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science (80-.)*. **315**: 1243–1249
- Custo Grei L, Woodworth M, MJ Galazo HP & Macklis J (2013) Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci.* **23**: 1–7 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
- D’Alessio R, Koukoulis F, Blanchard S, Catteau J, Raïs C, Lemonnier T, Féraud O, Bennaceur-Grisicelli A, Groszer M & Maskos U (2020) Long-term development of human iPSC-derived pyramidal neurons quantified after transplantation into the neonatal mouse cortex. *Dev. Biol.:* S0012160619303628 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160619303628>
- Dailey ME & Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* **16**: 2983–2994
- Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KYS, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD & Darnell RB (2011) FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* **146**: 247–261 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.013>
- Darville H, Poulet A, Rodet-Amsellem F, Chatrousse L, Pernelle J, Boissart C, H??ron D, Nava C, Perrier A, Jarrige M, Cog?? F, Millan MJ, Bourgeron T, Peschanski M, Delorme R & Benchoua A (2016) Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome. *EBioMedicine* **9**: 293–305 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.032>
- Das GD & Altman J (1971) Transplanted Precursors of Nerve Cells : Their Fate in the Shift in Binocular Disparity Causes Compensatory Change in the Cortical Structure of Kittens. *Science (80-.)*.
- Daviaud N, Friedel RH & Zou H (2018) Vascularization and engraftment of transplanted human cerebral organoids in mouse cortex. *eNeuro* **5**: 1–18
- Davidson RL, Ephrussi B & Yamamoto K (1966) Regulation of pigment synthesis in mammalian cells as studied by somatic hybridization. : 1437–1440
- Dawson G, Jones EJH, Merkle K, Venema K, Lowy R, Faja S, Kamara D, Murias M, Ph D, Greenson J, Winter J, Smith M, Rogers SJ & Webb SJ (2012) Early Behavioral Intervention Is Associated With Normalized Brain Activity in Young Children With Autism. *J Am Acad Child Adolesc*

- Decourty L, Doyen A, Malabat C, Frachon E, Rispal D, Séraphin B, Feuerbach F, Jacquier A & Saveanu C (2014) Long Open Reading Frame Transcripts Escape Nonsense-Mediated mRNA Decay in Yeast. *Cell Rep.* **6**: 593–598
- Delgado AC, Ferrón SR, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalba A, Trujillo CM, D’Ocón P & Fariñas I (2014) Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem Cells through Nitric Oxide Induction. *Neuron* **83**: 572–585
- Denayer A, Van Esch H, De Ravel T, Frijns JP, Van Buggenhout G, Vogels A, Devriendt K, Geutjens J, Thiry P & 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
- Deng PY, Rotman Z, Blundon JA, Cho Y, Cui J, Cavalli V, Zakharenko SS & Klyachko VA (2013) Errata to FMRP Regulates Neurotransmitter Release and Synaptic Information Transmission by Modulating Action Potential Duration via BK Channels [Neuron 77, (2013) 696-711]. *Neuron* **78**: 205
- Denham M, Parish CL, Leaw B, Wright J, Reid CA, Petrou S, Dottori M & Thompson LH (2012) Neurons derived from human embryonic stem cells extend long-distance axonal projections through growth along host white matter tracts after intra-cerebral transplantation. *Front. Cell. Neurosci.* **6**: 1–14
- Derosa BA, El Hokayem J, Artimovich E, Garcia-Serje C, Phillips AW, Van Booven D, Nestor JE, Wang L, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA, Cukier HN, Nestor MW & Dykxhoorn DM (2018) Convergent Pathways in Idiopathic Autism Revealed by Time Course Transcriptomic Analysis of Patient-Derived Neurons. *Sci. Rep.* **8**: 1–15 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26495-1>
- Descheemaeker M-J, Govers V, Vermeulen P & Fryns J-P (2006) Pervasive Developmental Disorders in Prader–Willi Syndrome: The Leuven Experience in 59 Subjects and Controls. *Am. J. Hum. Genet.* **221**: 212–221
- Devlin B, Melhem N & Roeder K (2011) Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings. *Brain Res.* **1380**: 78–84 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.026>
- DiGuseppi C, Hepburn S, Davis JM, Fidler DJ, Hartway S, Lee NR, Miller L, Rutenber M & Robinson C (2010) Screening for autism spectrum disorders in children with down syndrome: Population prevalence and screening test characteristics. *J. Dev. Behav. Pediatr.* **31**: 181–191
- Dindot S V., Antalffy BA, Bhattacharjee MB & Beaudet AL (2008) The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum. Mol. Genet.* **17**: 111–118
- DiStasio MM, Nagakura I, Nadler MJ & Anderson MP (2019) T-lymphocytes and Cytotoxic Astrocyte Blebs Correlate Across Autism Brains. *Physiol. Behav.* **176**: 139–148

- Doerge CA, Inoue K, Yamashita T, Rhee DB, Travis S, Fujita R, Guarnieri P, Bhagat G, Vanti WB, Shih A, Levine L, Nik S, Chen EI, Abeliovich A, Biology C, Resources IS, Division B, Comprehensive I, Program P, Sloan M, et al (2016) Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. **488**: 652–655
- Doers ME, Musser MT, Nichol R, Berndt ER, Baker M, Gomez TM, Zhang S-C, Abbeduto L & Bhattacharyya A (2014) iPSC-Derived Forebrain Neurons from FXS Individuals Show Defects in Initial Neurite Outgrowth. *Stem Cells Dev.* **23**: 1777–1787 Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2014.0030>
- Dombret C, Nguyen T, Schakman O, Michaud JL, Hardin-Pouzet H, Bertrand MJM & De Backer O (2012) Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and sev.
- Donegan JJ, Boley AM & Lodge DJ (2018) Embryonic stem cell transplants as a therapeutic strategy in a rodent model of autism. *Neuropsychopharmacology* **43**: 1789–1798 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41386-018-0021-0>
- Donegan JJ, Tyson JA, Branch SY, Beckstead MJ, Anderson SA & Lodge DJ (2017) Stem cell-derived interneuron transplants as a treatment for schizophrenia: Preclinical validation in a rodent model. *Mol. Psychiatry* **22**: 1492–1501 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.121>
- Dong H, O'Brien RJ, Fung ET, Lanahan AA, Worley PF & Huganir RL (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain- containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* **255**: 242–243
- Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ & Phillips RA (1985) Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). : 1740–1743
- Drapeau E, Dorr NP, Elder GA & Buxbaum JD (2014) Absence of strong strain effects in behavioral analyses of Shank3-deficient mice. *DMM Dis. Model. Mech.* **7**: 667–681
- Drapeau E, Riad M, Kajiwara Y & Buxbaum JD (2018) Behavioral phenotyping of an improved mouse model of Phelan–McDermid syndrome with a complete deletion of the Shank3 gene. *eNeuro* **5**:
- Duffney LJ, Zhong P, Wei J, Matas E, Cheng J, Qin L, Ma K, Dietz DM, Kajiwara Y, Buxbaum JD & Yan Z (2015) Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Rep.*: 1–14 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26027926>
- Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W & Józkwicz A (2015) Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim. Pol.* **62**: 329–337
- Dunn E (1917) Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in the albino rat.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Carina I, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mas P De, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, et al (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat.*

- Durand CM, Perroy J, Loll F, Perrais D, Fagni L, Bourgeron T, Montcouquiol M & 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 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3252613&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Durston AJ, Timmermans JPM, Hage WJ, Hendriks HFJ, De Vries NJ, Heideveld M & Nieuwkoop PD (1989) Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340**: 140–144
- Dworzynski K, Ronald A, Bolton P & Happé F (2012) How different are girls and boys above and below the diagnostic threshold for autism spectrum disorders? *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **51**: 788–797 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaac.2012.05.018>
- Eagle RF, Romanczyk RG & Lenzenweger MF (2010) Classification of children with autism spectrum disorders: A finite mixture modeling approach to heterogeneity. *Res. Autism Spectr. Disord.* **4**: 772–781 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rasd.2010.02.001>
- Eagleson KL, Campbell DB, Thompson BL, Bergman MY & Levitt P (2011) The autism risk genes MET and PLAUR differentially impact cortical development. *Autism Res.* **4**: 68–83
- Ebrahimi S & Okabe S (2014) Structural dynamics of dendritic spines: Molecular composition, geometry and functional regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**: 2391–2398 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.06.002>
- Ehrlich I, Klein M, Rumpel S & Malinow R (2007) PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 4176–4181
- Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K & 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 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.002>
- Elston GN & Fujita I (2014) Pyramidal cell development: Postnatal spinogenesis, dendritic growth, axon growth, and electrophysiology. *Front. Neuroanat.* **8**: 1–20
- Emerson RW, Adams C, Nishino T, Hazlett HC, Wolff JJ, Zwaigenbaum L, Constantino JN, Shen MD, Swanson MR, Elison JT, Kandala S, Estes AM, Botteron KN, Collins L, Dager SR, Evans AC, Gerig G, Gu H, McKinstry RC, Paterson S, et al (2018) Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age. *Sci Transl Med.* **47**: 549–562
- Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H & Hochedlinger K (2009) Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* **41**: 968–976
- Engelhardt B (2010) T cell migration into the central nervous system during health and disease:

- Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* **1**: 79–93
- Espuny-Camacho I, Michelsen KA, Gall D, Linaro D, Hasche A, Bonnefont J, Bali C, Orduz D, Bilheu A, Herpoel A, Lambert N, Gaspard N, Péron S, Schiffmann SN, Giugliano M, Gaillard A & Vanderhaeghen P (2013) Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron* **77**: 440–456
- Espuny-Camacho I, Michelsen KA, Linaro D, Bilheu A, Acosta-Verdugo S, Herpoel A, Giugliano M, Gaillard A & Vanderhaeghen P (2018) Human Pluripotent Stem-Cell-Derived Cortical Neurons Integrate Functionally into the Lesioned Adult Murine Visual Cortex in an Area-Specific Way. *Cell Rep.* **23**: 2732–2743 Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124718306727>
- Ethell IM & Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog. Neurobiol.* **75**: 161–205
- Evans M & Kaufman M (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154–156
- Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JCD, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T & Ng HH (2009) Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat. Cell Biol.* **11**: 197–203
- Filice F, Vörckel KJ, Sungur AÖ, Wöhr M & Schwaller B (2016) Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. *Mol. Brain* **9**: 10 Available at:
<http://www.molecularbrain.com/content/9/1/10>
- Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE, Schulman H & Meyer T (2003) Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the β but not the α isoform of CaMKII. *Neuron* **39**: 283–297
- Fluss J & Korff CM (2011) Place de l'EEG dans le diagnostic des troubles neurodéveloppementaux. *Neuropsychiatr. Enfance. Adolesc.* **59**: 369–375
- Fombonne E (2003) Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: An update. *J. Autism Dev. Disord.* **33**: 365–382
- Fombonne E (2013) The epidemiology of autism: A review. *Sci. Ment. Heal. Vol. 2 Autism*: 65–82
- Forsythe ID & Westbrook GL (1988) Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central neurones. *J. Physiol.* **396**: 515–533
- Fourie C, Vyas Y, Lee K, Jung Y, Garner CC & Montgomery JM (2018) Dietary Zinc Supplementation Prevents Autism Related Behaviors and Striatal Synaptic Dysfunction in Shank3 Exon 13–16 Mutant Mice. *Front. Cell. Neurosci.* **12**: 1–14
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC & Ziv NE (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: Time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* **27**: 57–69

- Gage FH, Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB & Kelly PAT (1984) Intrahippocampal septal grafts ameliorate learning impairments in aged rats. *Science (80-.)*. **225**: 533–536
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R & Lazzari G (2003) A cloned horse born to its dam twin A. *Science (80-.)*. **301**: 1063
- García-López P, García-Marín V & Freire M (2010) Dendritic spines and development: Towards a unifying model of spinogenesis a present day review of cajal's histological slides and drawings. *Neural Plast.* **2010**:
- García-Nonell C, Ratera ER, Harris S, Hessler D, Ono MY, Tartaglia N, Marvin E, Tassone F & Hagerman RJ (2008) Secondary Medical Diagnosis in Fragile X Syndrome with and without Autism Spectrum Disorder. **0**: 1911–1916
- García-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E & Font E (2002) The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bull.* **57**: 765–775
- Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E & Ramalho-Santos M (2011) Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 36–47
- Gaspard N, Bouschet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Aemele J, Espuny-Camacho I, Herpoel A, Passante L, Schiffmann SN, Gaillard A & Vanderhaeghen P (2008) An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* **455**: 351–357 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature07287>
- Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A & Pedersen NL (2006) Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* **63**: 168–174
- Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, Mahajan M, Manaa D, Pawitan Y, Reichert J, Ripke S, Sandin S, Sklar P, Svantesson O, Reichenberg A, Hultman CM, Devlin B, Roeder K & Buxbaum JD (2014) Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat. Genet.* **46**: 881–5 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4137411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gauthier J, Champagne N, Lafrenière RG, Xiong L, Spiegelman D, Brustein E, Lapointe M, Peng H, Côté M, Noreau A, Hamdan FF, Addington AM, Rapoport JL, DeLisi LE, Krebs M-O, Joobor R, Fathalli F, Mouaffak F, Haghghi AP, Néri C, et al (2010) De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein *SHANK3* in patients ascertained for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 7863–7868 Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0906232107>
- Germain PL & Testa G (2017) Taming Human Genetic Variability: Transcriptomic Meta-Analysis Guides the Experimental Design and Interpretation of iPSC-Based Disease Modeling. *Stem Cell Reports* **8**: 1784–1796 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.012>

- Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM & Millonig JH (2004) Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry* **9**: 474–484
- Ghashghaei HT, Lai C & Anton ES (2007) Neuronal migration in the adult brain: Are we there yet? *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 141–151
- Gibson JR, Huber KM & Südhof TC (2009) Neuroligin-2 deletion selectively decreases inhibitory synaptic transmission originating from fast-spiking but not from somatostatin-positive interneurons. *J. Neurosci.* **29**: 13883–13897
- Gillberg C & Steffenburg S (1987) Outcome and prognostic factors in infantile autism and similar conditions: A population-based study of 46 cases followed through puberty. *J. Autism Dev. Disord.* **17**: 273–287
- Gipson CD & Olive FM (2017) Structural and functional plasticity of dendritic spines – root or result of behavior? *Physiol. Behav.* **176**: 139–148
- Girard SL, Dion PA, Bourassa C V., Geoffroy S, Lachance-Touchette P, Barhdadi A, Langlois M, Joobar R, Krebs MO, Dubé MP & Rouleau GA (2015) Mutation burden of rare variants in schizophrenia candidate genes. *PLoS One* **10**: 1–11
- Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, Vu TH, Shafer N, Bernier R, Ferrero GB, Silengo M, Warren ST, Moreno CS, Fichera M, Romano C, Raskind WH & Eichler EE (2011) Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet.* **7**:
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PMA, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, et al (2009) Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**: 569–572 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07953>
- Goldstein RS, Drukker M, Reubinoff BE & Benvenisty N (2002) Integration and differentiation of human embryonic stem cells transplanted to the chick embryo. *Dev. Dyn.* **225**: 80–86
- Gonçalves JT, Anstey JE, Golshani P & Portera-Cailliau C (2013) Circuit level defects in the developing neocortex of Fragile X mice. *Nat. Neurosci.* **16**: 903–909
- Gonzalez P, Machado I, Vilcaes A, Caruso C, Roth GA, Schiöth H, Lasaga M & Scimonelli T (2013) Molecular mechanisms involved in interleukin 1-beta (IL-1 β)-induced memory impairment. Modulation by alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). *Brain. Behav. Immun.* **34**: 141–150 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.08.007>
- Gouder L, Tinevez J-Y, Goubran-Botros H, Benchoua A, Bourgeron T & Cloëz-Tayarani I (2015) Three-dimensional Quantification of Dendritic Spines from Pyramidal Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Vis. Exp.* Available at: <http://www.jove.com/video/53197/three-dimensional-quantification-dendritic-spines-from-pyramidal>

- Gouder L, Vitrac A, Goubran-Botros H, Danckaert A, Tinevez J-Y, André-Leroux G, Atanasova E, Lemièrre N, Biton A, Leblond CS, Poulet A, Boland A, Deleuze J-F, Benchoua A, Delorme R, Bourgeron T & Cloëz-Tayarani I (2019) Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations. *Sci. Rep.* **9**: 94 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36993-x>
- Grabrucker AM (2013) Environmental factors in autism. *Front. Psychiatry* **3**: 1–13
- Grabrucker S, Proepper C, Mangus K, Eckert M, Chhabra R, Schmeisser MJ, Boeckers TM & Grabrucker AM (2014) The PSD protein ProSAP2/Shank3 displays synapto-nuclear shuttling which is deregulated in a schizophrenia-associated mutation. *Exp. Neurol.* **253**: 126–137 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.015>
- Granpeesheh D, Dixon DR, Tarbox J, Kaplan AM & Wilke AE (2009a) The effects of age and treatment intensity on behavioral intervention outcomes for children with autism spectrum disorders. *Res. Autism Spectr. Disord.* **3**: 1014–1022
- Granpeesheh D, Tarbox J & Dixon DR (2009b) Applied behavior analytic interventions for children with autism: A description and review of treatment research. *Ann. Clin. Psychiatry* **21**: 162–173
- Gray EG (1959) Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex. *J. Neurocytol.* **8**: 1592–1593
- Grebenyuk S & Ranga A (2019) Engineering organoid vascularization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**: 1–12
- Green H, Ephrussi B, Yoshida M & Hamerman D (1966) Synthesis of collagen and hyaluronic acid by fibroblast hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**: 41–44
- Green VA, Pituch KA, Itchon J, Choi A, O'Reilly M & Sigafos J (2006) Internet survey of treatments used by parents of children with autism. *Res. Dev. Disabil.* **27**: 70–84
- Greenberg DM, Warrier V, Allison C & Baron-Cohen S (2018) Testing the empathizing–systemizing theory of sex differences and the extreme male brain theory of autism in half a million people. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: 12152–12157
- Griesi-Oliveira K, Fogo MS, Pinto BGG, Alves AY, Suzuki AM, Morales AG, Ezquina S, Sosa OJ, Sutton GJ, Sunaga-Franze DY, Bueno AP, Seabra G, Sardinha L, Costa SS, Rosenberg C, Zachi EC, Sertie AL, Martins-de-Souza D, Reis EM, Voineagu I, et al (2020) Transcriptome of iPSC-derived neuronal cells reveals a module of co-expressed genes consistently associated with autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry* Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-020-0669-9>
- Gringras P, Gamble C, Jones AP, Wiggs L, Williamson PR, Sutcliffe A, Montgomery P, Whitehouse WP, Choonara I, Allport T, Edmond A & Appleton T (2015) Melatonin for sleep problems in children with neurodevelopmental disorders. *Drug Ther. Bull.* **53**: 117–120
- Gringras P, Nir T, Breddy J, Frydman-Marom A & Findling RL (2017) Efficacy and Safety of Pediatric Prolonged-Release Melatonin for Insomnia in Children With Autism Spectrum Disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **56**: 948-957.e4

- Grossi E, Olivieri C & Buscema M (2017) Diagnosis of autism through EEG processed by advanced computational algorithms: A pilot study. *Comput. Methods Programs Biomed.* **142**: 73–79 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2017.02.002>
- Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, Won H, Pallesen J, Agerbo E, Andreassen OA, Anney R, Awashti S, Belliveau R, Bettella F, Buxbaum JD, Bybjerg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M, Cerrato F, Chambert K, Christensen JH, Churchhouse C, et al (2019) Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nat. Genet.* **51**: 431–444
- Guilmatre A, Huguet G, Delorme R & Bourgeron T (2014) The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Dev. Neurobiol.* **74**: 113–122
- Guo B, Chen J, Chen Q, Ren K, Feng D, Mao H, Yao H, Yang J, Liu H, Liu Y, Jia F, Qi C, Lynn-Jones T, Hu H, Fu Z, Feng G, Wang W & Wu S (2019) Anterior cingulate cortex dysfunction underlies social deficits in Shank3 mutant mice. *Nat. Neurosci.* **22**: 1223–1234 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0445-9>
- Guo S, Zi X, Schulz VP, Cheng J, Zhong M, Koochaki SHJ, Megyola CM, Pan X, Heydari K, Weissman SM, Gallagher PG, Krause DS, Fan R & Lu J (2014) Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell* **156**: 649–662 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.020>
- Gurdon JB (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**: 622–640
- Haas MA, Bell D, Slender A, Lana-Elola E, Watson-Scales S, Fisher EMC, Tybulewicz VLJ & Guillemot F (2013) Alterations to dendritic spine morphology, but not dendrite patterning, of cortical projection neurons in Tc1 and Ts1Rhr mouse models of Down syndrome. *PLoS One* **8**:
- Halbedl S, Schoen M, Feiler MS, Boeckers TM & Schmeisser MJ (2016) Shank3 is localized in axons and presynaptic specializations of developing hippocampal neurons and involved in the modulation of NMDA receptor levels at axon terminals. *J. Neurochem.* **137**: 26–32
- Hallett PJ, Deleidi M, Astradsson A, Smith GA, Cooper O, Osborn TM, Sundberg M, Moore MA, Perez-Torres E, Brownell AL, Schumacher JM, Spealman RD & Isacson O (2015) Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* **16**: 269–274 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.018>
- Han K, Holder JL, Schaaf CP, Lu H, Chen H, Kang H, Tang J, Wu Z, Hao S, Cheung SW, Yu P, Sun H, Breman AM, Patel A, Lu H-C & Zoghbi HY (2013) SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* **503**: 72–7 Available at: http://www.nature.com/nature/journal/v503/n7474/full/nature12630.html?WT.ec_id=NATURE-20131107#figures
- Hardan AY, Jou RJ & Handen BL (2004) A retrospective assessment of topiramate in children and adolescents with pervasive developmental disorders. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* **14**:

- Harony-Nicolas H, De Rubeis S & Buxbaum JD (2015) Phelan McDermid syndrome: from genetic discoveries to animal models and treatments. *J Child Neurol.* **30**: 1861–1870
- Harris KM & Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: Serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* **9**: 2982–2997
- Hartshorne TS, Grialou TL & Parker KR (2005) Autistic-like behavior in CHARGE syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **133 A**: 257–261
- Hashemi E, Ariza J, Rogers H, Noctor SC & Martínez-Cerdeño V (2017) The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism. *Cereb. Cortex* **27**: 1931–1943
- Hassani Nia F, Woike D, Kloth K, Kortüm F & Kreienkamp HJ (2020) Truncating mutations in SHANK3 associated with global developmental delay interfere with nuclear β -catenin signaling. *J. Neurochem.*
- Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, Edsall LE, Kuan S, Luu Y, Klugman S, Antosiewicz-Bourget J, Ye Z, Espinoza C, Agarwahl S, Shen L, Ruotti V, Wang W, Stewart R, Thomson JA, Ecker JR, et al (2010) Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell* **6**: 479–491
- Hayes GM, Woodroffe MN & Cuzner ML (1987) Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J. Neurol. Sci.* **80**: 25–37
- He LJ, Liu N, Cheng TL, Chen XJ, Li YD, Shu YS, Qiu ZL & Zhang XH (2014) Conditional deletion of *Mecp2* in parvalbumin-expressing GABAergic cells results in the absence of critical period plasticity. *Nat. Commun.* **5**:
- Head JR & Griffin WST (1985) Functional capacity of solid tissue transplants in the brain: Evidence for immunological privilege. *Proc. R. Soc. London - Biol. Sci.* **224**: 375–387
- Heng JCD, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Orlov YL, Huss M, Yang L, Lufkin T, Lim B & Ng HH (2010) The Nuclear Receptor Nr5a2 Can Replace Oct4 in the Reprogramming of Murine Somatic Cells to Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* **6**: 167–174 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.12.009>
- Herring BE & Nicoll RA (2016) Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu. Rev. Physiol.* **78**: 351–365
- Hines RM, Wu L, Hines DJ, Steenland H, Mansour S, Dahlhaus R, Singaraja RR, Cao X, Sammler E, Hormuzdi SG, Zhuo M & El-Husseini A (2008) Synaptic imbalance, stereotypies, and impaired social interactions in mice with altered neuroligin 2 expression. *J. Neurosci.* **28**: 6055–6067
- Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K & Rudelli RD (1991) Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **41**: 289–294
- Hlushchenko I, Khanal P, Abouelezz A, Paavilainen VO & Hotulainen P (2018) ASD-associated de

- novo mutations in five actin regulators show both shared and distinct defects in dendritic spines and inhibitory synapses in cultured hippocampal neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **12**: 1–23
- Hlushchenko I, Koskinen M & Hotulainen P (2016) Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton* **73**: 435–441
- Høffding MK & Hyttel P (2015) Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* **14**: 39–53 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2014.11.003>
- Hollander E, Phillips A, Chaplin W, Zagursky K, Novotny S, Wasserman S & Iyengar R (2005) A placebo controlled crossover trial of liquid fluoxetine on repetitive behaviors in childhood and adolescent autism. *Neuropsychopharmacology* **30**: 582–589
- Holtmaat AJGD, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW & Svoboda K (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* **45**: 279–291
- Hombach-klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpissz M, Mackiewicz A & Los M (2008) Adult stem cells and their trans-differentiation potential— perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* **86**: 1301–1314
- Hoshino Y, Watanabe H, Yashima Y, Kaneko M & Kumashiro H (1984) An Investigation on Sleep Disturbance of Autistic Children. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **38**: 45–51
- Hotulainen P & Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* **189**: 619–629
- Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C & Lappalainen P (2009) Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during Dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* **185**: 323–339
- Hu VW, Addington A & Hyman A (2011) Novel autism subtype-dependent genetic variants are revealed by quantitative trait and subphenotype association analyses of Published GWAS Data. *PLoS One* **6**:
- Huang G, Chen S, Chen X, Zheng J, Xu Z, Doostparast Torshizi A, Gong S, Chen Q, Ma X, Yu J, Zhou L, Qiu S, Wang K & Shi L (2019) Uncovering the Functional Link Between SHANK3 Deletions and Deficiency in Neurodevelopment Using iPSC-Derived Human Neurons. *Front. Neuroanat.* **13**: 23 Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2019.00023/full>
- Huguet G, Benabou M & Bourgeron T (2016) The Genetics of Autism Spectrum Disorders. : 101–129 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-27069-2>
- Hull L, Lai MC, Baron-Cohen S, Allison C, Smith P, Petrides K V. & Mandy W (2019) Gender differences in self-reported camouflaging in autistic and non-autistic adults. *Autism* **24**: 352–363
- Humphreys JS, Gringras P, Blair PS, Scott N, Henderson J, Fleming PJ & Emond AM (2014) Sleep patterns in children with autistic spectrum disorders: A prospective cohort study. *Arch. Dis. Child.* **99**: 114–118

- Hussman JP, Chung RH, Griswold AJ, Jaworski JM, Salyakina D, Ma D, Konidari I, Whitehead PL, Vance JM, Martin ER, Cuccaro ML, Gilbert JR, Haines JL & Pericak-Vance MA (2011) A noise-reduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. *Mol. Autism* **2**: 1 Available at: <http://www.molecularautism.com/content/2/1/1>
- Husson T, Lecoquierre F, Cassinari K, Charbonnier C, Quenez O, Goldenberg A, Guerrot AM, Richard AC, Drouin-Garraud V, Brehin AC, Soleimani M, Taton R, Rotharmel M, Rosier A, Chambon P, Le Meur N, Joly-Helas G, Saugier-veber P, Boland A, Deleuze JF, et al (2020) Rare genetic susceptibility variants assessment in autism spectrum disorder: detection rate and practical use. *Transl. Psychiatry* **10**: Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-020-0760-7>
- Hutsler JJ, Lee DG & Porter KK (2005) Comparative analysis of cortical layering and supragranular layer enlargement in rodent carnivore and primate species. *Brain Res.* **1052**: 71–81
- Hutsler JJ & Zhang H (2010) Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* **1309**: 83–94 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>
- Ideguchi M, Palmer TD, Recht LD & Weimann JM (2010) Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets. *J. Neurosci.* **30**: 894–904
- El Idrissi A, Ding XH, Scalia J, Trenkner E, Brown WT & Dobkin C (2005) Decreased GABAA receptor expression in the seizure-prone fragile X mouse. *Neurosci. Lett.* **377**: 141–146
- Im YJ, Lee JH, Park SH, Park SJ, Rho SH, Kang GB, Kim E & Eom SH (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
- Ingiosi A, Wintler T, Schoch H, Singletary K, Righelli D, Roser L, Risso D, Frank M & Peixoto L (2019) Shank3 Modulates Sleep and Expression of Circadian Transcription Factors. *Elife*: 465799
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee Y ha, Narzisi G, Leotta A, Kendall J, Grabowska E, Ma B, Marks S, Rodgers L, Stepansky A, Troge J, Andrews P, Bekritsky M, Pradhan K, et al (2012) De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron* **74**: 285–299 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.009>
- Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW & Südhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science (80-.).* **277**: 1511–1515
- Irwin SA, Galvez R & Greenough WT (2000) Dendritic Spine Structural Anomalies in Fragile-X Mental Retardation Syndrome. *Cereb. Cortex* **10**: 1038–1044
- Isacson O, Dunnett SB & Bjorklund A (1986) Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 2728–2732
- Jacquemont S, Coe BP, Hersch M, Duyzend MH, Krumm N, Bergmann S, Beckmann JS, Rosenfeld JA & Eichler EE (2014) A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders. *Am. J. Hum. Genet.* **94**: 415–425 Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929714000597>

- Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe a, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M & Bourgeron T (2002) Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol. Psychiatry* **7**: 302–310
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C & Gillberg C (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. : 27–29
- Jang HS, Hong YJ, Choi HW, Song H, Byun SJ, Uhm SJ, Seo HG & Do JT (2016) Changes in parthenogenetic imprinting patterns during reprogramming by cell fusion. *PLoS One* **11**: 1–12
- Janowski M, Engels C, Gorelik M, Lyczek A, Bernard S, Bulte JWM & Walczak P (2014) Survival of neural progenitors allografted into the CNS of immunocompetent recipients is highly dependent on transplantation site. *Cell Transplant.* **23**: 253–262
- Jaramillo TC, Speed HE, Xuan Z, Reimers JM, Escamilla CO, Weaver TP, Liu S, Filonova I & Powell CM (2016) Novel Shank3 mutant exhibits behaviors with face validity for autism and altered striatal and hippocampal function. *Autism Res.*: 1–24
- Jaramillo TC, Speed HE, Xuan Z, Reimers JM, Liu S & Powell CM (2015) Altered Striatal Synaptic Function and Abnormal Behaviour in Shank3 Exon4-9 Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Res.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26559786>
- Jasinska M, Jasek-Gajda E, Woznicka O, Lis GJ, Pyza E & Litwin JA (2019) Circadian clock regulates the shape and content of dendritic spines in mouse barrel cortex. *PLoS One* **14**: 1–21
- Jedlicka P, Hoon M, Papadopoulos T, Vlachos A, Winkels R, Pouloupoulos A, Betz H, Deller T, Brose N, Varoqueaux F & Schwarzacher SW (2011) Increased dentate gyrus excitability in neuroligin-2-deficient mice in vivo. *Cereb. Cortex* **21**: 357–367
- Jeong J, Pandey S, Li Y, Badger JD, Lu W & Roche KW (2019) PSD-95 binding dynamically regulates NLGN1 trafficking and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**: 12035–12044
- Jesse S, Müller HP, Schoen M, Asoglu H, Bockmann J, Huppertz HJ, Rasche V, Ludolph AC, Boeckers TM & Kassubek J (2020) Severe white matter damage in SHANK3 deficiency: a human and translational study. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **7**: 46–58
- Jiang H yin, Xu L lian, Shao L, Xia R man, Yu Z he, Ling Z xin, Yang F, Deng M & Ruan B (2016) Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain. Behav. Immun.* **58**: 165–172 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.005>
- Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S & Ng HH (2008) A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **10**: 353–360
- Jiang Y hui & Ehlers MD (2013) Modeling Autism by SHANK Gene Mutations in Mice. *Neuron* **78**: 8–27 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.016>
- Jiang YH, Yuen RKC, Jin X, Wang M, Chen N, Wu X, Ju J, Mei J, Shi Y, He M, Wang G, Liang J, Wang Z, Cao D, Carter MT, Chrysler C, Drmic IE, Howe JL, Lau L, Marshall CR, et al (2013)

- Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* **93**: 249–263 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.012>
- Jiao J, Zhang M, Yang P, Huang Y, Hu X, Cai J, Yang C, Situ M, Zhang H, Fu L, Guo K & Huang Y (2020) Identification of De Novo JAK2 and MAPK7 Mutations Related to Autism Spectrum Disorder Using Whole-Exome Sequencing in a Chinese Child and Adolescent Trio-Based Sample. *J. Mol. Neurosci.* **70**: 219–229
- Jin-Chong Xu, Fan J, Wang X, Eacker SM, Kam T-I, Chen L, Yin X, Zhu J, Chi Z, Jiang H, Chen R & Dawson VL (2017) Cultured networks of excitatory projection neurons and inhibitory interneurons for studying human cortical neurotoxicity. *Physiol. Behav.* **176**: 139–148
- Jin C, Kang HR, Kang H, Zhang Y, Lee Y, Kim Y & Han K (2019) Unexpected Compensatory Increase in Shank3 Transcripts in Shank3 Knock-Out Mice Having Partial Deletions of Exons. *Front. Mol. Neurosci.* **12**: 228 Available at:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2019.00228/full>
- Johannessen M, Haugen IB, Bakken TL & Braaten Ø (2019) A 22q13.33 duplication harbouring the SHANK3 gene: Does it cause neuropsychiatric disorders? *BMJ Case Rep.* **12**: 1–5
- Johansson M (2007) AUTISM SYNDROMES IN THREE BEHAVIOURAL PHENOTYPE CONDITIONS A clinical psychiatric study of 76 individuals with Möbius spectrum
- Johnson JW & Ascher P (1990) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *57*: 85–90
- Jokiranta E, Sourander A, Suominen A, Timonen-Soivio L, Brown AS & Sillanpää M (2014) Epilepsy among children and adolescents with autism spectrum disorders: A population-based study. *J. Autism Dev. Disord.* **44**: 2547–2557
- Jong JO de, Llapashtica C, Strauss K, Provenzano F, Sun Y, Cortese GP, Brigatti KW, Corneo B, Migliori B, Kushner SA, Kellendonk C, Javitch JA, Xu B & Markx S (2019) Cortical Overgrowth in a Preclinical Forebrain Organoid Model of CNTNAP2-Associated Autism Spectrum Disorder. *bioRxiv*: 739391 Available at:
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/739391v1.full>
- Jost KL, Haase S, Smeets D, Schrode N, Schmiedel JM, Bertulat B, Herzelt H, Cremer M & Cardoso MC (2011) 3D-Image analysis platform monitoring relocation of pluripotency genes during reprogramming. *Nucleic Acids Res.* **39**:
- Jung GA, Yoon JY, Moon BS, Yang DH, Kim HY, Lee SH, Bryja V, Arenas E & Choi KY (2008) Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK- p21 Cip/WAF1 pathway. *BMC Cell Biol.* **9**: 1–12
- Just MA, Cherkassky VL, Keller TA & Minshew NJ (2004) Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: Evidence of underconnectivity. *Brain* **127**: 1811–1821

- Just MA, Keller TA, Malave VL, Kana RK & Varma S (2012) Autism as a neural systems disorder: A theory of frontal-posterior underconnectivity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**: 1292–1313 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.007>
- Kallur T, Darsalia V, Lindvall O & Kokaia Z (2006) Human fetal cortical and striatal neural stem cells generate region-specific neurons in vitro and differentiate extensively to neurons after intrastriatal transplantation in neonatal rats. *J. Neurosci. Res.* **84**: 1630–1644
- Kam M, Curtis MA, McGlashan SR, Connor B, Nannmark U & Faull RLM (2009) The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J. Chem. Neuroanat.* **37**: 196–205
- Kanjhan R, Noakes PG & Bellingham MC (2016) Emerging roles of filopodia and dendritic spines in motoneuron plasticity during development and disease. *Neural Plast.* **2016**:
- Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact.pdf. *Nerv. Child* **2**: 217–250
- Kao DI, Aldridge GM, Weiler IJ & Greenough WT (2010) Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 15601–15606
- Kataoka S, Satoh J, Fujiya H, Toyota T, Suzuki R, Itoh K & Kumagai K (1983) Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* **32**: 247–253
- Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y & Matsuda T (2013) Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **16**: 91–103
- Kathuria A, Nowosiad P, Jagasia R, Aigner S, Taylor RD, Andrae LC, Gatford NJF, Lucchesi W, Srivastava DP & Price J (2018) Stem cell-derived neurons from autistic individuals with SHANK3 mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Mol. Psychiatry*: 1–12 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2017.185>
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI & Sasai Y (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**: 31–40
- Keown C, Shih P, Nair A, Peterson N, Mulvey M & Müller RA (2013) Local functional overconnectivity in posterior brain regions is associated with symptom severity in autism spectrum disorders. *Cell Rep.* **5**: 567–572
- Khaled Saada, Hammada E & Abdel-rahmanb, Ahmed A. Sobhy KM (2013) Autistic Symptoms in Late Diagnosed Phenylketonuric Children in Upper Egypt. *J. Neurol. Res.* **3**: 122–129
- Khanzada NS, Butler MG & Manzard AM (2017) Geneanalytics pathway analysis and genetic overlap among autism spectrum disorder, bipolar disorder and Schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 1–11
- Kheradmand Z, Yarali B, Zare A, Pourpak Z, Shams S & Ashrafi MR (2014) Comparison of serum zinc and copper levels in children and adolescents with intractable and controlled epilepsy. *Iran.*

- Kielinen M, Linna SL & Moilanen I (2002) Some aspects of treatment and habilitation of children and adolescents with autistic disorder in Northern-Finland. *Int. J. Circumpolar Health* **61 Suppl 2**: 69–79
- Kieseppä T, Partonen T, Haukka J, Kaprio J & Lönqvist J (2004) High Concordance of Bipolar I Disorder in a Nationwide Sample of Twins. *Am. J. Psychiatry* **161**: 1814
- Kilpinen H, Goncalves A, Leha A, Afzal V, Alasoo K, Ashford S, Bala S, Bensaddek D, Casale FP, Oliver J, Danecek P, Faulconbridge A, Harrison PW, Kathuria A, Mccarthy SA, Meleckyte R, Memari Y, Moens N, Mann A, Streeter I, et al (2017) Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature* **546**: 370–375
- Kim DS, Lee JS, Leem JW, Huh YJ, Kim JY, Kim HS, Park IH, Daley GQ, Hwang DY & Kim DW (2010) Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev. Reports* **6**: 270–281
- Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM & Sheng M (1997) GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J. Cell Biol.* **136**: 669–678
- Kim H, Kunz PA, Mooney R, Philpot BD & Smith SL (2016) Maternal loss of Ube3a impairs experience-driven dendritic spine maintenance in the developing visual cortex. *J. Neurosci.* **36**: 4888–4894
- Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, et al (2008) Disruption of Neurexin 1 Associated with Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **82**: 199–207
- Kim SM, Flaßkamp H, Hermann A, Araúzo-Bravo MJ, Lee SC, Lee SH, Seo EH, Lee SH, Storch A, Lee HT, Schöler HR, Tapia N & Han DW (2014) Direct conversion of mouse fibroblasts into induced neural stem cells. *Nat. Protoc.* **9**: 871–881
- Kirsch AC, Huebner ARS, Mehta SQ, Howie FR, Weaver AL, Myers SM, Voigt RG & Katusic SK (2019) Association of Comorbid Mood and Anxiety Disorders with Autism Spectrum Disorder. *JAMA Pediatr.* **55905**: 63–70
- Kleckner NW & Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in xenopus oocytes. *Science (80-)*. **241**: 835–837
- Kleinsmith LJ & Jr GBP (1964) Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells'. *Cancer Res.*
- Kloth AD, Badura A, Li A, Cherskov A, Connolly SG, Giovannucci A, Bangash MA, Grasselli G, Agarikano OP, Piochon C, Tsai PT, Geschwind DH, Hansel C, Sahin M, Takumi T, Worley PF & Wang SSH (2015) Cerebellar associative sensory learning defects in five mouse autism models. *Elife* **4**: 1–26
- Knaupp AS, Buckberry S, Pflueger J, Lim SM, Ford E, Larcombe MR, Rossello FJ, de Mendoza A,

- Alaei S, Firas J, Holmes ML, Nair SS, Clark SJ, Nefzger CM, Lister R & Polo JM (2017) Transient and Permanent Reconfiguration of Chromatin and Transcription Factor Occupancy Drive Reprogramming. *Cell Stem Cell* **21**: 834-845.e6 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.007>
- Koche RP, Smith ZD, Adli M, Gu H, Ku M, Gnirke A, Bernstein BE & Meissner A (2011) Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell Stem Cell* **8**: 96–105
- Kogut I, McCarthy SM, Pavlova M, Astling DP, Chen X, Jakimenko A, Jones KL, Getahun A, Cambier JC, Pasmooij AMG, Jonkman MF, Roop DR & Bilousova G (2018) High-efficiency RNA-based reprogramming of human primary fibroblasts. *Nat. Commun.* **9**:
- Kohl C, Riccio O, Grosse J, Zanoletti O, Fournier C, Schmidt M V. & Sandi C (2013) Hippocampal Neuroigin-2 Overexpression Leads to Reduced Aggression and Inhibited Novelty Reactivity in Rats. *PLoS One* **8**:
- Korecka JA, Levy S & Isacson O (2016) In vivo modeling of neuronal function, axonal impairment and connectivity in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders using induced pluripotent stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **73**: 3–12
- Korobova F & Svitkina T (2010) Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **20**: 4524–4530
- Kouser M, Speed HE, Dewey CM, Reimers JM, Widman AJ, Gupta N, Liu S, Jaramillo TC, Bangash M, Xiao B, Worley PF & Powell CM (2013) Loss of predominant shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission. *J. Neurosci.* **33**: 18448–18468
- Krakowiak P, Goodlin-Jones B, Hertz-Picciotto I, Croen LA & Hansen RL (2008) Sleep problems in children with autism spectrum disorders, developmental delays, and typical development: A population-based study. *J. Sleep Res.* **17**: 197–206
- Kuehner JN, Bruggeman EC, Wen Z & Yao B (2019) Epigenetic regulations in neuropsychiatric disorders. *Front. Genet.* **10**: 1–30
- Kuhlendahl S, Spangenberg O, Konrad M, Kim E & Garner CC (1998) Functional analysis of the guanylate kinase-like domain in the synapse-associated protein SAP97. *Eur. J. Biochem.* **252**: 305–313
- Kwon C-H, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, Li Y, Baker SJ & Parada LF (2005) Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. *Bone* **23**: 1–7 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
- Kwon HB & Sabatini BL (2011) Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* **474**: 100–104
- Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, Homfray T, Penninger JM,

- Jackson AP & Knoblich JA (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**: 373–379 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12517>
- Landis DMD & Reese TS (1983) Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J. Cell Biol.* **97**: 1169–1178
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BCJ, Andres C, Barthélémy C, Moraine C & Briault S (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
- Laura P, Marie G, Romuald B, Catherine B, Sylvie R, Arnold M, Serge R, Nadia AH, Valérie M & Frédérique BB (2018) 22q13 deletion syndrome: communication disorder or autism? Evidence from a specific clinical and neurophysiological phenotype. *Transl. Psychiatry* **8**: Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-018-0212-9>
- Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, Giuliano F, Stordeur C, Depienne C, Mouzat K, Pinto D, Howe J, Lemièrre N, Durand CM, Guibert J, Ey E, Toro R, Peyre H, Mathieu A, Amsellem F, 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 MC & Launay JM (1999) Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biol. Psychiatry* **45**: 158–163
- Lee BK, Magnusson C, Gardner RM, Blomström Å, Newschaffer CJ, Burstyn I, Karlsson H & Dalman C (2015a) Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*: 100–105
- Lee J, Chung C, Ha S, Lee D, Kim DY, Kim H & Kim E (2015b) Shank3-mutant mice lacking exon 9 show altered excitation/inhibition balance, enhanced rearing, and spatial memory deficit. *Front. Cell. Neurosci.* **9**: 1–14
- Lennertz L, Wagner M, Wölwer W, Schuhmacher A, Frommann I, Berning J, Schulze-Rauschenbach S, Landsberg MW, Steinbrecher A, Alexander M, Franke PE, Pukrop R, Ruhrmann S, Bechdolf A, Gaebel W, Klosterkötter J, Häfner H, Maier W & Mössner R (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
- Levy D, Ronemus M, Yamrom B, Lee Y ha, Leotta A, Kendall J, Marks S, Lakshmi B, Pai D, Ye K, Buja A, Krieger A, Yoon S, Troge J, Rodgers L, Iossifov I & Wigler M (2011) Rare De Novo and Transmitted Copy-Number Variation in Autistic Spectrum Disorders. *Neuron* **70**: 886–897 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.015>
- Leyfer OT, Folstein SE, Bacalman S, Davis NO, Dinh E, Morgan J, Tager-Flusberg H & Lainhart JE (2006) Comorbid psychiatric disorders in children with autism: Interview development and rates

- of disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **36**: 849–861
- Li BM, Liu XR, Yi YH, Deng YH, Su T, Zou X & Liao WP (2011) Autism in Dravet syndrome: Prevalence, features, and relationship to the clinical characteristics of epilepsy and mental retardation. *Epilepsy Behav.* **21**: 291–295 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.04.060>
- Li D, Liu J, Yang X, Zhou C, Guo J, Wu C, Qin Y, Guo L, He J, Yu S, Liu H, Wang X, Wu F, Kuang J, Hutchins AP, Chen J & Pei D (2017) Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming. *Cell Stem Cell* **21**: 819–833.e6 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.10.012>
- Liao D, Hessler NA & Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* **375**: 400–404
- Lim MS, Shin MS, Lee SY, Minn YK, Hoh JK, Cho YH, Kim DW, Lee SH, Kim CH & Park CH (2015) Noggin over-expressing mouse embryonic fibroblasts and ms5 Stromal cells enhance directed differentiation of Dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. *PLoS One* **10**: 1–14
- Lim S, Naisbitt S, Yoon J & Hwang J (1999) Characterization of the Shank family of synaptic proteins. *J. Biol.* **274**: 29510–29518 Available at: <http://www.jbc.org/content/274/41/29510.short>
- Lim S, Sala C, Yoon J, Park S, Kuroda S, Sheng M & Kim E (2001) Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins. *Mol. Cell. Neurosci.* **17**: 385–397
- Lin B, Kramár EA, Bi X, Brucher FA, Gall CM & Lynch G (2005) Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *J. Neurosci.* **25**: 2062–2069
- Lin L, Yuan J, Sander B & Golas MM (2015) In Vitro Differentiation of Human Neural Progenitor Cells Into Striatal GABAergic Neurons. *Stem Cells Transl. Med.* **4**: 548–554
- Linaro D, Vermaercke B, Iwata R, Ramaswamy A, Libé-Philippot B, Boubakar L, Davis BA, Wierda K, Davie K, Poovathingal S, Penttila PA, Bilheu A, De Bruyne L, Gall D, Conzelmann KK, Bonin V & Vanderhaeghen P (2019) Xenotransplanted Human Cortical Neurons Reveal Species-Specific Development and Functional Integration into Mouse Visual Circuits. *Neuron* **104**: 972–986.e6
- Lindeboom RGH, Supek F & Lehner B (2016) The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. *Nat. Genet.* **48**: 1112–1118
- Lindvall O, Gustavii B, Astedt B, Lindholm T, Rehnrona S, Brundin P, Widner H, Bjorklund A, Leenders KL, Frackowiak R, Rothwell JC, Marsden CD, Steg G, Johnels B, Hoffer BJ & Freedman R. (1988) Fetal Dopamin-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease. *Lancet* **1483**: 1483–1484
- Liu ML, Zang T, Zou Y, Chang JC, Gibson JR, Huber KM & Zhang CL (2013a) Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat.*

Commun. **4**:

- Liu T, Jiang CY, Fujita T, Luo SW & Kumamoto E (2013b) Enhancement by interleukin-1 β of AMPA and NMDA receptor-mediated currents in adult rat spinal superficial dorsal horn neurons. *Mol. Pain* **9**: 1 Available at: Molecular Pain
- Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, Zhang X, Lu Y, Wang Z, Poo M & Sun Q (2018) Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* **172**: 881-887.e7 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.020>
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC & Nicoll RA (1995) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 11175–11179
- Lodato S, Shetty AS & Arlotta P (2015) Cerebral cortex assembly: Generating and reprogramming projection neuron diversity. *Trends Neurosci.* **38**: 117–125 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.11.003>
- Lois C & Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (80-.)*. **264**: 1145–1148
- Lord C, Rutter M & Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: A revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **24**: 659–685
- Lord C, Rutter M, Goode S, Heemsbergen J, Jordan H, Mawhood L & Schopler E (1989) Autism diagnostic observation schedule: A standardized observation of communicative and social behavior. *J. Autism Dev. Disord.* **19**: 185–212
- Loth E, Charman T, Mason L, Tillmann J, Jones EJH, Wooldridge C, Ahmad J, Auyeung B, Brogna C, Ambrosino S, Banaschewski T, Baron-Cohen S, Baumeister S, Beckmann C, Brammer M, Brandeis D, Bölte S, Bourgeron T, Bours C, De Bruijn Y, et al (2017) The EU-AIMS Longitudinal European Autism Project (LEAP): Design and methodologies to identify and validate stratification biomarkers for autism spectrum disorders. *Mol. Autism* **8**: 1–19
- Lotter V (1966) Epidemiology of autistic conditions in young children - 1. Prevalence. *Soc. Psychiatry* **1**: 124–135
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH & Kipnis J (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**: 337–341
- Lovaas OI (1987) Behavioral treatment and normal educational and intellectual functioning in young autistic children. *J. Consult. Clin. Psychol.* **55**: 3–9
- Lowe JK, Werling DM, Constantino JN, Rita M, Geschwind DH, Angeles L, Angeles L, Angeles L, Angeles L, Angeles L, Angeles L, Angeles L, Louis S, Angeles L & Angeles L (2016) Quantitative linkage analysis to the autism endophenotype social responsiveness identifies genome-wide significant linkage to two regions on chromosome 8. **172**: 266–275

- Lowenthal R, Paula CS, Schwartzman JS, Brunoni D & Mercadante MT (2007) Prevalence of pervasive developmental disorder in Down's syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* **37**: 1394–1395
- Lu AT-H, Dai X, Martinez-Agosto JA & Cantor RM (2012) Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Mol. Autism* **3**: 18
- Lu WY, Man HY, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF & Wang YT (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **29**: 243–254
- Lui JH, Hansen D V. & Kriegstein AR (2011) Development and evolution of the human neocortex. *Cell* **146**: 18–36 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.030>
- Luo J, Feng Q & Luo M (2017) Optogenetic activation of dorsal raphe neurons rescues the autistic-like social deficits in Shank3 knockout mice. : 950–953
- Lutz A, Pfaender S, Incearap B, Ioannidis V, Ottonelli I, Föhr KJ, Cammerer J, Zoller M, Higelin J, Giona F, Stetter M, Stoecker N, Alami NO, Schön M, Orth M, Liebau S, Barbi G, Grabrucker AM, Delorme R, Fauler M, et al (2020) Autism-associated SHANK3 mutations impair maturation of neuromuscular junctions and striated muscles. **3267**:
- Lynch CJ, Uddin LQ, Supekar K, Khouzam A, Phillips J & Menon V (2013) Default mode network in childhood autism: Posteromedial cortex heterogeneity and relationship with social deficits. *Biol. Psychiatry* **74**: 212–219 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.013>
- Ma K, Qin L, Matas E, Duffney LJ, Liu A & Yan Z (2018) Histone deacetylase inhibitor MS-275 restores social and synaptic function in a Shank3-deficient mouse model of autism. *Neuropsychopharmacology* **43**: 1779–1788 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-018-0073-1>
- Macgillavry HD, Kerr JM, Kassner J, Frost NA & Blanpied TA (2016) Shank-cortactin interactions control actin dynamics to maintain flexibility of neuronal spines and synapses. *Eur. J. Neurosci.* **43**: 179–193
- Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, Shibukawa R, Kodanaka I, Ichisaka T, Kawamura Y, Mochizuki H, Goshima N & Yamanaka S (2011) Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* **474**: 225–228
- Maher GM, O'Keefe GW, Kearney PM, Kenny LC, Dinan TG, Mattsson M & Khashan AS (2018) Association of hypertensive disorders of pregnancy with risk of neurodevelopmental disorders in offspring a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry* **75**: 809–819
- Maherali N & Hochedlinger K (2009) Tgfb β signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Nat. Methods* **6**: 1–7
- Mahic M, Che X, Susser E, Levin B, Reichborn-Kjennerud T, Magnus P, Stoltenberg C, Chauhan L, Briese T, Bresnahan M, Surén P, Hornig M, Mjaaland S & Lipkin I (2017) Epidemiological and Serological Investigation into the Role of Gestational Maternal Influenza Virus Infection and Autism Spectrum Disorders. *Am. Soc. Microbiol.* **2**: 1–8

- Malley JO, Skylaki S, Iwabuchi KA & Chantzoura E (2014) High resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells. *Nature* **499**: 88–91
- Malow BA, Marzec ML, McGrew SG, Wang L, Henderson LM & Stone WL (2006) Characterizing sleep in children with autism spectrum disorders: A multidimensional approach. *Sleep* **29**: 1563–1571
- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, et al (2017) Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **376**: 1038–1046
- Mansour AA, Gafni O, Weinberger L, Zviran A, Ayyash M, Rais Y, Krupalnik V, Zerbib M, Amann-Zalcenstein D, Maza I, Geula S, Viukov S, Holtzman L, Pribluda A, Canaani E, Horn-Saban S, Amit I, Novershtern N & Hanna JH (2012) The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* **488**: 409–413
- Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, Johnston S, Parylak SL, Jin X & Gage FH (2018) An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat. Biotechnol.* **36**: 432–441
- Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G & Wang JQ (2005) The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J. Neurosci.* **25**: 2741–2752
- Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo G, Mu Y, Chen G, Gage FH & Muotri AR (2010) A model for neural development and treatment of Rett Syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* **143**: 527–539
- Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, Amenduni M, Szekely A, Palejev D, Wilson M, Gerstein M, Grigorenko EL, Chawarska K, Pelphrey KA, Howe JR & Vaccarino FM (2015) FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* **162**: 375–390
- Marin-Padilla M (1976) Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *J. Comp. Neurol.* **167**: 63–81
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CEJ, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, et al (2008) Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **82**: 477–488
- Martin GR (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**: 7634–8 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950406>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC349323>

- Maruani A, Dumas G, Beggiato A, Traut N, Peyre H, Cohen-Freoua A, Amsellem F, Elmaleh M, Germanaud D, Launay JM, Bourgeron T, Toro R & Delorme R (2019) Morning plasma melatonin differences in autism: Beyond the impact of pineal gland volume. *Front. Psychiatry* **10**: 0–9
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR & Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **255**: 243–244
- Mattis VB, Wakeman DR, Tom C, Dodiya HB, Yeung SY, Tran AH, Bernau K, Ornelas L, Sahabian A, Reidling J, Sareen D, Thompson LM, Kordower JH & Svendsen CN (2014) Neonatal immune-tolerance in mice does not prevent xenograft rejection. *Exp. Neurol.* **254**: 90–98 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.007>
- Matveeva NM, Shilov AG, Kaftanovskaya EM, Maximovsky LP, Zhelezova AI, Golubitsa AN, Bayborodin SI, Fokina MM & Serov OL (1998) In vitro and in vivo study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocyte. *Mol. Reprod. Dev.* **50**: 128–138
- Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, Souza D, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Jones SJM, Haussler D, Marra MA, et al (2010) Conserved Role of Intragenic DNA Methylation in Regulating Alternative Promoters. **466**: 253–257
- Maury Y, Gauthier M, Peschanski M & Martinat C (2012) Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening. *BioEssays* **34**: 61–71
- Mccaughey-Chapman A & Connor B (2018) Human cortical neuron generation using cell reprogramming: A review of recent advances. *Stem Cells Dev.* **27**: 1674–1692
- McElhanon BO, McCracken C, Karpen S & Sharp WG (2014) Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Pediatrics* **133**: 872–883
- McGinley LM, Kashlan ON, Bruno ES, Chen KS, Hayes JM, Kashlan SR, Raykin J, Johe K, Murphy GG & Feldman EL (2018) Human neural stem cell transplantation improves cognition in a murine model of Alzheimer’s disease. *Sci. Rep.* **8**: 1–10 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33017-6>
- Meador KJ, Baker GA, Browning N, Clayton-Smith J, Combs-Cantrell DT, Cohen MM, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB, Privitera M & Loring DW (2009) Cognitive Function at 3 Years of Age after Fetal Exposure to Antiepileptic Drugs. *N. Engl. J. Med.*: 687–696
- Meeuwssen S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Ravid R & Van Noort JM (2003) Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia* **43**: 243–253
- Mehta SQ & Nurmi EL (2013) Genetic pathways to autism spectrum disorders. *Neuropsychiatry (London)*. **3**: 193–207
- Mei Y, Monteiro P, Zhou Y, Kim J-A, Gao X, Fu Z & Feng G (2016) Adult restoration of Shank3

- expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature* Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature16971>
- Mercati O, Danckaert A, Andre-Leroux G, Bellinzoni M, Gouder L, Watanabe K, Shimoda Y, Grailhe R, De Chaumont F, Bourgeron T & Cloez-Tayarani I (2013) Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites. *Biol. Open* **2**: 324–334 Available at: <http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.20133343>
- Mercati O, Huguet G, Danckaert A, André-Leroux G, Maruani A, Bellinzoni M, Rolland T, Gouder L, Mathieu A, Buratti J, Amsellem F, Benabou M, Van-Gils J, Beggiano A, Konyukh M, Bourgeois J-P, Gazzellone MJ, Yuen RKC, Walker S, Delépine M, et al (2016) CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry*: 1–9 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27166760>
- Michaelsen-Preusse K, Zessin S, Grigoryan G, Scharkowski F, Feuge J, Remus A & Korte M (2016) Neuronal profilins in health and disease: Relevance for spine plasticity and Fragile X syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 3365–3370
- Michelsen KA, Acosta-Verdugo S, Benoit-Marand M, Espuny-Camacho I, Gaspard N, Saha B, Gaillard A & Vanderhaeghen P (2015) Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Neuron* **85**: 982–997 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.001>
- Miermans CA, Kusters RPT, Hoogenraad CC & Storm C (2017) Biophysical model of the role of actin remodeling on dendritic spine morphology. *PLoS One* **12**: 1–14
- Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim JW, Kriks S, Taldone T, Fusaki N, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ & Studer L (2013) Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* **13**: 691–705 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.006>
- Miller M & Peters A (1981) Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* **203**: 555–573
- Ming X, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B & Wagner GC (2016) Autism spectrum disorders: Concurrent Clinical Disorders. *Neuroimmune Pharmacol.*: 643–659
- Mintz M & Hollenberg E (2019) Revisiting Lithium: Utility for Behavioral Stabilization in Adolescents and Adults with Autism Spectrum Disorder. *Psychopharmacol. Bull.* **49**: 28–40
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T & Ogawa M (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* **131**: 3133–3145
- Modabbernia A, Velthorst E & Reichenberg A (2017) Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol. Autism* **8**: 1–16
- Moldrich RX, Leanage G, She D, Dolan-Evans E, Nelson M, Reza N & Reutens DC (2013) Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav. Brain Res.* **257**: 253–264 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.049>

- Monteiro BMM, Moreira FA, Massensini AR, Moraes MFD & Pereira GS (2014) Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus* **24**: 239–248
- Moosmang S, Haider N, Klugbauer N, Adelsberger H, Langwieser N, Müller J, Stuess M, Marais E, Schulla V, Lacinova L, Goebbels S, Nave KA, Storm DR, Hofmann F & Kleppisch T (2005) Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J. Neurosci.* **25**: 9883–9892
- Morest DK (1970) A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* **130**: 265–305
- Mosca-Boidron AL, Gueneau L, Huguet G, Goldenberg A, Henry C, Gigot N, Pallesi-Pocachard E, Falace A, Duplomb L, Thevenon J, Duffourd Y, ST-Onge J, Chambon P, Rivire JB, Thauvin-Robinet C, Callier P, Marle N, Payet M, Ragon C, Botros HG, et al (2016) A de novo microdeletion of SEMA5A in a boy with autism spectrum disorder and intellectual disability. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**: 838–843
- Moss J & Howlin P (2009) Autism spectrum disorders in genetic syndromes: Implications for diagnosis, intervention and understanding the wider autism spectrum disorder population. *J. Intellect. Disabil. Res.* **53**: 852–873
- Muotri AR, Nakashima K, Toni N, Sandler VM & Gage FH (2005) Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 18644–18648
- Murakoshi H, Wang H & Yasuda R (2011) Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* **472**: 100–106
- Murphy CM, Ellie Wilson C, Robertson DM, Ecker C, Daly EM, Hammond N, Galanopoulos A, Dud L, Murphy DG & McAlonan GM (2016) Autism spectrum disorder in adults: Diagnosis, management, and health services development. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **12**: 1669–1686
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong ROL & Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* **4**: 143–150
- Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB & Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* **44**: 759–767
- Naisbitt S, Eunjoon K, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF & 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
- Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T & Yamanaka S (2010) Promotion of direct reprogramming by transformation deficient Myc.
- Nakai H, Tsumagari R, Maruo K, Nakashima A, Kikkawa U, Ueda S, Yamanoue M, Saito N, Takei N & Shirai Y (2020) mTORC1 is involved in DGK β -induced neurite outgrowth and spinogenesis. *Neurochem. Int.* **134**: 104645 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104645>

- Nakayama AY, Harms MB & Luo L (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **20**: 5329–5338
- Namerow LB, Prakash T, Bostic JQ, Prince J & Monuteaux MC (2003) Use of medication in pervasive developmental disorders. *Psychiatr. Clin. North Am.* **14**: 165–182
- Naparstek Y, Cohen IR, Fuks Z & Vlodavsky I (1984) Activated T lymphocytes produce a matrix-degrading heparan sulphate endoglycosidase. *Nature* **310**: 241–244
- Nava C, Keren B, Mignot C, Rastetter A, Chantot-Bastaraud S, Faudet A, Fonteneau E, Amiet C, Laurent C, Jacqueline A, Whalen S, Afenjar A, Périsset D, Doummar D, Dorison N, Leboyer M, Siffroi JP, Cohen D, Brice A, Héron D, et al (2014) Prospective diagnostic analysis of copy number variants using SNP microarrays in individuals with autism spectrum disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**: 71–78
- Nehme R & Barrett LE (2020) Using human pluripotent stem cell models to study autism in the era of big data. *Mol. Autism* **11**: 1–14
- Nelson SB & Valakh V (2015) Excitatory/Inhibitory balance and circuit homeostasis in Autism Spectrum Disorders A theory of excitatory/inhibitory imbalance in Autism HHS Public Access. *Neuron* **87**: 684–698 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567857/pdf/nihms713104.pdf>
- Nestor MW, Philips AW, Artimovich E, Nestor JE, Hussman JP & Blatt GJ (2016) Human Inducible Pluripotent Stem Cells and Autism Spectrum Disorder- Emerging Technologies.pdf. *Autism Res. Neurosciences* 3rd edition (2019)
- Nicholas CR, Chen J, Tang Y, Southwell DG, Chalmers N, Vogt D, Arnold CM, Chen YJJ, Stanley EG, Elefanty AG, Sasai Y, Alvarez-Buylla A, Rubenstein JLR & Kriegstein AR (2013) Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development. *Cell Stem Cell* **12**: 573–586 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.005>
- Nickless A, Bailis JM & You Z (2017) Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Biosci.* **7**: 1–12
- Nicoleau C, Varela C, Bonnefond C, Maury Y, Bugi A, Aubry L, Viegas P, Bourgois-Rocha F, Peschanski M & Perrier AL (2013) Embryonic stem cells neural differentiation qualifies the role of Wnt/ β -Catenin signals in human telencephalic specification and regionalization. *Stem Cells* **31**: 1763–1774
- Niethammer M, Kim E & Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* **16**: 2157–2163
- Nijagal A, Le T, Wegorzewska M & MacKenzie TC (2010) A mouse model of in Utero transplantation. *J. Vis. Exp.*: 10–13
- Nimchinsky EA, Oberlander AM & Svoboda K (2001) Abnormal development of dendritic spines in

- FMR1 knock-out mice. *J. Neurosci.* **21**: 5139–5146
- Noctor SC, Martinez-Cerdeño V, Ivic L & Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* **7**: 136–144
- Noggle S, Fung HL, Gore A, Martinez H, Satriani KC, Prosser R, Oum K, Paull D, Druckenmiller S, Freeby M, Greenberg E, Zhang K, Goland R, Sauer M V., Leibel RL & Egli D (2011) Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* **478**: 70–75
- Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR & Kasai H (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron* **46**: 609–622
- Noguchi J, Nagaoka A, Watanabe S, Ellis-Davies GCR, Kitamura K, Kano M, Matsuzaki M & Kasai H (2011) In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J. Physiol.* **589**: 2447–2457
- Noor A, Lionel AC, Cohen-Woods S, Moghimi N, Rucker J, Fennell A, Thiruvahindrapuram B, Kaufman L, Degagne B, Wei J, Parikh S V., Muglia P, Forte J, Scherer SW, Kennedy JL, Xu W, McGuffin P, Farmer A, Strauss J & Vincent JB (2014) Copy number variant study of bipolar disorder in Canadian and UK populations implicates synaptic genes. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **165**: 303–313
- O'Reilly C, Lewis JD & Elsabbagh M (2017) Is functional brain connectivity atypical in autism? A systematic review of EEG and MEG studies. *PLoS One* **12**: 1–28
- Oblak A, Gibbs T.T & Blatt G.J. (2009) Decreased GABAA receptors and benzodiazepine binding sites in the anterior cingulate cortex in autism. *Autism Res.* **2**: 205–219 Available at: Autism Res. Author manuscript; available in PMC 2010 August 1
- Oblak AL (2010) Decreased GABAB Receptors in the Cingulate Cortex and Fusiform Gyrus in Autism. *J Neurochem.* **5**:
- Oga T, Elston GN & Fujita I (2017) Postnatal dendritic growth and spinogenesis of layer-V pyramidal cells differ between visual, inferotemporal, and prefrontal cortex of the macaque monkey. *Front. Neurosci.* **11**: 1–12
- Okabe S, Miwa A & Okado H (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J. Neurosci.* **21**: 6105–6114
- Okamoto KI, Nagai T, Miyawaki A & Hayashi Y (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* **7**: 1104–1112
- Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM, Cahan P, Marcarci BO, Unternaehrer J, Gupta PB, Lander ES, Armstrong SA & Daley GQ (2012) Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* **483**: 598–602 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10953>
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H & Perry ACF (2000) Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science (80-.).* **289**: 1188–1190

- Orekhova E V., Elsabbagh M, Jones EJ, Dawson G, Charman T, Baron-Cohen S, Bedford R, Bolton P, Fernandes J, Ganea N, Garwood H, Gliga T, Hudry K, Murias M, Ribeiro H, Tucker L, Volein A & Webb SJ (2014) EEG hyper-connectivity in high-risk infants is associated with later autism. *J. Neurodev. Disord.* **6**: 1–11
- Ourednik V, Ourednik J, Flax JD, Zawada WM, Hutt C, Yang C, Park KI, Kim SU, Sidman RL, Freed CR & Snyder EY (2001) Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain. *Science (80-.)*. **293**: 1820–1824
- Ousley O, Nichole Evans A, Fernandez-Carriba S, Smearman EL, Rockers K, Morrier MJ, Evans DW, Coleman K & Cubells J (2017) Examining the overlap between autism spectrum disorder and 22q11.2 deletion syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 1–11
- Ouss L, Leunen D, Laschet J, Chemaly N, Barcia G, Losito EM, Aouidad A, Barrault Z, Desguerre I, Breuillard D & Nabbout R (2019) Autism spectrum disorder and cognitive profile in children with Dravet syndrome: Delineation of a specific phenotype. *Epilepsia Open* **4**: 40–53
- Ozonoff S & Cathcart K (1998) Effectiveness of a home program intervention for young children with autism. *J. Autism Dev. Disord.* **28**: 25–32 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546299>
- Padmashri R, Reiner BC, Suresh A, Spartz E & Dunaevsky A (2013) Altered structural and functional synaptic plasticity with motor skill learning in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **33**: 19715–19723
- Pagan C, Delorme R, Callebort J, Goubran-Botros H, Amsellem F, Drouot X, Boudebessé C, Dudal KL, Ngo-Nguyen N, Laouamri H, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T & Launay JM (2014) The serotonin-N-acetylserotonin-melatonin pathway as a biomarker for autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry* **4**:
- Pagani M, Bertero A, Liska A, Galbusera A, Sabbioni M, Barsotti N, Colenbier N, Marinazzo D, Scattoni ML, Pasqualetti M & Gozzi A (2019) Deletion of Autism Risk Gene Shank3 Disrupts Prefrontal Connectivity. *J. Neurosci.* **39**: 5299–5310 Available at: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2529-18.2019>
- Pan F, Aldridge GM, Greenough WT & Gan WB (2010) Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 17768–17773
- Panerai S, Ferrante L & Zingale M (2002) Benefits of the Treatment and Education of Austistic and Communication Handicapped Children (TEACCH) programme as compared with a non-specific approach. *J. Intellect. Disabil. Res.* **46**: 318–327
- Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastiano V, Marro S, Südhof TC & Wernig M (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* **476**: 220–223
- Parikshak NN, Luo R, Zhang A, Won H, Lowe JK, Chandran V, Horvath S & Geschwind DH (2013)

- XIntegrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell* **155**: 1008 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.031>
- Parker KJ, Oztan O, Libove RA, Sumiyoshi, Raena D, Jackson LP, Karhson, Debra S, Summers JE, Hinman KE, Motonaga KS, Phillips, Jennifer M, Carson DS, Garner JP & Hardan AY (2017) Intranasal oxytocin treatment for social deficits and.pdf.
- Parmar M & Björklund A (2020) From Skin to Brain: A Parkinson's Disease Patient Transplanted with His Own Cells. *Cell Stem Cell* **27**: 8–10
- Parnass Z, Tashiro A & Yuste R (2000) Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* **10**: 561–568
- Pearson DA & Santos CW (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.
- Pearson T, Markees TG, Serreze D V., Pierce MA, Marron MP, Wicker LS, Peterson LB, Shultz LD, Mordes JP, Rossini AA & Greiner DL (2003) Genetic Disassociation of Autoimmunity and Resistance to Costimulation Blockade-Induced Transplantation Tolerance in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.* **171**: 185–195
- Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, Lascola CD, Fu Z & Feng G (2011) Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* **472**: 437–442
- Peixoto RT, Chantranupong L, Hakim R, Levasseur J, Wang W, Merchant T, Gorman K, Budnik B & Sabatini BL (2019) Abnormal Striatal Development Underlies the Early Onset of Behavioral Deficits in Shank3B^{-/-} Mice. *Cell Rep.* **29**: 2016-2027.e4 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.021>
- Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KC, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A, Golshani P, Trachtenberg JT, Peles E & Daniel H (2011) Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities and core autism-related deficits. *Cell* **147**: 235–246
- Peñagarikano O, Lázaro MT, Lu X, Gordon A, Dong H, Lam HA, Peles E, Maidment NT, Murphy NP, Yang XW, Golshani P & Geschind DH (2015) Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the Cntnap2 mouse model of autism. *Sci. Transl. Med.* **7**: 1–26
- Penzes P, Cahill ME, Jones K a, VanLeeuwen J-E & Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* **14**: 285–293 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2741>
- Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL & Studer L (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 12543–12548
- Peters-Scheffer N, Didden R, Korzilius H & Sturmey P (2011) A meta-analytic study on the

- effectiveness of comprehensive ABA-based early intervention programs for children with Autism Spectrum Disorders. *Res. Autism Spectr. Disord.* **5**: 60–69
- Peters A & Kaiserman-Abramof IR (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* **127**: 321–355
- Petros TJ, Tyson JA & Anderson SA (2011) Pluripotent Stem Cells for the Study of CNS Development. *Front. Mol. Neurosci.* **4**:
- Pettit DL, Perlman S & Malinow R (1994) Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. *Science (80-.)*. **266**: 1881–1885
- Peykov S, Berkel S, Schoen M, Weiss K, Degenhardt F, Strohmaier J, Weiss B, Proepper C, Schratz G, Nöthen MM, Boeckers TM, Rietschel M & Rappold GA (2015) Identification and functional characterization of rare SHANK2 variants in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **20**: 1489–1498
- Pfaender S, Sauer AK, Hagemeyer S, Mangus K, Linta L, Liebau S, Bockmann J, Huguet G, Bourgeron T, Boeckers TM & Grubler AM (2017) Zinc deficiency and low enterocyte zinc transporter expression in human patients with autism related mutations in SHANK3. *Sci. Rep.* **7**: 1–15
- Pfrieger FW & Barres BA (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science (80-.)*. **277**: 1684–1687
- Phelan MC, Rogers RC, Saul RA, Stapleton GA, Sweet K, McDermid H, Shaw SR, Claytor J, Willis J & Kelly DP (2001) 22Q13 Deletion Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **101**: 91–99
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA & Klein PS (2001) Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J. Biol. Chem.* **276**: 36734–36741
- Phillips M & Pozzo-Miller L (2014) Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neurosci. Lett.* **601**: 30–40 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.011>
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z, Vorstman JAS, Thompson A, Regan R, Pilorge M, Pellicchia G, Pagnamenta AT, Oliveira B, Marshall CR, Magalhaes TR, Lowe JK, et al (2014) Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am. J. Hum. Genet.* **94**: 677–694
- Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, et al (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**: 368–372 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09146>
- Piton A, Jouan L, Rochefort D, Dobrzyniecka S, Lachapelle K, Dion PA, Gauthier J & Rouleau GA (2013) Analysis of the effects of rare variants on splicing identifies alterations in GABA A receptor genes in autism spectrum disorder individuals. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**: 749–756
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dal Y, Boone J, Walker S, Ayares

- DL, Colman A & Campbell KHS (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**: 86–90
- Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, Bar-Nur O, Cheloufi S, Stadtfeld M, Figueroa ME, Robinton D, Natesan S, Melnick A, Zhu J, Ramaswamy S & Hochedlinger K (2012) A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* **151**: 1617–1632 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.039>
- Polyak A, Kubina RM & Girirajan S (2015) Comorbidity of intellectual disability confounds ascertainment of autism: Implications for genetic diagnosis. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **168**: 600–608
- Postorino V, Fatta LM, Sanges V, Giovagnoli G, De Peppo L, Vicari S & Mazzone L (2016) Intellectual disability in Autism Spectrum Disorder: Investigation of prevalence in an Italian sample of children and adolescents. *Res. Dev. Disabil.* **48**: 193–201 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ridd.2015.10.020>
- Prè D, Nestor MW, Sproul AA, Jacob S, Koppensteiner P, Chinchalongporn V, Zimmer M, Yamamoto A, Noggle SA & Arancio O (2014) A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *PLoS One* **9**:
- Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L & Westhusin M (2002) A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* **415**: 2002
- Qin L, Ma K, Wang Z, Hu Z, Matas E, Wei J & Yan Z (2018) Social deficits in Shank3-deficient mouse models of autism are rescued by histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Nat. Neurosci.* **21**: Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0110-8>
- Que J, El Oakley RM, Salto-Tellez M, Wong N, De Kleijn DPV, Teh M, Retnam L & Lim SK (2004) Generation of hybrid cell lines with endothelial potential from spontaneous fusion of adult bone marrow cells with embryonic fibroblast feeder. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **40**: 143–149
- Quintanilla RH, Asprer JST, Vaz C, Tanavde V & Lakshmiathy U (2014) CD44 is a negative cell surface marker for pluripotent stem cell identification during human fibroblast reprogramming. *PLoS One* **9**:
- Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, Mccuine S, Burge CB, Sharp PA & Young RA (2011) c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* **141**: 432–445
- Rakic (1974) Neurons in Rhesus Monkey Visual Cortex: Systematic Relation between Time of Origin and Eventual Disposition. *Science* (80-).
- Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* **145**: 61–83
- Ranson SW (1909) Transplantation of the spinal ganglion into the brain. : 176–178
- Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES & Aiden EL (2014) A 3D map of the human genome at kilobase

- resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* **159**: 1665–1680
- Real R, Peter M, Trabalza A, Khan S, Smith MA, Dopp J, Barnes SJ, Momoh A, Strano A, Volpi E, Knott G, Livesey FJ & De Paola V (2018) In vivo modeling of human neuron dynamics and Down syndrome. *Science (80-.)*. **362**: eaau1810 Available at: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aau1810>
- Reddihough DS (2019) Effect of Fluoxetine on Obsessive-Compulsive Behaviors in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorders A Randomized Clinical Trial.
- Reddy KS (2005) Cytogenetic abnormalities and fragile-x syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med. Genet.* **6**: 1–16
- Reichow B, Hume K, Barton EE & Boyd BA (2012) Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**:
- Reim D, Distler U, Halbedl S, Verpelli C, Sala C, Bockmann J, Tenzer S, Boeckers TM & Schmeisser MJ (2017) Proteomic Analysis of Post-synaptic Density Fractions from Shank3 Mutant Mice Reveals Brain Region Specific Changes Relevant to Autism Spectrum Disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **10**: 1–10 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00026/full>
- Relaix F & Zammit PS (2012) Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: The cell on the edge returns centre stage. *Dev.* **139**: 2845–2856
- Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P & Tessier-Lavigne M (2014) IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**: 896–910 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>
- Reynolds AM, Soke GN, Sabourin KR, Hepburn S, Katz T, Wiggins LD, Schieve LA & Levy SE (2019) Sleep problems in 2-to 5-year-olds with autism spectrum disorder and other developmental delays. *Pediatrics* **143**:
- Rhine MA, Parrott JM, Schultz MN, Kazdoba TM & Crawley JN (2019) Hypothesis-driven investigations of diverse pharmacological targets in two mouse models of autism. *Autism Res.* **12**: 401–421
- Richdale AL & Prior MR (1995) The sleep/wake rhythm in children with autism. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **4**: 175–186
- Risher WC, Kim N, Koh S, Choi JE, Mitev P, Spence EF, Pilaz LJ, Wang D, Feng G, Silver DL, Soderling SH, Yin HH & Eroglu C (2018) Thrombospondin receptor $\alpha 2\delta$ -1 promotes synaptogenesis and spinogenesis via postsynaptic Rac1. *J. Cell Biol.* **217**: 3747–3765
- Roak BJO, Vives L, Fu W, Egertson JD, Stanaway IB, Phelps IG, Carvill G, Kumar A, Lee C, Ankenman K, Munson J, Hiatt JB, Turner EH, Levy R, Day DRO, Krumm N, Coe BP, Martin BK, Borenstein E, Nickerson DA, et al (2012) Multiplex Targeted Sequencing Identifies Recurrently Mutated Genes in Autism Spectrum Disorders. *Science (80-.)*. **23**: 1619–1623
- Rodríguez-Moreno A & Lerma J (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves a

- metabotropic function. *Neuron* **20**: 1211–1218
- Ronemus M, Iossifov I, Levy D & Wigler M (2014) The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nat. Rev. Genet.* **15**: 133–141
- Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann WE & Law P a (2009) Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **163**: 907–914
- Rossignol DA & Frye RE (2012) Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* **17**: 290–314
- Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, Bockaert J & Fagni L (2005) Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J. Neurosci.* **25**: 3560–70 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814786>
- Roy A, Roy M, Deb S, Unwin G & Roy A (2015) Are opioid antagonists effective in attenuating the core symptoms of autism spectrum conditions in children: A systematic review. *J. Intellectual Disabil. Res.* **59**: 293–306
- De Rubeis S & Buxbaum JD (2015) Recent Advances in the Genetics of Autism Spectrum Disorder. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **15**:36:
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek a., Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S, Singh T, Klei L, Kosmicki J, Fu S-C, Aleksic B, Biscaldi M, Bolton PF, Brownfeld JM, Cai J, Campbell NG, et al (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**: 209–15 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4402723&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rubenstein JLR (2011) Development of the Cerebral Cortex: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *J Child Psychol Psychiatry* **52**: 339–355
- Rubenstein JLR & Merzenich MM (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/ inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* **2**: 255–267 Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x/asset/j.1601-183X.2003.00037.x.pdf?v=1&t=h7cdclfv&s=50e0d31cac72e990f1592cbac85b66da0e241524>
- Rumpel S, LeDoux J, Zador A & Malinow R (2005) Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science (80-)*. **308**: 83–88
- Rumsey RK, Rudser K, Delaneu K, Potegal M, Whiteley CB & Shapiro E (2011) Acquired Autistic Behaviors in Children with Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *Bone* **23**: 1–7
- RUPP RU on PP (RUPP) AN (2005) Randomized, Controlled, Crossover Trial.pdf.
- Russo FB, Brito A, de Freitas AM, Castanha A, de Freitas BC & Beltrão-Braga PCB (2019) The use of iPSC technology for modeling Autism Spectrum Disorders. *Neurobiol. Dis.* **130**: 104483 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104483>
- Russo FB, Freitas BC, Pignatari GC, Fernandes IR, Sebat J, Muotri AR & Beltrão-Braga PCB (2018)

- Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biol. Psychiatry* **83**: 569–578 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.021>
- Rust MB, Gurniak CB, Renner M, Vara H, Morando L, Görlich A, Sassoè-Pognetto M, Banachabouchi M Al, Giustetto M, Triller A, Choquet D & Witke W (2010) Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J.* **29**: 1889–1902
- Rynkiewicz A & Łucka I (2018) Autism spectrum disorder (ASD) in girls. Co-occurring psychopathology. Sex differences in clinical manifestation. *Psychiatr. Pol.* **52**: 629–639
- Sadakata T, Washida M, Iwayama Y, Shoji S, Sato Y, Ohkura T, Katoh-semba R, Nakajima M, Sekine Y, Tanaka M, Nakamura K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Mori N, Detera-wadleigh SD, Ichikawa H, Itohara S, Yoshikawa T & Furuichi T (2007) Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients Tetsushi. *J. Clin. Invest.* **117**:
- Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, Woltjen K, Nagy A & Wrana JL (2010) Functional genomics reveals a BMP-Driven mesenchymal-to-Epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**: 64–77 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.015>
- Sandbank M, Bottema-Beutel K, Crowley S, Cassidy M, Dunham K, Feldman JI, Crank J, Albarran SA, Raj S, Mahbub P & Woynaroski TG (2020) Project AIM: Autism intervention meta-analysis for studies of young children. *Psychol. Bull.* **146**: 1–29
- Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta AR, Thomson SA, Mason CE, Bilguvar K, Celestino-Soper PBS, Choi M, Crawford EL, Davis L, Davis Wright NR, Dhodapkar RM, DiCola M, DiLullo NM, et al (2011) Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron* **70**: 863–885
- Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Di Lullo NM, Parikshak NN, Stein JL, Walker MF, Ober GT, Teran NA, Song Y, El-Fishawy P, Murtha RC, Choi M, Overton JD, Bjornson RD, Carriero NJ, et al (2012) De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* **485**: 237–241
- Sandin S, Kolevzon A, Levine SZ, Hultman CM & Reichenberg A (2013) Parental and Perinatal Risk Factors for Autism: Epidemiological Findings and Potential Mechanisms Elsevier Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391924-3.00013-2>
- Sandin S, Lichtenstein P, Larsson H, Cm H & Reichenberg a (2014) The familial risk of autism . **311**: 24794370
- Sandin S, Schendel D, Magnusson P, Hultman C, Surén P, Susser E, GrØnborg T, Gissler M, Gunnes N, Gross R, Henning M, Bresnahan M, Sourander A, Hornig M, Carter K, Francis R, Parner E, Leonard H, Rosanoff M, Stoltenberg C, et al (2016) Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Mol. Psychiatry* **21**: 693–700

- Sarasua SM, Boccuto L, Sharp JL, Dwivedi A, Chen CF, Rollins JD, Rogers RC, Phelan K & DuPont BR (2014) Clinical and genomic evaluation of 201 patients with Phelan-McDermid syndrome. *Hum. Genet.* **133**: 847–859
- Sarowar T, Chhabra R, Vilella A, Boeckers TM, Zoli M & Grabrucker AM (2016) Activity and circadian rhythm influence synaptic Shank3 protein levels in mice. *J. Neurochem.*: 887–895
- Sasaki T, Kuga N, Namiki S, Matsuki N & Ikegaya Y (2011) Locally synchronized astrocytes. *Cereb. Cortex* **21**: 1889–1900
- Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, Peng M, Collins R, Grove J, Klei L, Stevens C, Reichert J, Mulhern MS, Artomov M, Gerges S, Sheppard B, Xu X, Bhaduri A, Norman U, Brand H, et al (2020) Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell* **180**: 568-584.e23
- Sauer FC (1935) Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* **62**: 377–405
- Sauer ME & Walker BE (1959) Radioautographic Study of Interkinetic Nuclear Migration in the Neural Tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**: 557–560
- Sawada M, Huang S, Hirota Y, Kaneko N & Sawamoto K (2011) Neuronal Migration in the Adult Brain. In *Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology*, Seki T Sawamoto K Parent JM & Alvarez-Buylla A (eds) pp 337–355. Tokyo: Springer Japan Available at: https://doi.org/10.1007/978-4-431-53933-9_14
- Scemes E & Giaume C (2006) Astrocyte Calcium Waves. *Glia* **54**: 716–725
- Sceniak MP, Fedder KN, Wang Q, Droubi S, Babcock K, Patwardhan S, Wright-Zornes J, Pham L & Sabo SL (2019) An autism-associated mutation in GluN2B prevents NMDA receptor trafficking and interferes with dendrite growth. *J. Cell Sci.* **132**:
- Schafer ST, Paquola ACM, Stern S, Gosselin D, Ku M, Pena M, Kuret TJM, Liyanage M, Mansour AA, Jaeger BN, Marchetto MC, Glass CK, Mertens J & Gage FH (2019) Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. *Nat. Neurosci.* **22**: 243–255 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41593-018-0295-x>
- Schikorski T & Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* **17**: 5858–5867
- Schikorski T & Stevens CF (1999) Quantitative fine-structural analysis of olfactory. *Neurobiology* **96**: 4107–4112
- Schmidt RJ, Tancredi DJ, Krakowiak P, Hansen RL & Ozonoff S (2014) Maternal intake of supplemental iron and risk of autism spectrum disorder. *Am. J. Epidemiol.* **180**: 890–900
- Schopler E, Van Bourgondien M, Wellman G & Love S (2010) Childhood autism rating scale-second edition (CARS2): Manual. *Los Angeles West. Psychol. Serv.*
- Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF & Daly K (1980) Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J. Autism Dev. Disord.* **10**: 91–103
- Schreck KA, Williams K & Smith AF (2004) A comparison of eating behaviors between children with

- and without autism. *J. Autism Dev. Disord.* **34**: 433–438
- Schwartz CM, Tavakoli T, Jamias C, Park SS, Maudsley S, Martin B, Phillips TM, Yao PJ, Itoh K, Ma W, Rao MS, Arenas E & Mattson MP (2013) Stromal factors SDF1 α , sFRP1, and VEGFD induce dopaminergic neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *J. Neurosci. Res.* **90**: 1367–1381
- Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, Hubschman JP, Davis JL, Heilwell G, Spirn M, Maguire J, Gay R, Bateman J, Ostrick RM, Morris D, Vincent M, Anglade E, Del Priore L V. & Lanza R (2015) Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* **385**: 509–516 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)
- Schwartzentruber J, Foskolou S, Kilpinen H, Rodrigues J, Alasoo K, Knights AJ, Patel M, Goncalves A, Ferreira R, Benn CL, Wilbrey A, Bictash M, Impey E, Cao L, Lainez S, Loucif AJ, Whiting PJ, Gutteridge A & Gaffney DJ (2018) Molecular and functional variation in iPSC-derived sensory neurons. *Nat. Genet.* **50**: 54–61
- Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, Park TY, Lee N, Ko S, Jeon J, Cha Y, Kim K, Li Q, Henchcliffe C, Kaplitt M, Neff C, Rapalino O, Seo H, Lee IH, Kim J, Kim T, Petsko GA, Ritz J, et al (2020) Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson’s Disease. *N. Engl. J. Med.* **382**: 1926–1932
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese- C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee Y, Hicks J, Sarah J, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, et al (2010) Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science (80-.).* **316**: 445–449
- de Sena Cortabitarte A, Degenhardt F, Strohmaier J, Lang M, Weiss B, Roeth R, Giegling I, Heilmann-Heimbach S, Hofmann A, Rujescu D, Fischer C, Rietschel M, Nöthen MM, Rappold GA & Berkel S (2017) Investigation of SHANK3 in schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **174**: 390–398
- Serajee FJ, Zhong H, Nabi R & Huq AHMM (2003) The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism. *J. Med. Genet.* **40**: 1–6
- Serakinci N & Keith WN (2006) Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur. J. Cancer* **42**: 1243–1246
- Serret S, Thümmel S, Dor E, Vesperini S, Santos A & Askenazy F (2015) Lithium as a rescue therapy for regression and catatonia features in two SHANK3 patients with autism spectrum disorder: case reports. *BMC Psychiatry* **15**: 107 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4428105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://bmcp psychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12888-015-0490-1%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/s12888-015-0490-1>

- Serreze D V., Gaedeke JW & Leiter EH (1993) Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: Defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 9625–9629
- Serur Y, Sofrin Frumer D, Daon K, Sobol-Havia D, Weinberger R, Shulman C & Gothelf D (2019) Psychiatric disorders and autism in young children with 22q11.2 deletion syndrome compared to children with idiopathic autism. *Eur. Psychiatry* **55**: 116–121
- Sgadò P, Genovesi S, Kalinovsky A, Zunino G, Macchi F, Allegra M, Murenu E, Provenzano G, Tripathi PP, Casarosa S, Joyner AL & Bozzi Y (2013) Loss of GABAergic neurons in the hippocampus and cerebral cortex of Engrailed-2 null mutant mice: Implications for autism spectrum disorders. *Exp. Neurol.* **247**: 496–505 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.021>
- Shapiro E, King K, Ahmed A, Rudser K, Rumsey R, Yund B, Delaney K, Nestrasil I, Whitley C & Potegal M (2016) The neurobehavioral phenotype in mucopolysaccharidosis Type IIIB: An exploratory study. *Mol. Genet. Metab. Reports* **6**: 41–47 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.01.003>
- Sharma SR, Gonda X & Tarazi FI (2018) Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol. Ther.* **190**: 91–104 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.007>
- Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, Portmann T, Shu R, Sebastiano V, Krawisz A, Froehlich W, Bernstein J a., Hallmayer JF & Dolmetsch RE (2013) SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* **503**: 267–271 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12618>
- Sheng M & Kim E (2000) The Shank family of scaffold proteins. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 1): 1851–1856
- Shi R, Redman P, Ghose D, Liu Y, Ren X, Ding LJ, Liu M, Jones KJ & Xu W (2017) Shank proteins differentially regulate synaptic transmission. *eNeuro* **4**: 1–12
- Shi Y, Kirwan P & Livesey FJ (2012a) Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat. Protoc.* **7**: 1836–1846
- Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HPC & Livesey FJ (2012b) Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* **15**: 477–486
- Silver J & Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 146–156
- Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T & Baird G (2008) Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: Prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **47**: 921–929
- Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A & Chandra R (2015) Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**: 1–18
- Singhal N, Graumann J, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Han DW, Greber B, Gentile L, Mann M & Schöler

- HR (2010) Chromatin-remodeling components of the baf complex facilitate reprogramming. *Cell* **141**: 943–955
- Sinzig J, Walter D & Doepfner M (2009) Attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. *J. Atten. Disord.* **13**: 83–96
- Sive HL, Draper BW, Harland RM & Weintraub H (1990) Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* **4**: 932–942
- Snyder JM, Hagan CE, Bolon B & Keene CD (2018) 20. Nervous System Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00020-8>
- Song B, Schweitzer JS, Kim K, Song B, Cha Y, Ko S, Jeon J, Lee N, Seo H, Park K, Lee I, Lopes C, Feitosa M, Luna MJ, Jung JH, Kim J, Hwang D, Cohen BM, Teicher MH, Leblanc P, et al (2020) Human autologous iPSC – derived dopaminergic progenitors restore motor function in Parkinson ’ s disease models Graphical abstract Find the latest version : Human autologous iPSC – derived dopaminergic progenitors restore motor function in Parkinson ’ s d. **130**: 904–920
- Song H, Stevens CF & Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**: 39–44
- Soorya L, Kolevzon A, Zweifach J, Lim T, Dobry Y, Schwartz L, Frank Y, Wang AT, Cai G, Parkhomenko E, Halpern D, Grodberg D, Angarita B, Willner JP, Yang A, Canitano R, Chaplin W, Betancur C & Buxbaum JD (2013a) Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. *Mol. Autism* **4**: 1–17
- Soorya L V., Carpenter L a. & Warren Z (2013b) Behavioral and Psychosocial Interventions for Individuals with ASD Elsevier Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391924-3.00005-3>
- Sotelo C (1990) Cerebellar synaptogenesis: What we can learn from mutant mice. *J. Exp. Biol.* **153**: 225–249
- Souders MC, Mason TBA, Valladares O, Bucan M, Levy SE, Mandell DS, Weaver TE & Pinto-Martin J (2009) Sleep behaviors and sleep quality in children with autism spectrum disorders. *Sleep* **32**: 1566–1578
- Soufi A, Donahue G & Zaret KS (2012) Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors’ initial engagement with the genome. *Cell* **151**: 994–1004
- Soufi A, Garcia MF, Jaroszewicz A, Osman N, Pellegrini M & Zaret KS (2015) Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* **161**: 555–568
- Speed HE, Kouser M, Xuan Z, Liu S, Duong A & Powell CM (2019) Apparent genetic rescue of adult shank3 exon 21 insertion mutation mice tempered by appropriate control experiments. *eNeuro* **6**: 1–20
- Speed HE, Kouser M, Xuan Z, Reimers JM, Ochoa CF, Gupta N, Liu S & Powell XCM (2015) Autism-Associated Insertion Mutation (InsG) of Shank3 Exon 21 Causes Impaired Synaptic

- Transmission and Behavioral Deficits. **35**: 9648–9665
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC & Keating MT (2004) CaV1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**: 19–31
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**: 206–221
- Srivastava S, Scherrer B, Prohl AK, Filip-Dhima R, Kapur K, Kolevzon A, Buxbaum JD, Berry-Kravis E, Soorya L, Thurm A, Powell CM, Bernstein JA, Warfield SK & Sahin M (2019) Volumetric Analysis of the Basal Ganglia and Cerebellar Structures in Patients with Phelan-McDermid Syndrome. *Pediatr. Neurol.* **90**: 37–43
- Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT & Hochedlinger K (2008) Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse. *Cell Stem Cell* **2**: 230–240
- Stern BYP, Edwards FA & Sakmann B (1992) FAST AND SLOW COMPONENTS OF UNITARY EPSCs ON STELLATE CELLS ELICITED BY FOCAL STIMULATION IN SLICES OF RAT VISUAL CORTEX. *J. Physiol.*: 247–278
- Stern WM, Sander JW, Rothwell JC & Sisodiya SM (2017) Impaired intracortical inhibition demonstrated in vivo in people with Dravet syndrome. *Neurology* **88**: 1659–1665
- Stevens LC (1970) Experimental production of testicular teratomas in mice of strains 129, a/he, and their fl hybrids. *J. Natl. Cancer Inst.* **44**: 923–929
- Stevens LC & Little CC (1954) Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **40**: 1080–1087
- Stølevik SB, Nygaard UC, Namork E, Haugen M, Meltzer HM, Alexander J, Knutsen HK, Aaberge I, Vainio K, van Loveren H, Løvik M & Granum B (2013) Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from the maternal diet may be associated with immunosuppressive effects that persist into early childhood. *Food Chem. Toxicol.* **51**: 165–172
- Striessnig J, Koschak A, Sinnegger-Brauns MJ, Hetzenauer A, Nguyen NK, Busquet P, Pelster G & Singewald N (2006) Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochem. Soc. Trans.* **34**: 903–909
- Südhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* **455**: 903–911
- Suetsugu M & Mehraein P (1980) Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome - A quantitative golgi study. *Acta Neuropathol.* **50**: 207–210
- Sugathan A, Biagioli M, Golzio C, Erdin S, Blumenthal I, Manavalan P, Ragavendran A, Brand H, Lucente D, Miles J, Sheridan SD, Stortchevoi A, Kellis M, Haggarty SJ, Katsanis N, Gusella JF & Talkowski ME (2014) CHD8 regulates neurodevelopmental pathways associated with autism spectrum disorder in neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: E4468–E4477

- Sugawara T, Hisatsune C, Miyamoto H, Ogawa N & Mikoshiba K (2017) Regulation of spinogenesis in mature Purkinje cells via mGluR/PKC-mediated phosphorylation of CaMKII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: E5256–E5265
- Sugiyama H, Ito I & Hirono C (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* **5**: 7–9
- Sullivan PF, Kendler KS & Neale MC (2003) Schizophrenia as a Complex Trait. *Arch. Gen. Psychiatry* **60**: 1187
- Summersgill H, England H, Lopez-Castejon G, Lawrence CB, Luheshi NM, Pahle J, Mendes P & Brough D (2014) Zinc depletion regulates the processing and secretion of IL-1 β . *Cell Death Dis.* **5**: 1–9
- Sun W, Poschmann J, Cruz-Herrera del Rosario R, Parikshak NN, Hajan HS, Kumar V, Ramasamy R, Belgard TG, Elangovan B, Wong CCY, Mill J, Geschwind DH & Prabhakar S (2016) Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell* **167**: 1385-1397.e11 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.031>
- Supekar K, Uddin LQ, Khouzam A, Phillips J, Gaillard WD, Kenworthy LE, Benjamin E, Yerys, Vaidya CJ & Menon V (2014) Brain hyper-connectivity in children with autism and its links to social deficits. *Cell Rep* **5**: 738–747
- Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H & Ueda HR (2014) Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**: 726–739 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042>
- Suzuki IK & Vanderhaeghen P (2015) Is this a brain which i see before me? Modeling human neural development with pluripotent stem cells. *Dev.* **142**: 3138–3150
- Swistowska AM, Da Cruz AB, Han Y, Swistowski A, Liu Y, Shin S, Zhan M, Rao MS & Zeng X (2010) Stage-specific role for Shh in dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells induced by stromal cells. *Stem Cells Dev.* **19**: 71–82
- Szatmari P, Liu XQ, Goldberg J, Zwaigenbaum L, Paterson AD, Woodbury-Smith M, Georgiades S, Duku E & Thompson A (2012) Sex differences in repetitive stereotyped behaviors in autism: Implications for genetic liability. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **159 B**: 5–12
- Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, Sampsell-Barron TL, Leonhard KA, McIntire EM & Montgomery KD (2011) Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells-annotated.
- Tabet A-C, Rolland T, Ducloy M, Lévy J, Buratti J, Mathieu A, Haye D, Perrin L, Dupont C, Passemard S, Capri Y, Verloes A, Drunat S, Keren B, Mignot C, Marey I, Jacqueline A, Whalen S, Pipiras E, Benzacken B, et al (2017) A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. *npj Genomic Med.* **2**: 32 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41525-017-0035-2>

- Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, et al (2013a) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* **153**: 1228–1238 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006>
- Tachibana M, Amato P, Sparman M, Woodward J, Sanchis DM, Ma H, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Kang E, Lee HS, Ramsey C, Masterson K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer R & Mitalipov S (2013b) Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* **493**: 627–631
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N & Tada T (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* **11**: 1553–1558
- Tada T & Sheng M (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.*
- Tai C, Abe Y, Westenbroek RE, Scheuer T & Catterall WA (2014) Impaired excitability of somatostatin- and parvalbumin-expressing cortical interneurons in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 3139–3148
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**: 861–872
- Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**: 663–676
- Takahashi K & Yamanaka S (2015) A developmental framework for induced pluripotency. *Dev.* **142**: 3274–3285
- Takashima S, Becker LE, Armstrong DL & Chan F (1981) Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative golgi study. *Brain Res.* **225**: 1–21
- Takumi Y, Ramírez-león V, Laake P, Rinvik E & Ottersen OP (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. **2**:
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R & Nakanishi S (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**: 169–179
- Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N & Nakanishi S (1993) Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* **13**: 1372–1378
- Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, Sonders MS, Kanter E, Castagna C, Yamamoto A, Yue Z, Arancio O, Peterson BS, Champagne F, Dwork AJ, Goldman J & Sulzer D (2014) Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron* **83**: 1131–1143 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
- Taniai H, Nishiyama T, Miyachi T, Imaeda M & Sumi S (2008) Genetic influences on the broad

- spectrum of autism: Study of proband-ascertained twins. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **147**: 844–849
- Taoro-González L, Cabrera-Pastor A, Sancho-Alonso M, Arenas YM, Meseguer-Estornell F, Balzano T, Elmlili N & Felipe V (2019) Differential role of interleukin-1 β in neuroinflammation-induced impairment of spatial and nonspatial memory in hyperammonemic rats. *FASEB J.* **33**: 9913–9928
- Tatavarty V, Torrado Pacheco A, Groves Kuhnle C, Lin H, Koundinya P, Miska NJ, Hengen KB, Wagner FF, Van Hooser SD & Turrigiano GG (2020) Autism-Associated Shank3 Is Essential for Homeostatic Compensation in Rodent V1. *Neuron* **106**: 769-777.e4 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.033>
- Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ & Sabatini BL (2005) Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat. Neurosci.* **8**: 1727–1734
- Taylor SC, Laperriere G & Germain H (2017) Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. *Sci. Rep.* **7**: 1–8
- Taylor SE, Taylor RD, Price J & Andrae LC (2018) Single-molecule fluorescence in-situ hybridization reveals that human SHANK3 mRNA expression varies during development and in autism-associated SHANK3 heterozygosity. *Stem Cell Res. Ther.* **9**: 1–9
- Thabtah F & Peebles D (2019) Early autism screening: A comprehensive review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**:
- Thomas S, Hovinga ME, Rai D & Lee BK (2017) Brief Report: Prevalence of Co-occurring Epilepsy and Autism Spectrum Disorder: The U.S. National Survey of Children’s Health 2011–2012. *J. Autism Dev. Disord.* **47**: 224–229 Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-016-2938-7>
- Thomson (1890) Successful brain grafting. *Science (80-.)*. **XVI**:
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science (80-.)*. **282**: 1145–1147 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thongnak C, Hnoonual A, Tangviriyapaiboon D, Silvilairat S, Puangpetch A, Pasomsub E, Chantratita W, Limprasert P & Sukasem C (2018) Whole-Exome Sequencing Identifies One de Novo Variant in the FGD6 Gene in a Thai Family with Autism Spectrum Disorder. *Int. J. Genomics* **2018**:
- Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M & Rijdsdijk F (2016) Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* **57**: 585–595
- Tiemann U, Sgodda M, Warlich E, Ballmaier M, Schöler HR, Schambach A & Cantz T (2011) Optimal reprogramming factor stoichiometry increases colony numbers and affects molecular characteristics of murine induced pluripotent stem cells. *Cytom. Part A* **79 A**: 426–435
- Tiura M, Kim J, Detmers D & Baldi H (2017) Predictors of longitudinal ABA treatment outcomes for children with autism: A growth curve analysis. *Res. Dev. Disabil.* **70**: 185–197 Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ridd.2017.09.008>

- Tomasi D & Volkow ND (2019) Reduced Local and Increased Long-Range Functional Connectivity of the Thalamus in Autism Spectrum Disorder. *Cereb. Cortex* **29**: 573–585
- Tønnesen J & Nägerl UV (2016) Dendritic spines as tunable regulators of synaptic signals. *Front. Psychiatry* **7**:
- Tordjman S, Najjar I, Bellissant E, Anderson GM, Barbuoth M, Cohen D, Jaafari N, Schischmanoff O, Fagard R, Lagdas E, Kermarrec S, Ribardiere S, Botbol M, Fougerou C, Bronsard G & Vernay-Leconte J (2013) Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: Literature review and new perspectives
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E & Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* **420**: 788–794
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M & Worley PF (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* **23**: 583–592
- Tu Z, Zhao H, Li B, Yan S, Wang L, Tang Y, Li Z, Bai D, Li C, Lin Y, Li Y, Liu J, Xu H, Guo X, Jiang YH, Zhang YQ & Li XJ (2019) CRISPR/Cas9-mediated disruption of SHANK3 in monkey leads to drug-treatable autism-like symptoms. *Hum. Mol. Genet.* **28**: 561–571
- Tukker AM, Wijnolts FMJ, de Groot A & Westerink RHS (2018) Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment. *Neurotoxicology* **67**: 215–225 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.06.007>
- Uchino S, Wada H, Honda S, Nakamura Y, Ondo Y, Uchiyama T, Tsutsumi M, Suzuki E, Hirasawa T & Kohsaka S (2006) Direct interaction of post-synaptic density-95/Dlg/ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. *J. Neurochem.* **97**: 1203–1214
- Uddin LQ, Supekar K, Lynch CJ, Khouzam A, Phillips J, Feinstein C, Ryalı S & Menon V (2013) Salience Network–Based Classification and Prediction of Symptom Severity in Children With Autism. *JAMA Psychiatry* **23**: 1–7
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS & Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science (80-.)*. **291**: 657–661
- Üner A, Gonçalves GHM, Li W, Porceban M, Caron N, Schönke M, Delpire E, Sakimura K & Bjørnbæk C (2015) The role of GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits in AgRP and POMC neurons on body weight and glucose homeostasis. *Mol. Metab.* **4**: 678–691 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2015.06.010>
- Unichenko P, Yang JW, Kirischuk S, Kolbaev S, Kilb W, Hammer M, Krueger-Burg D, Brose N & Luhmann HJ (2018) Autism related neuroligin-4 knockout impairs intracortical processing but not sensory inputs in mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex* **28**: 2873–2886
- Upadhyaya D, Hattiangady B, Castro OW, Shuai B, Kodali M, Attaluri S, Bates A, Dong Y, Zhang SC,

- Prockop DJ & Shetty AK (2019) Human induced pluripotent stem cell-derived MGE cell grafting after status epilepticus attenuates chronic epilepsy and comorbidities via synaptic integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**: 287–296
- Uz M, Das SR, Ding S, Sakaguchi DS, Claussen JC & Mallapragada SK (2018) Advances in Controlling Differentiation of Adult Stem Cells for Peripheral Nerve Regeneration. *Adv. Healthc. Mater.* **7**: 1–26
- Vaughn JE (1989) Review: Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* **3**: 255–285
- Vazin T, Ball KA, Lu H, Park H, Ataeijannati Y, Head-Gordon T, Poo M ming & Schaffer D V. (2014) Efficient derivation of cortical glutamatergic neurons from human pluripotent stem cells: A model system to study neurotoxicity in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Dis.* **62**: 62–72
- Vazin T, Becker KG, Chen J, Spivak CE, Lupica CR, Zhang Y, Worden L & Freed WJ (2009) A novel combination of factors, termed SPIE, which promotes dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One* **4**:
- Vazquez LE, Chen HJ, Sokolova I, Knuesel I & Kennedy MB (2004) SynGAP regulates spine formation. *J. Neurosci.* **24**: 8862–8872
- Verhoeven WMA, Egger JIM, Willemsen MH, de Leijer GJM & Kleefstra T (2012) Phelan-McDermid syndrome in two adult brothers: Atypical bipolar disorder as its psychopathological phenotype? *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **8**: 175–179
- Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukhareno V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V & Kuliev A (2005) Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod. Biomed. Online* **10**: 105–110 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60810-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60810-3)
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC & Wernig M (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**: 1035–1041
- Vignoli A, La Briola F, Peron A, Turner K, Vannicola C, Saccani M, Magnaghi E, Scornavacca GF & Canevini MP (2015) Autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: Searching for risk markers. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**: 1–9 Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13023-015-0371-1>
- Virues-Ortega J, Julio FM & Pastor-Barriuso R (2013) The TEACCH program for children and adults with autism: A meta-analysis of intervention studies. *Clin. Psychol. Rev.* **33**: 940–953 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpr.2013.07.005>
- Viscidi EW, Triche EW, Pescosolido MF, McLean RL, Joseph RM, Spence SJ & Morrow EM (2013) Clinical Characteristics of Children with Autism Spectrum Disorder and Co-Occurring Epilepsy. *PLoS One* **8**: 1–11
- Völkening B, Schönig K, Kronenberg G, Bartsch D & Weber T (2017) Deletion of psychiatric risk gene *Cacna1c* impairs hippocampal neurogenesis in cell-autonomous fashion. *Glia* **65**: 817–827
- Volpato V, Smith J, Sandor C, Ried JS, Baud A, Handel A, Newey SE, Wessely F, Attar M, Whiteley

- E, Chintawar S, Verheyen A, Barta T, Lako M, Armstrong L, Muschet C, Artati A, Cusulin C, Christensen K, Patsch C, et al (2018) Reproducibility of Molecular Phenotypes after Long-Term Differentiation to Human iPSC-Derived Neurons: A Multi-Site Omics Study. *Stem Cell Reports* **11**: 897–911 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.013>
- Volpato V & Webber C (2020) Addressing variability in iPSC-derived models of human disease: Guidelines to promote reproducibility. *DMM Dis. Model. Mech.* **13**:
- Vorstman JAS, Morcus MEJ, Duijff SN, Klaassen PWJ, Heineman-De Boer JA, Beemer FA, Swaab H, Kahn RS & Van Engeland H (2006) The 22q11.2 deletion in children: High rate of autistic disorders and early onset of psychotic symptoms. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **45**: 1104–1113
- Vourc'h P, Martin I, Bonnet-Brilhault F, Marouillat S, Barthélémy C, Müh JP & Andres C (2003) Mutation screening and association study of the UBE2H gene on chromosome 7q32 in autistic disorder. *Psychiatr. Genet.* **13**: 221–225
- Vucurovic K, Landais E, Delahaigue C, Eutrope J, Schneider A, Leroy C, Kabbaj H, Motte J, Gaillard D, Rolland AC & Doco-Fenzy M (2012) Bipolar affective disorder and early dementia onset in a male patient with SHANK3 deletion. *Eur. J. Med. Genet.* **55**: 625–629 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.07.009>
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR & Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394**: 369–374
- Wallace ML, Burette AC, Weinberg RJ & Philpot BD (2012) Maternal Loss of Ube3a Produces an Excitatory/Inhibitory Imbalance through Neuron Type-Specific Synaptic Defects. *Neuron* **74**: 793–800
- Walsh C & Cepko CL (1993) Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature* **362**: 632–635
- Wan HM, Zhang CM, Li HM, Luan SM & Liu CM (2018) Association of maternal diabetes with autism spectrum disorders in offspring: A systemic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. **97**: e9438 Available at: <http://ovidsp.ovid.com/?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=ovftt&AN=00005792-201801120-00012>
http://eu.alma.exlibrisgroup.com/view/uresolver/44SAL_INST/openurl?sid=OVID:ovftdb&id=pmid:&id=doi:10.1097%2FMD.0000000000009438&issn=0025-7974&isbn=&volume=97&iss
- Wang C, Liu F, Liu YY, Zhao CH, You Y, Wang L, Zhang J, Wei B, Ma T, Zhang Q, Zhang Y, Chen R, Song H & Yang Z (2011a) Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* **21**: 1534–1550 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.83>
- Wang J, Gong J, Li L, Chen Y, Liu L, Gu HT, Luo X, Hou F, Zhang J & Song R (2018) Neurexin gene family variants as risk factors for autism spectrum disorder. *Autism Res.* **11**: 37–43

- Wang L, Adamski CJ, Bondar V V, Craigen E, Collette JR, Pang K, Han K, Liu Z, Sifers RN, Holder JL & Zoghbi HY (2019a) A kinome-wide RNAi screen identifies ERK2 as a druggable regulator of Shank3 stability. *Physiol. Behav.* **176**: 139–148
- Wang L, Jia M, Yue W, Tang F, Qu M, Ruan Y, Lu T, Zhang H, Yan H, Liu J, Guo Y, Zhang J, Yang X & Zhang D (2008) Association of the ENGRAILED 2 (EN2) gene with autism in Chinese Han population. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **147**: 434–438
- Wang L, Pang K, Han K, Adamski CJ, Wang W, He L, Lai JK, Bondar V V, Duman JG, Richman R, Tolias KF, Barth P, Palzkill T, Liu Z, Holder JL & Zoghbi HY (2019b) An autism-linked missense mutation in SHANK3 reveals the modularity of Shank3 function. *Mol. Psychiatry* Available at: <http://www.nature.com/articles/s41380-018-0324-x>
- Wang W, Li C, Chen Q, Van Der Goes MS, Hawrot J, Yao AY, Gao X, Lu C, Zang Y, Zhang Q, Lyman K, Wang D, Guo B, Wu S, Gerfen CR, Fu Z & Feng G (2017) Striatopallidal dysfunction underlies repetitive behavior in Shank3-deficient model of autism. *J. Clin. Invest.* **127**: 1978–1990
- Wang X, Bey AL, Katz BM, Badea A, Kim N, David LK, Duffney LJ, Kumar S, Mague SD, Hulbert SW, Dutta N, Hayrapetyan V, Yu C, Gaidis E, Zhao S, Ding J-D, Xu Q, Chung L, Rodriguiz RM, Wang F, et al (2016) Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nat. Commun.* **7**: 11459 Available at: <http://www.nature.com/ncomms/2016/160510/ncomms11459/full/ncomms11459.html>
- Wang X, McCoy PA, Rodriguiz RM, Pan Y, Je HS, Roberts AC, Kim CJ, Berrios J, Colvin JS, Bousquet-Moore D, Lorenzo I, Wu G, Weinberg RJ, Ehlers MD, Philpot BD, Beaudet AL, Wetsel WC & Jiang YH (2011b) Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 3093–3108
- Wang X, Tsai J-W, LaMonica B & Kriegstein AR (2011c) A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci.* **176**: 139–148
- Wang X, Xu Q, Bey AL, Lee Y & 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 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4113141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wang Y, Chen J, Hu JL, Wei XX, Qin D, Gao J, Zhang L, Jiang J, Li JS, Liu J, Lai KY, Kuang X, Zhang J, Pei D & Xu GL (2011d) Reprogramming of mouse and human somatic cells by high-performance engineered factors. *EMBO Rep.* **12**: 373–378 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.11>
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y, Li H, Daley Q, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Thorsten M, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, et al (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed

- differentiation of human cells using synthetic modified mRNA Luigi. *Cell Stem Cell* **7**: 618–630
Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590910004340?via%3Dihub>
- Watson LM, Wong MMK, Vowles J, Cowley SA & Becker EBE (2018) A Simplified Method for Generating Purkinje Cells from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Cerebellum* **17**: 419–427
- Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM & Webb DJ (2008) N-WASP and the Arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J. Biol. Chem.* **283**: 15912–15920
- Wei Z, Gao F, Kim S, Yang H, Lyu J, An W, Wang K & Lu W (2013) Klf4 Organizes Long-Range Chromosomal Interactions with the Oct4 Locus in Reprogramming and Pluripotency. *Cell Stem Cell* **12**: 3351–3352
- Weiss LA, Arking DE, Daly MJ, Chakravarti A, Brune CW, West K, O'Connor A, Hilton G, Tomlinson RL, West AB, Cook EH, Green T, Chang SC, Gabriel S, Gates C, Hanson EM, Kirby A, Korn J, Kuruvilla F, McCarroll S, et al (2009) A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* **461**: 802–808
- Weiss LA, Escayg A, Kearney JA, Trudeau M, MacDonald BT, Mori M, Reichert J, Buxbaum JD & Meisler MH (2003) Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. *Mol. Psychiatry* **8**: 186–194
- Werling DMDM & Geschwind DHDH (2013) Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **26**: 146–153 Available at: http://journals.lww.com/co-neurology/Abstract/2013/04000/Sex_differences_in_autism_spectrum_disorders.6.aspx
- Wernig M, Meissner A, Cassady JP & Jaenisch R (2008) c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell* **2**: 10–12
- Widner H, Brundin P, Björklund A & Möller E (1989) Survival and immunogenicity of dissociated allogeneic fetal neural dopamine-rich grafts when implanted into the brains of adult mice. *Exp. Brain Res.* **532**: 532–543
- Willsey AJ, Sanders SJ, Li M, Dong S, Tebbenkamp AT, Muhle RA, Reilly SK, Lin L, Fertuzinhos S, Miller JA, Murtha MT, Bichsel C, Niu W, Cotney J, Ercan-Sencicek AG, Gockley J, Gupta AR, Han W, He X, Hoffman EJ, et al (2013) Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell* **155**: 997 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.020>
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ & Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**: 810–813
- Wiltse J (2005) Mode of action: Inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin - Developmental effects of valproic acid. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**: 727–738
- Wong CP, Rinaldi NA & Ho E (2017) Zinc deficiency enhanced inflammatory response by increasing immune cell activation and inducing IL6 promoter demethylation. *Physiol. Behav.* **176**: 139–148

Available at: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf

- Wong V (2006) Study of the relationship between tuberous sclerosis complex and autistic disorder. *J. Child Neurol.* **21**: 199–204
- Wright B, Sims D, Smart S, Alwazeer A, Alderson-Day B, Allgar V, Whitton C, Tomlinson H, Bennett S, Jardine J, McCaffrey N, Leyland C, Jakeman C & Miles J (2011) Melatonin versus placebo in children with autism spectrum conditions and severe sleep problems not amenable to behaviour management strategies: A randomised controlled crossover trial. *J. Autism Dev. Disord.* **41**: 175–184
- Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, Chen YH, Zhang C, Zhao M, Xu DX & Song LH (2012) Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J. Pineal Res.* **53**: 325–334
- Xie S, Heuvelman H, Magnusson C, Rai D, Lyall K, Newschaffer CJ, Dalman C, Lee BK & Abel K (2017) Prevalence of Autism Spectrum Disorders with and without Intellectual Disability by Gestational Age at Birth in the Stockholm Youth Cohort: A Register Linkage Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* **31**: 586–594
- Xu C, Cao H, Zhang F & Cheadle C (2018) Comprehensive literature data-mining analysis reveals a broad genetic network functionally associated with Autism spectrum disorder. *Int. J. Mol. Med.* **42**: 2353–2362
- Xu M, Xu X, Li J & Li F (2019a) Association between gut microbiota and autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Front. Psychiatry* **10**: 1–11
- Xu R, Boreland A, Posyton A, Kwan K, Hart RP, Jiang P & Jiang P (2019b) Xenotransplantation of Human PSC-derived Microglia Creates a Chimeric Mouse Brain Model 2 that Recapitulates Features of Adult Human Microglia.
- Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, Kaneko T, Maruyama K, Saido TC, Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N & Inoue H (2011) Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One* **6**:
- Yamada Y, Chochi Y, Takamiya K, Sobue K & Inui M (1999) Modulation of the channel activity of the ϵ 2/ ζ 1-subtype N-methyl D- aspartate receptor by PSD-95. *J. Biol. Chem.* **274**: 6647–6652
- Yan J, Oliveira G, Coutinho A, Yang C, Feng J, Katz C, Sram J, Bockholt A, Jones IR, Craddock N, Cook EH, Vicente A & Sommer SS (2005) Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients [1]. *Mol. Psychiatry* **10**: 329–332
- Yang G, Pan F & Gan WB (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* **462**: 920–924
- Yang G & Shcheglovitov A (2020) Probing disrupted neurodevelopment in autism using human stem cell-derived neurons and organoids: An outlook into future diagnostics and drug development.

Dev. Dyn. **249**: 6–33

- Yang M, Bozdagi O, Scattoni ML, Wohr M, Roulet FI, Katz a. M, Abrams DN, Kalikhman D, Simon H, Woldeyohannes L, Zhang JY, Harris MJ, Saxena R, Silverman JL, Buxbaum JD & Crawley JN (2012) Reduced Excitatory Neurotransmission and Mild Autism-Relevant Phenotypes in Adolescent Shank3 Null Mutant Mice. *J. Neurosci.* **32**: 6525–6541
- Yang N, Ng YH, Pang ZP, Südhof TC & Wernig M (2011) Induced Neuronal (iN) Cells: How to Make and Define a Neuron. *Physiol. Behav.* **176**: 139–148
- Yatawara CJ, Einfeld SL, Hickie IB, Davenport TA & Guastella AJ (2016) The effect of oxytocin nasal spray on social interaction deficits observed in young children with autism: A randomized clinical crossover trial. *Mol. Psychiatry* **21**: 1225–1231
- Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C & Murphy C (2003) Prevalence of autism in a US metropolitan area. *J. Am. Med. Assoc.* **289**: 49–55
- Yi F, Danko T, Botelho SC, Patzke C, Pak C, Wernig M & Südhof TC (2016) Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. *Science* **2669**: 1–22 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26966193>
- Yin X, Xu JC, Cho GS, Kwon C, Dawson TM & Dawson VL (2019) Neurons derived from human induced pluripotent stem cells integrate into rat brain circuits and maintain both excitatory and inhibitory synaptic activities. *eNeuro* **6**: 1–10
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M & Smith A (2003) Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* **21**: 183–186
- Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O’Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P & Deisseroth K (2011) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* **477**: 171–178
- Yuen RKC, Merico D, Bookman M, Howe JL, Thiruvahindrapuram B, Patel R V., Whitney J, Deflaux N, Bingham J, Wang Z, Pellecchia G, Buchanan JA, Walker S, Marshall CR, Uddin M, Zarrei M, Deneault E, D’Abate L, Chan AJS, Koyanagi S, et al (2017) Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* **20**: 602–611
- Yuen RKC, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, Chrysler C, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Liu Y, Gazzellone MJ, D’Abate L, Deneault E, Howe JL, Liu RSC, Thompson A, Zarrei M, Uddin M, Marshall CR, Ring RH, et al (2015) Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat. Med.* **21**: 185–191
- Yuste R (2015) The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front. Neuroanat.* **9**: 1–6
- Yuste R & Bonhoeffer T (2004) Genesis of dendritic spines: Insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 24–34
- Zerbo O, Leong A, Barcellos L, Bernal P, Fireman B & Croen LA (2015) Immune mediated conditions in autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* **46**: 232–236 Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.001>

- Zerbo O, Qian Y, Yoshida C, Fireman BH, Klein NP & Croen LA (2017) Association between influenza infection and vaccination during pregnancy and risk of autism spectrum disorder. *JAMA Pediatr.* **171**: 1–7
- Zhang C, Wu Z, Hong W, Peng D & Fang Y (2016a) Evaluating the association between the SHANK3 gene and bipolar disorder. *Psychiatry Res.* **244**: 284–288 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2016.07.058>
- Zhang H, Jiao W, Sun L, Fan J, Chen M, Wang H, Xu X, Shen A, Li T, Niu B, Ge S, Li W, Cui J, Wang G, Sun J, Fan X, Hu X, Mrsny RJ, Hoffman AR & Hu JF (2013a) Intrachromosomal looping is required for activation of endogenous pluripotency genes during reprogramming. *Cell Stem Cell* **13**: 30–35 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.012>
- Zhang S-C, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O & Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**: 1129–1133 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt1201-1129>
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O’Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA & Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* **34**: 11929–11947
- Zhang Y, Li N, Li C, Zhang Z, Teng H, Wang Y, Zhao T, Shi L, Zhang K, Xia K, Li J & Sun Z (2020) Genetic evidence of gender difference in autism spectrum disorder supports the female-protective effect. *Transl. Psychiatry* **10**:
- Zhang Y, Pak CH, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, Marro S, Patzke C, Acuna C, Covy J, Xu W, Yang N, Danko T, Chen L, Wernig M & Südhof TC (2013b) Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* **78**: 785–798
- Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MSB, Li G, Duncan JA, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MGH & Barres BA (2016b) Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* **89**: 37–53 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>
- Zhao H, Tu Z, Xu H, Yan S, Yan H, Zheng Y, Yang W, Zheng J, Li Z, Tian R, Lu Y, Guo X, Jiang YH, Li XJ & Zhang YQ (2017) Altered neurogenesis and disrupted expression of synaptic proteins in prefrontal cortex of SHANK3-deficient non-human primate. *Cell Res.* **27**: 1293–1297
- Zhao H, Wang Q, Yan T, Zhang Y, Xu H juan, Yu H peng, Tu Z, Guo X, Jiang Y hui, Li X jiang, Zhou H & Zhang YQ (2019) Maternal valproic acid exposure leads to neurogenesis defects and autism-like behaviors in non-human primates. *Transl. Psychiatry* **9**: 1–13 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-019-0608-1>
- Zhao JP & Yoshii A (2019) Hyperexcitability of the local cortical circuit in mouse models of tuberous

- sclerosis complex. *Mol. Brain* **12**: 1–13
- Zhou Q, Homma KJ & Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* **44**: 749–757
- Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A & Cozzi J (2003) Generation of Fertile Cloned Rats by Regulating Oocyte Activation. *Science (80-.)*. **302**: 1179
- Zhou Y, Sharma J, Ke Q, Landman R, Yuan J, Chen H, Hayden DS, Fisher JW, Jiang M, Menegas W, Aida T, Yan T, Zou Y, Xu D, Parmar S, Hyman JB, Fanucci-Kiss A, Meisner O, Wang D, Huang Y, et al (2019) Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques. *Nature*
- Zhu L, Wang X, Li XL, Towers A, Cao X, Wang P, Bowman R, Yang H, Goldstein J, Li YJ & Jiang YH (2014) Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.* **23**: 1563–1578
- Zhu M, Idikuda VK, Wang J, Wei F, Kumar V, Shah N, Waite CB, Liu Q & Zhou L (2018) Shank3-deficient thalamocortical neurons show HCN channelopathy and alterations in intrinsic electrical properties. *J. Physiol.* **596**: 1259–1276
- Zikopoulos B & Barbas H (2010) Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism. *J. Neurosci.* **30**: 14595–14609
- Zimmer MH, Hart LC, Manning-Courtney P, Murray DS, Bing NM & Summer S (2012) Food variety as a predictor of nutritional status among children with autism. *J. Autism Dev. Disord.* **42**: 549–556
- Ziv & Smith (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation (Neuron (1996) 17 (91-102)). *Neuron* **17**: 91–102
- Zuber B, Nikonenko I, Klauser P, Muller D & Dubochet J (2005) The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 19192–19197
- Zuo Y, Lin A, Chang P & Gan WB (2005) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* **46**: 181–189