# UNIVERSITÉ DE TOURS

***ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV***
**INSERM U1253 Équipe Neurogénomique et Physiopathologie Neuronale**

**THÈSE** présentée par :

**Perla GERGES**

soutenue le : **12 Juillet 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

# LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE AU LIBAN : UNE ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE ET GÉNÉTIQUE

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **M. ANDRES Christian** | PU-PH, Université de Tours |
| **M. HLEIHEL Walid** | Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik |

**PRÉSIDENT :**

| | |
|---|---|
| **Mme ODENT Sylvie** | PU-PH, HDR, IGRD, Rennes |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **Mme PITON Amélie** | MCU-PH, HDR, IGBMC, Strasbourg |
| **M. FARES Nassim** | Professeur, HDR, Université Saint Joseph |

---

**JURY :**

| | |
|---|---|
| **M. ANDRES Christian** | PU-PH, Université de Tours |
| **M. FARES Nassim** | Professeur, HDR, Université Saint Joseph |
| **M. HLEIHEL Walid** | Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik |
| **M. KARAM Marc** | Professeur, Université de Balamand |
| **Mme ODENT Sylvie** | PU-PH, HDR, IGRD, Rennes |
| **Mme PITON Amélie** | MCU-PH, HDR, IGBMC, Strasbourg |

# ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je confirme que cette thèse est mon travail personnel, qu'elle n'est pas copiée du travail (publié ou non publié) d'une autre personne et qu'elle n'a pas encore été soumise pour évaluation à l'Université Saint-Esprit de Kaslik (USEK) ou ailleurs.

Je confirme avoir lu et compris les règles d'intégrité académique relatives au plagiat figurant dans le *manuel "Règles académiques et vie estudiantine"*.

| Prénom et Nom de l'étudiant | Signature | Date |
|---|---|---|
| Perla GERGES |  | Juillet 2022 |

**DEDICACE**

***A mes parents**, source de vie et d'amour,*
*qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études.*

***A la mémoire** de ceux que j'aime,*
*qui sont partis sans partager ce moment avec moi.*

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury, le Professeur Nassim Fares et le Docteur Amélie Piton, rapporteurs de ma thèse ainsi que le Professeur Sylvie Odent et le Professeur Marc Karam, d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail.

Je suis très reconnaissante aux enfants et à leurs familles d'avoir rendu possible la présente étude. Je tiens également à remercier les membres des associations et des centres qui nous ont mis en contact avec les familles des enfants atteints de troubles du spectre autistique et les écoles qui nous ont aidés à recruter les sujets témoins dans toutes les régions du Liban.

Je tiens à remercier le Centre National de Recherches Scientifiques Libanais (CNRS-L) et le Centre Supérieur de Recherche (HCR) de l'Université Saint-Esprit de Kaslik (USEK) de m'avoir soutenue financièrement durant ces trois années de thèse.

Je remercie mes directeurs de thèse pour avoir dirigé cette thèse et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail en cotutelle entre l'Université de Tours en France et l'Université Saint Esprit de Kaslik au Liban.

MERCI **Professeur Christian Andres** pour vos conseils constructifs, votre confiance et votre temps. Merci également pour vos précieuses instructions qui m'ont aidé à progresser dans mes travaux. Je sais la chance que j'ai eu de vous avoir comme encadrant. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de santé pour l'avenir.

MERCI **Professeur Walid Hleihel** pour tout ce que vous m'avez offert durant ces trois années de thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour travailler sur ce projet passionnant. Vous étiez toujours présent et à l'écoute. Je vous remercie sincèrement pour votre patience, soutien, encouragement et présence dans chaque moment difficile au Liban et à Tours. Je n'aurai pu souhaiter un meilleur encadrant que vous. Je vous souhaite tout le succès et le bonheur du monde.

Un grand MERCI à **Docteur Tania Bitar** pour son aide et son soutien dans toutes les phases de ma thèse. Sans elle, le travail n'aurait pas été facile. MERCI d'avoir été présente dans les moments très difficiles ainsi que dans les moments joyeux.

Je tiens à remercier le **Docteur Frédéric Laumonnier,** responsable de l'équipe Neurogénomique et Pathophysiologie Neuronale, de m'avoir accueillie au sein de cette équipe et de m'avoir donné des conseils.

Un énorme MERCI au **Docteur Sylviane Marouillat**, la reine des PCR et du séquençage. Merci pour ton aide ainsi que pour ton occupation de mes séquençages, de mes qPCR et de mes commandes. Merci pour les moments de rire et de balade à Rennes. Merci pour ton travail continu pour la sécurité du laboratoire. Tu es vraiment la maman du laboratoire.

Merci beaucoup au **Docteur Devina Ung**, pour m'avoir donné la chance de disséquer les souris. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton aide.

Je remercie **Docteur Sylvaine Renault**, **Docteur Sarah-Anne David**, **Docteur Audrey Dangoumau, Docteur Rudolph Hergesheimer** pour vos conseils et votre aide. Je vous souhaite beaucoup de bonheur dans votre vie professionnelle et personnelle.

Je tiens à remercier **David Lever**, gestionnaire de l'équipe 2, pour son aide avant et dès mon arrivée. Merci d'avoir créé un environnement joyeux et plein d'humour dans le laboratoire.

Merci également aux doctorants de l'équipe 2 : **Sara Benharrat**, **Yara Al Ojaimi, Florence Desprez**, **Shanez Haouari** et **Yan Dos Santos.** Merci pour votre accueil et votre gentillesse. Merci pour tous les pauses et les sorties. J'ai été ravie de passer mon séjour avec vous. Bon courage à vous pour la suite.

Merci beaucoup à mes amies **Yara Al Ojaimi, Mireille Harb** et **Mariam Dib** pour votre amitié et votre bienveillance. Vous étiez comme des sœurs, toujours présentes et à l'écoute. Je vous aime fort et je vous souhaite tout le bonheur, la joie et les bénédictions du monde.

Merci à toutes les personnes que j'aurai oublié.

Un grand MERCI à ma famille, surtout **mes parents** d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue durant toutes les années d'études. MERCI de m'avoir doté d'une étude digne. MERCI d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui.

A ma grande sœur **Joelle**, mille MERCI pour ton aide, encouragement et soutien durant les moments difficiles et critiques. Merci d'avoir accomplir les tâches pendant mon absence.

Enfin, MERCI à mon copain **George** d'être toujours là. Je te remercie fortement pour ton soutien et ta patience. Merci pour ton rôle de support, non seulement pendant ces trois années mais à tout moment. Merci pour tout.

# RESUME

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux complexes et multifactoriels impliquant des facteurs génétiques ainsi que des facteurs environnementaux. Il a été montré que des événements prénatals, périnatals et postnatals peuvent soit augmenter soit diminuer le risque des TSA. Les facteurs environnementaux sont susceptibles de moduler le risque des TSA lorsqu'ils sont associés avec des facteurs génétiques. En fait, des anomalies chromosomiques, des variations du nombre de copies (CNV) et des variants mononucléotidiques (SNV) ont été associés aux TSA. A ce jour, les facteurs environnementaux et génétiques ne sont pas encore complètement élucidés et la plupart des études sur les TSA sont menées sur les populations Américaines et Ouest-Européennes.

Par conséquent, les objectifs de ma thèse s'articulent autour de l'identification des facteurs de risque et de protection qui peuvent aider à la compréhension de la physiopathologie des TSA et enfin à aboutir à l'atténuation des risques, ainsi que sur l'identification des variations mononucléotidiques (SNV) et des petites insertions/délétions (indels) par le séquençage de l'exome entier (WES) chez cinq sujets qui n'avaient pas révélé de CNV liées aux TSA dans notre étude précédente.

Pour le premier objectif, nos résultats ont montré que le stress pendant la grossesse, la présence de patients atteints de TSA et de patients atteints du trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention (TDAH) dans la famille étaient significativement associés aux TSA. D'autre part, un apport en multivitamines en particulier les vitamines B et en oméga 3, un régime riche en céréales et une supplémentation en fer pendant la grossesse ont été identifiés comme des facteurs de protection contre les TSA. Pour le second objectif, notre étude a permis d'identifier un variant *de novo* dans le gène *MIS18BP1* et deux autres variants hérités dans les gènes *SLITRK4* et *NHSL2*. En outre, nos résultats ont confirmé la présence d'autres variations génétiques précédemment décrites et partagées entre les patients Libanais et d'autres populations atteintes de TSA. L'expression du gène *MIS18BP1* a été analysée par PCR quantitative en temps réel (RT qPCR) dans le cortex de souris à différents stades de développement et les résultats ont montré qu'il est fortement exprimé au stade embryonnaire.

Ces études ont permis d'établir de nouvelles hypothèses, de confirmer les données précédentes et de contribuer à la compréhension des TSA. Cependant, des investigations supplémentaires doivent encore être réalisées pour aboutir à une validation des facteurs de risque et des gènes candidats, afin de donner une compréhension cohérente de l'interaction entre les différents facteurs associés aux TSA.

**Mots clés :** TSA, facteurs de risque, facteurs de protection, WES, SNV, insertions/délétions.

# ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASD) are complex and multifactorial neurodevelopmental disorders involving genetic factors and environmental factors. Investigations have been carried out in order to understand and determine the impact of environmental factors on the onset of ASD. Prenatal, perinatal, and postnatal events have been shown to increase or decrease the risk of ASD. Environmental factors are likely to modulate the risk of ASD when combined with genetic factors. In fact, chromosomal abnormalities, copy number variations (CNVs), and single nucleotide variants (SNVs) have been associated with ASD. To date, the environmental and genetic factors have not yet been fully elucidated and most studies on ASD are carried out on American and Western European populations.

Therefore, the objectives of my thesis revolve around the identification of risk and protective factors that can help in understanding the pathophysiology of ASDs and in risk attenuation, as well as the identification of single nucleotide variants (SNV) as well as small insertions/deletions (indels) by whole exome sequencing (WES) in five subjects who did not reveal ASD-related copy number variations (CNV) in our previous study.

For the first objective, the results showed that stress during pregnancy, the presence of patients with ASD and patients with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the family were significantly associated with ASD. On the other hand, a multivitamin intake in particular B vitamins and omega 3, a diet rich in cereals and iron supplementation during pregnancy have been identified as protective factors against ASD. For the second objective, our study allowed the identification of a *de novo* variant in the *MIS18BP1* gene and two other inherited variants in the *SLITRK4* and *NHSL2* genes. Furthermore, our results confirmed the presence of other genetic variations previously described and shared between Lebanese patients and other populations with ASD. Then, the expression of the *MIS18BP1* gene was measured by quantitative real-time PCR (RT qPCR) in the cortex of mice at different stages of development and the results showed that it is more expressed at the embryonic stage.

These studies allowed to establish new hypotheses, to confirm previous data and to contribute to a better understanding of ASD. However, further investigations are needed to achieve

validation of risk factors and candidate genes, in order to provide a consistent understanding of the interaction between the various factors associated with ASD.

**Keywords:** ASD, risk factors, protective factors, WES, SNV, insertions/deletions.

# TABLE DES MATIERES

**ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT** ..... ii

**DEDICACE** ..... iii

**REMERCIEMENTS** ..... iv

**RESUME** ..... vii

**ABSTRACT** ..... ix

**LISTE DES ABREVIATIONS** ..... xv

**LISTE DES TABLEAUX** ..... xviii

**LISTE DES FIGURES** ..... xix

**LISTE DES ANNEXES** ..... xxiii

**INTRODUCTION** ..... 1

**CHAPITRE 1** ..... 3

**LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE** ..... 3

1.1 Historique ..... 3

1.2 Classification selon le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux DSM-V ..... 4

1.2.1 Critères du diagnostic des TSA ..... 5

1.3 Prévalence ..... 7

1.3.1 Evolution de la prévalence selon les méthodes d'évaluation ..... 8

1.3.2 Evolution de la prévalence selon les critères ..... 9

1.3.3 Augmentation de la prévalence selon les risques ..... 10

1.4 Neuro-anatomie et Neuropathologie des TSA ..... 10

1.4.1 Neuro-anatomie ..... 11

1.4.1.1 Le volume cérébral ..... 11

1.4.1.2 Régions cérébrales associées à la pathologie des TSA ..... 11
1.4.2 Neuropathologie ..... 15
1.5 Neurochimie des TSA ..... 17
1.5.1 Le GABA ..... 17
1.5.2 Le glutamate ..... 18
1.5.3 La sérotonine ..... 20
1.5.4 La dopamine ..... 21
1.5.5 L'acétylcholine ..... 21
1.5.6 L'ocytocine ..... 22
1.5.7 La mélatonine ..... 22
1.6 Comorbidités associées aux TSA ..... 24
1.7 Etiologies des TSA ..... 26
1.7.1 Composante environnementale ..... 28
1.7.1.1 Facteurs de risque des TSA ..... 29
1.7.1.2 Facteurs de protection contre les TSA ..... 31
1.7.2 Composante génétique ..... 32
1.7.2.1 Arguments épidémiologiques ..... 32
1.7.2.2 Les anomalies chromosomiques ..... 33
1.7.2.3 Les variations du nombre de copies d'ADN ..... 34
1.7.2.4 Variants mononucléotidiques (SNV) ..... 37
1.7.2.5 Les gènes impliqués dans les TSA ..... 38
1.7.2.6 Les modèles génétiques ..... 41
1.7.2.7 Moyens d'identification des gènes candidats ..... 43
1.8 Le séquençage à haut débit d'Exome ..... 46
1.8.1 Description ..... 46

1.8.2 Procédé du WES ..... 47

1.8.3 Analyse des données et filtrage des variants ..... 49

1.8.4 Avantages et points faibles du WES ..... 50

1.9 Les gènes impliqués dans les voies biologiques des TSA ..... 51

1.9.1 La synapse chimique ..... 51

1.9.2 La voie de signalisation Wnt ..... 52

1.9.3 La voie de l'ubiquitinylation/protéasome ..... 54

1.9.4 La voie de remodelage de la chromatine ..... 55

1.9.5 Les altérations du métabolisme ..... 55

**CHAPITRE 2** ..... 59

**METHODES ET RESULTATS** ..... 59

2.1 Etude épidémiologique : Identification de facteurs de risque et de protection des TSA au Liban ..... 59

2.1.1 Présentation de l'étude ..... 59

2.1.2 Article 1: Risk and protective factors in Autism Spectrum Disorders: a case control study in the Lebanese population. ..... 62

2.2 Etude génétique : Identification de nouvaux variants génétiques chez des patients atteints des TSA dans la population Libanaise. ..... 71

2.2.1 Présentation de l'étude ..... 71

2.2.2 Article 2: Identification of novel gene variants for Autism Spectrum Disorders in the Lebanese population using whole-exome sequencing. ..... 73

2.2.3 Expression du gène MIS18BP1 dans le cortex de souris par RT qPCR : in vitro vs in vivo ..... 86

2.2.3.1 Principe ..... 86

2.2.3.2 Méthodes ..... 87

2.2.3.3 Résultats et conclusion ..... 92

**DISCUSSION** ..... 100

**CONCLUSION** ..... 110

**REFERENCES** ..... 112

**ANNEXES** ..... 153

# LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| ACMG | American College of Medical Genetics and Genomics |
| ACTH | Adrénocorticotrope |
| AGAT | L-Arginine:glycine amidinotransferase |
| AMPAR | α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor |
| Array CGH | Array comparative genomic hybridization |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| CADD | Combined annotation dependent depletion |
| CBS | Cystathionine β-synthase |
| CCDS | Cerebral creatine deficiency syndromes |
| CFD | Cerebral folate deficiency |
| CNV | Copy number variants |
| CRH | Corticotropin Releasing Hormone |
| CDC | Center for Disease Control and Prevention |
| DGV | Database of genomic variants |
| DIV | Days in vitro |
| DSM | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders |
| FISH | Fluorescent in situ hybridization |
| FoSTeS | Fork stalling and template switching |
| FXS | Fragile X Syndrome |
| GABA | Acide γ-aminobutyrique |
| GAMT | Guanidinoacetate methyltransferase |
| GATK | Genome analysis toolkit |
| GERP | Genomic evolutionary rate profiling |
| GWAS | Genome wide association study |
| HCU | Homocystinurie |
| HGMD | Human Gene Mutation Database |
| Indels | Insertions/deletions |
| IRM | Imagerie par résonnance magnétique |
| IRMf | Imagerie fonctionnelle par résonnance magnétique nucléaire |

| | |
|---|---|
| LCRs | Low-copy Repeats |
| LD | Linkage disequilibrium |
| MAF | Minor allele frequency |
| MTHFR | Methylenetetrahydrofolate reductase |
| nAChR | Neuronal nicotinic acetylcholine receptors |
| NAHR | Non allelic homologous recombination |
| NHEJ | Non-homologous end joining |
| NGS | Next generation sequencing |
| NMDAR | N-methyl-D-aspartate receptor |
| OMIM | Online mendelian inheritance in man |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| OR | Odds ratio |
| OTC | Ornithine transcarbamylase |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PCU | Phénylcétonurie |
| QC | Quality control |
| QI | Quotient intellectuel |
| RT qPCR | reverse transcription Quantitative PCR |
| SFARI | Simons Foundation Autism Research Initiative |
| SIFT | Sorting intolerant form tolerant |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SNV | Single nucleotide variant |
| SSADH | Succinic semialdehyde dehydrogenase |
| SSRIs | Selective serotonin reuptake inhibitors |
| TDAH | Trouble du déficit de l’attention et hyperactivité |
| TED | Trouble envahissant du développement |
| TED-NOS | Trouble envahissant du développement - non spécifié |
| TEP | Tomographie à émission de positions |
| TRN | Thalamic reticular nucleus |
| TSA | Troubles du spectre autistique |

| | |
|---|---|
| WES | Whole exome sequencing |
| WGS | Whole genome sequencing |

# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 :** Comorbidités associées aux TSA. ..... 24

**Tableau 2 :** Les CNVs couramment associés aux TSA. (Rylaarsdam & Guemez-Gamboa, 2019; Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019) ..... 36

**Tableau 3 :** Les principaux gènes impliqués dans les TSA (Daghsni et al., 2018; Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019) ..... 38

**Tableau 4:** Les principales maladies monogéniques chez les sujets atteints de TSA. (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019) ..... 41

**Tableau 5 :** Liste des amorces utilisés pour la RT qPCR ..... 91

# LISTE DES FIGURES

**Figure 1 :** Graphique montrant l'augmentation apparente de la prévalence des TSA aux États-Unis. (CDC, 2022) ..... 7

**Figure 2 :** Les régions cérébrales et les fonctions associées chez les patients avec TSA. Les régions impliquées dans les déficiences sociales sont présentées en bleu, les régions associées aux déficits de communication sont présentées en jaune et les régions associées aux comportements répétitifs sont colorées en rouge. (Amaral et al., 2008) ..... 12

**Figure 3:** Représentation des cellules de Purkinje de (A) témoins (B) et TSA. Sections cérébelleuses à 20×. (Fatemi et al., 2002) ..... 16

**Figure 4:** Dessin schématique de la voie synaptique glutamatergique altérée dans les TSA. Une fois libéré, le glutamate peut se lier et activer les récepteurs ionotropes AMPA, Kainate et NMDA ou les récepteurs métabotropes couplés aux protéines G sur les neurones postsynaptiques ou présynaptiques ainsi que sur les cellules gliales. Le glutamate, absorbé dans les cellules gliales par les transporteurs de glutamate, est converti en glutamine, qui peut être transportée dans les neurones glutamatergiques par les transporteurs. (Montanari et al., 2022) ..... 19

**Figure 5:** Dessin schématique de la synapse sérotoninergique. La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane. La première étape est l'hydroxylation du tryptophane réalisé par l'enzyme tryptophane hydroxylase (TPH). L'enzyme Dopa décarboxylase (DDC) catalyse l'étape finale. Le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT) transporte la sérotonine du cytosol vers les vésicules. Après qu'un potentiel d'action ait atteint le terminal, la sérotonine est libérée des vésicules et le neurotransmetteur est capable de se lier et d'activer des récepteurs spécifiques dans le même neurone (présynaptique) ou dans d'autres neurones (postsynaptique). Le transporteur de membrane plasmique SERT recapture la sérotonine dans le cytosol du neurone présynaptique qui peut être réutilisée comme neurotransmetteur ou bien peut être dégradée par l'enzyme MAO-A. (Carvajal-Oliveros & Campusano, 2021) ..... 20

**Figure 6:** Les rôles de la mélatonine maternelle qui passe de la mère au fœtus via le placenta. Les fonctions de la mélatonine dans la protection contre l'inflammation et l'entraînement circadien peuvent réduire le risque de TSA. Les concentrations normales de la mélatonine pendant la grossesse contribuent à la protection contre l'inflammation et les lésions cérébrales

et au développement neurologique normal du fœtus en inhibant le stress oxydatif dans le SNC. De plus, comme des niveaux adéquats de mélatonine maintiennent le schéma de sommeil et le rythme circadien normaux, la sécrétion normale de mélatonine peut également déclencher un développement neurologique normal. (Jin et al., 2018) ..... 23

**Figure 7 :** Représentation de l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux dans l'étiologie des TSA. Ces deux groupes de facteurs peuvent influencer indépendamment et réciproquement le développement des TSA. Le potentiel mutagène des facteurs environnementaux suggère que les substances toxiques peuvent jouer un rôle dans le déclenchement de mutations spontanées. Les mutations *de novo* indiquent l'importance de cette mutagenèse dans la détermination du risque des TSA. De plus, l'épigénétique joue le rôle du médiateur dans les interactions entre l'environnement et le génome. Donc, l'expression des gènes sera altérée suite à l'intervention de l'environnement. (Pugsley et al., 2021)..... 28

**Figure 8:** Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes décrites dans les TSA. (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019; H. Yoo, 2015)..... 34

**Figure 9:** Les variations formées par la recombinaison homologue non alléliques. (A) Le crossing over entre des répétitions directement orientées peut aboutir à une délétion et une duplication réciproque ; tandis que le crossing over entre des répétitions inversement orientées peut entraîner une inversion. (B) Cette recombinaison peut produire une délétion ou une duplication de trois manières : croisement entre deux chromosomes (interchromosomique), croisement entre deux chromatides (intrachromosomique) et croisement sur la même chromatide (intrachromatidal). ..... 35

**Figure 10 :** Modèles génétiques de risque de TSA. Des représentations schématiques des modèles mendéliens et polygéniques du risque de TSA sont décrites. Les cercles noirs représentent le type d'individu : ceux qui ont un TSA (première ligne) et les parents non affectés qui présentent des facteurs de risque mais pas suffisants pour manifester la maladies (deuxième ligne). La taille des variants est proportionnelle à leur effet, un symbole plus grand indique un effet accru. (Berg & Geschwind, 2012)..... 43

**Figure 11:** Evolution chronologique de la découverte des gènes associés aux TSA. La courbe rouge représente l'augmentation des gènes référencés dans SFARI et la courbe bleue représente l'estimation de la prévalence des TSA d'après le centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC). Les différentes versions du DSM (du DSM-II au DSM-V)

sont présentées par la frise chronologique et au-dessous les outils de détection du génome sont présentés. (Bourgeron, 2016)..... 46
**Figure 12** : Photo de la tête de la souris avant le retrait du cerveau du crâne..... 88
**Figure 13 :** Photo du cerveau total de la souris à P17,5 avant l'isolation du cortex..... 89
**Figure 14 :** Dissection du cortex de souris postnatal (P3). A) Cerveau entier. B) Cerveau après ablation des bulbes olfactifs et du cervelet. C) Isolement des cortex en décollant la structure en forme de plaque du cortex du cerveau. D, D') Cortex du site ventral et dorsal avec méninges indiqués par les flèches noires. E) Cortex sans méninges. (Schildge et al., 2013) (Illustration tirée du papier de Schildge et al., 2013 en raison de l'incapacité de prendre des photos durant la procédure de dissection). ..... 89
**Figure 15 :** Paramètres de la qPCR pour le gène étudié. Détermination de l'efficacité de QPCR avec une gamme de 5 dilutions d'ADN avec des concentrations variables. Les courbes standards de chaque échantillon sont présentées et en encart, les courbes de fusion des produits d'amplification..... 93
**Figure 16 :** Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène MIS18BP1 et des gènes de référence GAPDH, SDHA et CYC1 dans les cultures faites à partir du cortex de la première et de la deuxième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR. ..... 93
**Figure 17** : Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène MIS18BP1 et des gènes de référence GAPDH, SDHA et CYC1 dans les cultures faites à partir du cortex de la troisième et la quatrième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR. ..... 94
**Figure 18 :** Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène MIS18BP1 et des gènes de référence GAPDH, SDHA et CYC1 dans les tissus de cortex pris de la première et la deuxième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR. ..... 94
**Figure 19 :** Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène MIS18BP1 et des gènes de référence GAPDH, SDHA et CYC1 dans le

tissu de cortex pris de la troisième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR. ..... 95
**Figure 20 :** Les valeurs de Cp issues de la qPCR in vitro avec n=4 et le graphique montrant la moyenne de ces valeurs. L'expression est plus élevée à DIV12 dans les cultures. ..... 96
**Figure 21 :** Les valeurs de Cp issues de la qPCR in vivo avec n=3 et le graphique montrant la moyenne de ces valeurs. L'expression est plus élevée à E17 dans les cultures. ..... 97
**Figure 22 :** Expression relative du gène MIS18BP1 normalisée avec trois gènes de référence GAPDH, SDHA et CYC1. L'ARN total a été isolé des cultures de neurones corticaux à DIV7, 12 et 18. Les valeurs ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn (*p<0,05). NS : non significatif. ..... 98
**Figure 23 :** Expression relative du gène MIS18BP1 normalisée avec trois gènes de référence GAPDH, SDHA et CYC1. L'ARN total a été isolé de leur cortex. Les valeurs ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn (*p<0,05). NS : non significatif. ..... 98
**Figure 24:** Analyse des processus cellulaires de la protéine codée du gène MIS18BP1 à l'aide du logiciel Pathway Studio. Un réseau biologique a été créé reliant la protéine codée du gène MIS18BP1 avec les processus cellulaires. (Figure 4 dans l'article 2) (Gerges et al., 2022) 105

# LISTE DES ANNEXES

**Annexe 1 :** Informations supplémentaires de l'article 1 ..... 153
**Annexe 2 :** Informations supplémentaires de l'article 2 ..... 161

# INTRODUCTION

Selon le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux, le DSM-V, les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux extrêmement variables caractérisés par des troubles persistants d'interaction sociale et de communication, ainsi que des comportements, intérêts restreints et répétitifs. Généralement, ces troubles se manifestent avant l'âge de 3 ans (American Psychiatric Association, 2013) et touchent 4 fois plus les garçons que les filles (Maenner, 2020).

Parallèlement à la grande hétérogénéité clinique de ces troubles, plusieurs études ont montré que les TSA sont des troubles multifactoriels suite à l'implication des facteurs génétiques et environnementaux (Sauer et al., 2021). La forte implication des facteurs génétiques dans les TSA est soulignée par les études menées sur les frères et sœurs nés dans des familles avec un sujet TSA qui ont montré un risque multiplié par 10 de développer la pathologie (Woodbury-Smith & Scherer, 2018). De plus, le taux de concordance des TSA chez les jumeaux monozygotes est de 70 à 90 %, tandis que chez les jumeaux dizygotes, il est de 5 à 10% (Ronald & Hoekstra, 2014; Rosenberg et al., 2009). Cette grande différence entre les concordances des jumeaux mono et dizygotes est un argument fort pour une participation génétique, probablement surtout polygénique. La concordance incomplète trouvée chez les jumeaux monozygotes peut révéler la contribution de facteurs environnementaux dans l'étiologie des TSA. En effet, les facteurs environnementaux tels que l'exposition à des agents toxiques comme les métaux lourds peut entraîner des modifications dans l'expression ou la fonction de gènes impliqués dans le neurodéveloppement, ce qui augmente le risque des TSA (Tzoumis, 2020).

Au cours des 30 dernières années, les études réalisées ont montré des augmentations spectaculaires dans la prévalence des TSA qui peuvent être dues à plusieurs facteurs tels que l'expansion des critères de diagnostic, les meilleures méthodes de dépistage, l'augmentation des facteurs de risque spécifiques au TSA et une plus grande sensibilisation chez les parents et les cliniciens. Ainsi au Liban, dans les régions de Beirut et du Mont-Liban, 1 enfant sur 66 est atteint (Chaaya et al., 2016). Cette augmentation apparente conduit à un intérêt de la population générale, des familles atteintes et des scientifiques.

Actuellement, le DSM-V est utilisé pour le diagnostic des TSA en faisant référence aux signes et symptômes cliniques, puisque les facteurs génétiques ne sont pas encore complètement élucidés et il n'existe pas de biomarqueurs spécifiques facilitant le diagnostic précoce. Il est donc important d'identifier des variations génétiques et des biomarqueurs pour le diagnostic et la meilleure compréhension de la physiopathologie des TSA. De plus, il n'existe aucune thérapeutique spécifique contre les TSA. Cependant, les comorbidités associées pourraient être réduites par des interventions prénatales et des interventions comportementales précoces (Reichow et al., 2018). De plus comme les études sont le plus souvent réalisées sur les populations Américaines et Ouest-Européennes, il paraît pertinent d'explorer d'autres populations ethniquement et socio-culturellement différentes, comme la population Libanaise.

Compte tenu des arguments évoqués ci-dessus, les objectifs de ma thèse et les travaux réalisés s'articulent autour des deux axes suivants :

1. Une étude épidémiologique sur l'identification des facteurs de risque et de protection qui peuvent aider à la compréhension de la physiopathologie des TSA et *in fine* à l'atténuation des risques. Cette étude a été réalisée par la collecte de questionnaires rétrospectifs couvrant les facteurs démographiques, prénatals et postnatals des sujets atteints de TSA et des sujets contrôles sains au Liban.
2. Une étude génétique effectuée par séquençage de l'exome entier (WES) et visant à identifier les variations mononucléotidiques (SNV) et les petites insertions/délétions (indels) chez cinq sujets qui n'avaient pas révélé de CNV liés aux TSA dans notre étude précédente. Cette dernière a été effectuée par la technique de l'hybridation génomique comparative sur puce (array CGH) afin d'identifier des variations du nombre de copies d'ADN (CNV) rares chez 19 sujets atteints de TSA (Bitar et al., 2019). Ensuite, l'expression du nouveau gène candidat identifié a été mesurée par PCR quantitative en temps réel (RT qPCR) dans le cortex des souris à différents stades du développement afin de préciser l'évolution de son expression au cours du neurodéveloppement.

# CHAPITRE 1

# LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

## 1.1 Historique

Le terme « autisme » est constitué du préfixe « auto » qui signifie le soi et du suffixe « isme » qui signifie « l'acte, l'état ou la théorie ».

En 1911, la psychiatre suisse Eugen Bleuler a été la première personne à utiliser le terme « autisme » pour souligner la séparation de la réalité et la prédominance de la vie intérieure des sujets schizophrènes (Bleuler, 1911).

Plus tard, en 1943, Leo Kanner, pédopsychiatre américain et autrichien de naissance, fut le premier à utiliser le terme « autisme» suite à l'observation de 11 enfants présentant des difficultés dans les interactions sociales, la mémoire, la sensibilité aux stimuli sonores, l'écholalie et une intelligence normale (Kanner, 1943).

En 1944, le psychiatre Hans Asperger, en travaillant sur un groupe d'enfants qui ressemblaient aux descriptions de Kanner, a remarqué que les enfants avaient un manque d'empathie, des actes maladroits, une faible capacité à interagir avec d'autres enfants et une forte préoccupation pour des intérêts particuliers. Asperger a appelé ce syndrome « psychopathie autistique ». (Asperger, 1944)

Ensuite en 1950, Bruno Bettelheim a observé l'effet des séances de thérapies sur des sujets autistes et avec Kanner, ils ont développé l'hypothèse de la mère « réfrigérateur » qui serait due à une dysharmonie dans la relation entre la mère et l'enfant.

En 1964, Bernard Rimland, un psychologue et parent d'un enfant autiste qui n'était pas d'accord avec Bettelheim et Kanner, a publié un ouvrage intitulé « Infantile Autism : the Syndrome and its Implications for a Neural Theory of Behavior » dans lequel il a montré que l'autisme n'est pas lié au comportement des parents. En 1965, Rimland a fondé la société « Autism Society of America » puis l'institut « Autism Research Institute » en 1967. (Rimland, 1964)

En 1966, Andreas Rett a étudié un groupe de patientes féminines présentant des troubles neurologiques incluant une ataxie, des stéréotypes manuels et une spasticité. Il a décrit un comportement autistique dans ce groupe de patientes dont le développement était normal jusqu'à l'âge de 5 à 6 mois puis qui a subi une régression brutale. (Rett, 1966)

En 1981, la pédopsychiatre anglaise Lorna Wing a publié une revue en se basant sur les descriptions d'Asperger dans laquelle elle a choisi le nom « Syndrome d'Asperger » au lieu de « psychopathie autistique ». Dans sa revue, Wing a montré que le syndrome d'Asperger et l'autisme présentent trois symptômes communs : une déficience des interactions sociales, des troubles de la communication et une restriction des intérêts et des comportements. (Wing, 1981)

## 1.2 Classification selon le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux DSM-V

Le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM), rédigé par l'American Psychiatric Association en 2013, est le plus souvent utilisé pour le diagnostic des TSA. Il fait référence aux signes et symptômes pour confirmer un diagnostic de TSA.

Depuis la première description de l'autisme par Kanner en 1943, les approches de diagnostic ont subi de nombreux changements. Dans les années 1970, des études suggérant l'association de l'autisme avec une déficience intellectuelle ont été menées (Cohen & Young, 1977). À la fin des années 1970, il y avait un consensus sur le fait que l'autisme se caractérise par : un développement social altéré, une altération des compétences linguistiques et de la communication, et une résistance au changement, se manifestant dans les premières années de la vie. Par suite, l'autisme était inclus en tant que nouvelle condition dans le DSM-III (Volkmar et al., 2005).

Dans le DSM-III, l'autisme était classé dans les troubles envahissants du développement (TED). Cette définition était basée sur la définition de Kanner, l'autisme infantile (Volkmar et al., 2005). Pour le DSM-III, six critères de diagnostic doivent être rassemblés pour établir le diagnostic, y compris l'apparition du trouble avant l'âge de 30 mois, les déficits dans le développement de langage, des modèles de parole particuliers si la parole est présente,

l'absence de réponse aux autres, des réponses bizarres à divers aspects de l'environnement, des hallucinations et des incohérences comme dans la schizophrénie.

Dans le DSM-III-R (DSM-III-Révisé), les critères de l'autisme ont été considérablement modifiés. Ce changement a en fait souligné le fait que les chercheurs comprenaient de plus en plus que l'autisme n'est pas une condition unique, mais un spectre. Avec cette révision, l'autisme avait désormais un concept plus large, car le trouble envahissant du développement-non spécifié (TED-NOS) est apparu et comprend les enfants avec des formes intermédiaires. (Volkmar et al., 1994)

Pour le DSM-IV, plusieurs sous-groupes ont été inclus à l'intérieur des TED : le trouble autistique, le trouble désintégratif de l'enfance, le syndrome d'Asperger, le syndrome de Rett et le TED-NOS. (Volkmar et al., 2005).

En 2013, la dernière édition du DSM, le DSM-V, a apporté des modifications importantes aux critères de diagnostic de l'autisme. Plusieurs troubles inclus dans le DSM-IV ont été supprimés en faveur d'un seul terme du spectre autistique (TSA). Alors, la catégorie des troubles envahissants du développement n'apparaît plus dans le DSM-V, tandis que le trouble autistique, le syndrome d'Asperger, le trouble désintégratif de l'enfance et le TED-NOS ont été combinés en TSA. (Volkmar & Reichow, 2013)

Selon le DSM-V, les TSA sont diagnostiqués sur la base de deux principales caractéristiques :

1. Les troubles persistants d'interaction sociale et de communication.
2. Les comportements, intérêts restreints et répétitifs.

### *1.2.1 Critères du diagnostic des TSA*

Selon le DSM-V, un enfant doit avoir des déficits dans chacun des trois domaines de la communication plus au moins deux des quatre domaines de comportements restreints et répétitifs.

1. Les déficits dans la communication et l'interaction sociale se manifestent par :
   - Des déficits de réciprocité socio-émotionnelle, allant d'une approche sociale anormale à un intérêt réduit et à l'incapacité de répondre à des interactions sociales.

- Des déficits dans la communication non verbale, allant d'une communication mal intégrée à des anomalies du contact visuel et du langage corporel.
- Des déficits dans le développement et le maintien des relations, allant des difficultés à ajuster le comportement pour s'adapter à divers contextes sociaux à la difficulté de partager des jeux et à se faire des amis.

2. Les comportements restreints et répétitifs se manifestent par :
   - Des mouvements moteurs, stéréotypés et répétitifs, utilisation des objets ou de la parole comme l'écholalie.
   - L'insistance sur la similitude et l'adhésion inflexible aux routines par exemple les difficultés avec les transitions et le changement de la nourriture.
   - Des intérêts très restreints et fixes dont l'intensité et la concentration sont anormales comme le fort attachement pour des objets inhabituels.
   - D'hyper/hypo réactivité aux actions inhabituels par exemple la réaction indésirable à des sons ou textures spécifiques.

Le DSM-V décrit trois niveaux de sévérité des TSA :

1. Niveau 1 : nécessite un soutien. Les patients avec ce niveau rencontrent des difficultés à initier des interactions sociales et des comportements répétitifs.
2. Niveau 2 : nécessite un soutien substantiel. Les patients avec ce niveau présentent des retards dans la communication verbale et non verbale, des difficultés à initier des interactions sociales, des intérêts restreints et des comportements répétitifs.
3. Niveau 3 : nécessite un soutien très substantiel. Les patients avec ce niveau présentent une altération grave du fonctionnement quotidien, une initiation très limitée de l'interaction sociale, une limitation dans la capacité de communication verbale et des comportements répétitifs.

Pour répondre aux critères du diagnostic des TSA, les symptômes doivent être présents au début de la période du développement social et doivent entraîner des altérations significatives du fonctionnement social.

## 1.3 Prévalence

Suite à l'expansion des critères de diagnostic des TSA, les études ont montré des augmentations spectaculaires dans leur prévalence. Durant les années 1960 et 1970, les premières études sur la prévalence des TSA ont rapporté des estimations de 4 à 5 cas pour 10 000 enfants, en Europe et aux États-Unis (Lotter, 1966). Cette prévalence a augmenté au cours des années pour atteindre 1 enfant sur 68 aux Etats-Unis selon le centre «Center for Disease Control and Prevention (CDC)», 1 enfant sur 150 en France selon la Haute Autorité de Santé et 1 enfant sur 66 au Liban dans les régions de Beirut et du Mont-Liban (Chaaya et al., 2016). Dans le monde, la prévalence était estimée de 1 enfant sur 160 selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). Cependant, aux États-Unis, la prévalence a progressivement augmenté pour toucher 1 enfant sur 54 âgé de 8 ans, selon un rapport publié par le CDC (Maenner, 2020) (Figure 1). Ensuite, le CDC a rapporté que 1 enfant sur 44 âgé de 8 ans aux États-Unis a un TSA. Les premières études de prévalence ont également révélé une différence constante entre les sexes ; les garçons étant trois à quatre fois plus susceptibles de développer des TSA que les filles.

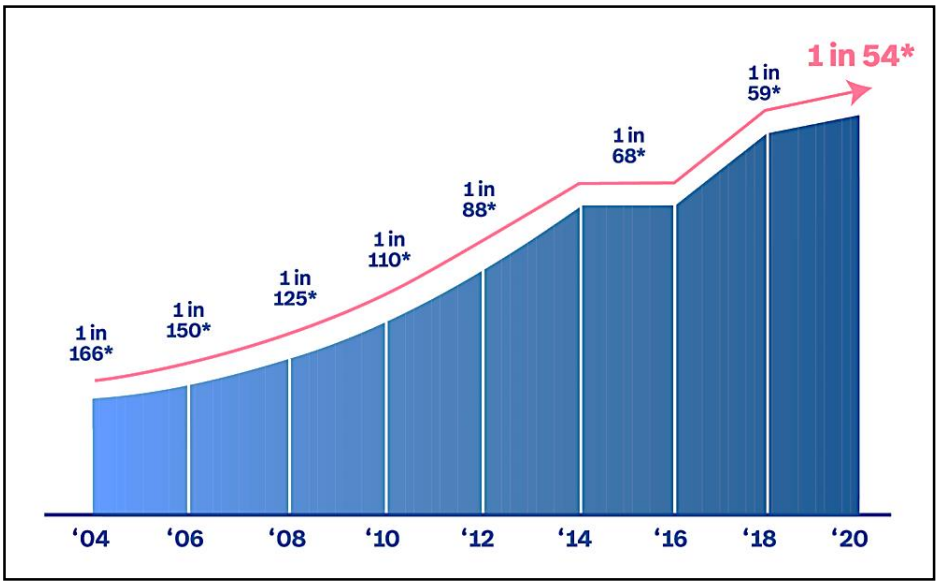



**Figure 1 :** Graphique montrant l'augmentation apparente de la prévalence des TSA aux États-Unis. (CDC, 2022)

Les hypothèses pour expliquer cette augmentation de la prévalence des TSA incluent l'expansion des critères de diagnostic, l'amélioration du dépistage, l'augmentation des facteurs de risque spécifiques au TSA, l'expansion de la sensibilisation chez les parents et les cliniciens et l'amélioration des services.

*1.3.1 Evolution de la prévalence selon les méthodes d'évaluation*

La prévalence est une mesure épidémiologique qui représente la proportion de la population affectée par une certaine condition (Fletcher et al., 2013). Elle est mesurée en divisant le nombre de cas par le nombre de personnes dans la population. L'estimation de la prévalence est importante pour la prise de décision en domaine de la santé et l'évaluation de l'impact des interventions.

Les études de prévalence se font en trois étapes importantes :

1. L'échantillonnage : un échantillon fournit des informations sur une population cible définie par des caractéristiques communes évaluées et mesurées avec précision tels que l'âge, le sexe, la langue, l'origine ethnique et la résidence. Par conséquent, les sous-ensembles de la population qui vivent dans des endroits inaccessibles aux recrutements doivent être décrits et leur nombre estimé en proportion de la population cible.
2. La collection d'informations : dans cette étape les informations sont collectées à travers les instruments utilisés sur l'échantillon choisi. L'utilisation de méthodes de collecte de données se fait pour des raisons d'estimation comme celle de la fréquence et la distribution d'un trouble, et d'hypothèse comme l'association entre un trouble et d'autres variables. Les méthodes de collection d'information doivent être utilisées avec tous les répondants d'une même façon afin que les informations à analyser soient comparables. Tout écart dans une méthode standard de collection conduit à une comparaison biaisée.
3. L'analyse des données : les méthodes d'échantillonnage complexes nécessitent l'utilisation de méthodes statistiques spéciales afin d'obtenir des estimations non biaisées et associées à la précision statistique correcte.

Cependant, l'identification intrinsèque c'est-à-dire l'identification des facteurs de mesure internes comme les différences dans les méthodes d'étude peuvent conduire à ce que différents individus soient comptés ou non comme ayant un TSA. Les estimations de la prévalence des

TSA sont tirées des rapports rétrospectifs, des entretiens téléphoniques et des enquêtes sur l'ensemble de la zone. Ces différences entre les méthodologies de recherche affecteraient obligatoirement les estimations de la prévalence. (Neggers, 2014)

Donc, les études de prévalence fournissent des observations qui pourront conduire à des études approfondies sur les causes. Par exemple dans le cas des TSA, les études ont montré que les garçons sont trois à quatre fois plus susceptibles de développer des TSA que les filles. Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires pour expliquer le mécanisme biologique responsable de cette différence de prévalence entre les sexes. De plus, d'autres types d'études épidémiologiques, telles que les études cas-témoins, peuvent nous aider à comprendre les facteurs de risque associés aux TSA. (Rice et al., 2012)

### *1.3.2 Evolution de la prévalence selon les critères*

Les catégories de facteurs susceptibles d'influencer la prévalence des TSA sont :

- L'identification extrinsèque : les facteurs externes de classification et de sensibilisation comme les changements dans les critères de diagnostic ou l'accès aux services peuvent influencer qui sera identifié pour les études de prévalence des TSA.
  - Critères de diagnostic : l'évolution des critères de diagnostic des TSA fait partie des raisons admises de l'accroissement de la prévalence des TSA (Ziats & Rennert, 2016). Les critères de diagnostic n'ont pas été clairement fixés avant la publication de la troisième édition du DSM-III en 1980. Ainsi, les diagnostics posés avant cette publication n'ont pas été évalués selon les mêmes critères. Les critères de TSA ont ensuite été modifiés au fil des versions successives du DSM jusqu'à sa dernière révision, le DSM-5, en 2013, dans laquelle la définition de l'autisme a été modifiée (Volkmar & Reichow, 2013). Par exemple, King et Bearman 2009, dans leur étude réalisée afin d'estimer dans quelle mesure la prévalence accrue de l'autisme en Californie peut être expliquée par des changements dans les pratiques de diagnostic, ont montré que le diagnostic des TSA augmentait de manière significative lorsque les pratiques de diagnostic ont changé (King & Bearman, 2009). Compte tenu de toutes les modifications, il n'est pas inattendu que les définitions des TSA puissent jouer un rôle dans l'augmentation des taux de prévalence.

- Facteurs culturels et sensibilisation : Les études ont montré que la prévalence des TSA a considérablement augmenté, notamment dans les pays développés. Ces études ont souligné que la prévalence des TSA en Europe, Asie et aux États-Unis est de 25 sur 1000 à 2 sur 1000, tandis qu'à la Chine elle est de 1,1 pour 1000 enfants (Diehl, 2019). Un autre phénomène important qui a entraîné une augmentation du signalement des cas de TSA est la sensibilisation des parents et les discussions sur les TSA et ces problèmes avec les services liés aux diagnostics dans les médias. En plus, l'action des célébrités dans la sensibilisation aux TSA a conduit également à une augmentation des signalements. La prévalence montre une augmentation significative dans la plupart des pays de l'Est et du Moyen-Orient suite à l'augmentation des études sur les TSA dans ces pays (Chaaya et al., 2016).

### *1.3.3 Augmentation de la prévalence selon les risques*

Un changement étiologique possible dans la population en relation avec des facteurs génétiques ou environnementaux comme les expositions spécifiques dans l'environnement peuvent augmenter le risque de développer des TSA. Les facteurs de risque prénatals, périnatals et postnatals ont été suggérés comme des causes possibles pour l'augmentation de la prévalence des TSA. Par exemple, l'exposition de la mère au stress durant la grossesse augmente le risque des effets indésirables sur le fœtus. (Sauer et al., 2021)

De plus, cette prévalence peut être augmentée avec les facteurs de risque génétiques qui ont un rôle dans l'étiologie des TSA. En fait, les mariages consanguins sont significativement associés à l'apparition des TSA chez les descendants (Bitar et al., 2020). Par exemple, une association a été rapportée entre la présence de TSA, de schizophrénie et des troubles polaires chez les enfants nés des parents consanguins et le risque élevé des TSA (Dahdouh et al., 2016; Xie et al., 2019). Ces mariages contribuent indirectement à l'augmentation de la prévalence des TSA.

## 1.4 Neuro-anatomie et Neuropathologie des TSA

Grâce au développement de l'imagerie cérébrale, de nombreuses études ont été réalisées chez les sujets atteints de TSA pour observer les anomalies neuro-anatomiques (Baizer, 2021;

Donovan & Basson, 2017). Il s'agit notamment de changements volumétriques d'une région et d'altérations de la matière grise ou blanche.

Les techniques utilisées dans l'imagerie comprennent : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour montrer la structure, l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique nucléaire (IRMf) pour montrer l'activation fonctionnelle et la tomographie à émission de positions (TEP) utilisée pour visualiser le cerveau au repos.

### *1.4.1 Neuro-anatomie*

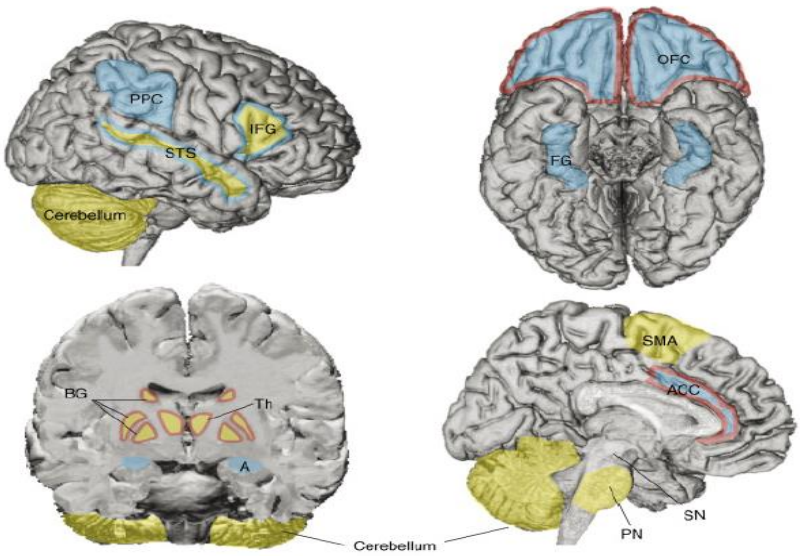
#### 1.4.1.1 Le volume cérébral

Les études d'imagerie par IRM ont montré que l'apparition des symptômes autistiques s'accompagnent des anomalies dans la structure cérébrale. Par rapport aux sujets témoins, les sujets atteints de TSA ont un élargissement de 5 à 10% du volume cérébral total entre l'âge de 18 mois et 4 ans (Sacco et al., 2015; Vaccarino & Smith, 2009). L'augmentation du volume cérébral a été attribuée à une augmentation exagérée de la matière blanche et non de la matière grise (Hazlett et al., 2005; Herbert et al., 2003). Ces augmentations de volume cérébral pourraient être dues à une anomalie dans l'un des trois processus suivants: une augmentation de la production des tissus non neuronaux, une augmentation de la neurogénèse, ou une diminution de la mort neuronale (Verhoeven et al., 2010). D'autre part, la macrocéphalie a été rapportée chez environ 20% des sujets atteints de TSA (Zwaigenbaum et al., 2014). Les mécanismes responsables de l'augmentation du volume cérébral dans les TSA ne sont pas identiques entre les patients. Bien que les rapports de macrocéphalie dans les TSA datent depuis Kanner, des données supplémentaires sont encore nécessaires sur la relation entre la croissance précoce du cerveau et le risque de TSA dans les échantillons familiaux à risque élevé.

#### 1.4.1.2 Régions cérébrales associées à la pathologie des TSA

Des études utilisant la technique d'imagerie par IRMf ont mis en évidence les régions cérébrales associées à la pathologie des TSA tels que le cervelet, les régions limbiques, les régions fronto-temporales et fronto-parietales et les ganglions basaux (Amaral et al., 2008)

Les différentes régions cérébrales ainsi que les déficits impliqués dans l'étiologies des TSA sont présentés dans la figure 2 (Amaral et al., 2008).




| Social impairment | Communication deficits | Repetitive behaviors |
|---|---|---|
| OFC – Orbitofrontal cortex<br>ACC – Anterior cingulate cortex<br>FG – Fusiform gyrus<br>STS – Superior temporal sulcus<br>A – Amygdala mirror neuron regions<br>IFG – Inferior frontal gyrus<br>PPC – Posterior parietal cortex | IFG- Inferior frontal gyrus (Broca's area)<br>STS – Superior temporal sulcus<br>SMA – Supplementary motor area<br>BG – Basal ganglia<br>SN – Substantia nigra<br>Th – Thalamus<br>PN – Pontine nuclei cerebellum | OFC – Orbitofrontal cortex<br>ACC – Anterior cingulate cortex<br>BG – Basal ganglia<br>Th – Thalamus |

**Figure 2 :** Les régions cérébrales et les fonctions associées chez les patients avec TSA. Les régions impliquées dans les déficiences sociales sont présentées en bleu, les régions associées aux déficits de communication sont présentées en jaune et les régions associées aux comportements répétitifs sont colorées en rouge. (Amaral et al., 2008)

#### 1.4.1.2.1 Cervelet

Le cervelet, une structure dense en neurones, est situé en dessous du lobe occipital du cortex cérébral et au-dessus du pont et du tronc cérébral. Il est impliqué dans la proprioception, le contrôle de la motricité fine et dans les fonctions cognitives comme le langage et la régulation affective suite à son interaction avec le cortex.

De nombreuses études d'imagerie ont montré des anomalies du cervelet chez les sujets atteints de TSA. Les anomalies les plus observées sont la perte de cellules de Purkinje et de cellules granulaires dans le cortex cérébelleux, la perte de neurones dans les noyaux cérébelleux profonds et les différences de taille des lobules du vermis cérébelleux (Bruchhage et al., 2018; Donovan & Basson, 2017; Wegiel et al., 2014). L'hypoplasie des lobules du vermis cérébelleux central VI et VII a été la première anomalie détectée dans le cervelet des sujets atteints de TSA (Courchesne et al., 1988).

En plus, la diminution substantielle de la taille et du nombre de cellules de Purkinje est l'une des anomalies constantes observées suite à l'analyse post-mortem des cerveaux (Amaral et al., 2008; Wegiel et al., 2014).

#### 1.4.1.2.2 Le système limbique

Le système limbique est composé d'un ensemble de structures cérébrales qui prend en charge diverses fonctions, notamment les émotions, le comportement et la formation de la mémoire. Le système limbique comporte l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus, le gyrus cingulaire et les ganglions de la base.

L'amygdale est une région du cerveau principalement associée aux émotions. L'amygdale est un groupe de noyaux en forme d'amande situé dans le lobe temporal médial, juste devant l'hippocampe. Elle a un rôle crucial dans la médiation de nombreux aspects des émotions et du comportement comme la peur, le plaisir et l'agressivité. Les troubles de l'interaction sociale et des émotions chez les sujets TSA peuvent montrer un dysfonctionnement de l'amygdale par IRMf (Donovan & Basson, 2017). Des études ont rapporté que la taille de l'amygdale était augmentée chez les sujets TSA comparé aux témoins (Schumann et al., 2009).

L'hippocampe est une structure complexe du cerveau située profondément au niveau du lobe temporal. Il joue un rôle important dans la mémoire et l'apprentissage et il est fréquemment étudié avec l'amygdale en raison de leurs connexions et implications dans les fonctions du « cerveau social » (Goodman et al., 2014). Certaines études ont montré une diminution significative du volume de l'hippocampe (Eilam-Stock et al., 2016).

Le thalamus est une structure de la matière grise située près du centre du cerveau, juste au-dessus du tronc cérébral et du mésencéphale et permettant des connexions avec le cortex cérébral. Il contrôle les émotions, les motivations et la cognition entre autres (Torrico & Munakomi, 2022). Chez les personnes atteintes de TSA, on observe fréquemment des altérations des fonctions sensorimotrices ce qui suggèrent l'implication du thalamus dans les TSA en raison de son rôle important dans la modulation de la signalisation sensorimotrice vers le cortex (Ayub et al., 2021). Par IRM, diverses études ont montré l'implication du thalamus dans les TSA, d'après la réduction de son volume chez les sujets TSA par rapport

au volume total du cerveau (Tamura et al., 2010; Tsatsanis et al., 2003) et l'anomalie de la connectivité thalamocorticale (Cheon et al., 2011; Mizuno et al., 2006).

#### 1.4.1.2.3 Le cortex

Le cortex cérébral constitue la couche la plus externe du cerveau et il est constitué principalement de corps de neurones. Il renferme différents types de neurones, d'interneurones et de cellules gliales. On distingue quatre lobes : frontal, pariétal, temporal et occipital.

Le cortex frontal contrôle les processus cognitifs tels que la prise de décision, la planification, la mémoire, les émotions, le comportement social, l'apprentissage et la communication. Chez les patients TSA, on observe des altérations de l'interaction sociale et des émotions ce qui rend le cortex frontal candidat dans l'étiologie des TSA. En fait, en raison de l'amélioration des techniques d'imagerie, les études sur les patients TSA ont montré des croissances corticales anormales avant l'âge de 2 ans (Courchesne, Campbell, et al., 2011), des anomalies de l'épaisseur corticale (Khundrakpam et al., 2017; Ohta et al., 2016) et une désorganisation des neurones à travers les couches corticales et leurs connexions avec d'autres régions du cerveau (Courchesne, Mouton, et al., 2011).

Le gyrus fusiforme, une région du cortex temporal, joue un rôle important dans la reconnaissance visuelle. Le traitement facial a été reconnu comme un déficit spécifique chez les patients TSA qui présentent des troubles de la direction du regard et du contact visuel. Les études ont rapporté que ces patients présentent également un volume anormal du gyrus fusiforme par rapport aux témoins. (Kleinhans et al., 2011)

#### 1.4.1.2.4 Le corps calleux

Le corps calleux est un gros faisceau de fibres nerveuses interconnectant les deux hémisphères cérébraux et permettant la communication entre les deux côtés du cerveau. Plusieurs études ont montré une diminution dans le volume du corps calleux chez les enfants et les adultes avec TSA par rapport aux témoins (Hardan et al., 2009; Sui et al., 2018). En outre, des différences dans l'épaisseur du corps calleux ont été observées, le splenium et le genou étant plus minces chez les enfants TSA (Vidal et al., 2006).

### *1.4.2 Neuropathologie*

Bien que les études par IRM fournissent une vue macroscopique de l'endroit où le cerveau peut se développer différemment chez les personnes atteintes de TSA, le tissu cérébral post-mortem est nécessaire pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Depuis de nombreuses années, des études expérimentales et post-mortem sur des sujets TSA ont identifié des pathologies du système nerveux central (SNC) au niveau morphologique et cellulaire. Par exemple, des études post-mortem examinant les cerveaux sectionnés de patients atteints de TSA ont révélé des anomalies significatives dans les cellules de Purkinje, signalant une taille cellulaire plus petite (Bauman & Kemper, 1985; Kemper & Bauman, 1993). Cette réduction a ensuite été confirmée par un certain nombre de chercheurs (Skefos et al., 2014; Whitney et al., 2008). Par exemple, Fatemi et al. (2002) ont rapporté une diminution de 24 % de la taille des cellules de Purkinje restants dans le cervelet chez les cas de TSA comparé aux témoins (Fatemi et al., 2002) (Figure 3). Même si les irrégularités des cellules de Purkinje sont des découvertes cohérentes dans les TSA, des recherches supplémentaires sont encore nécessaires pour confirmer ces résultats.

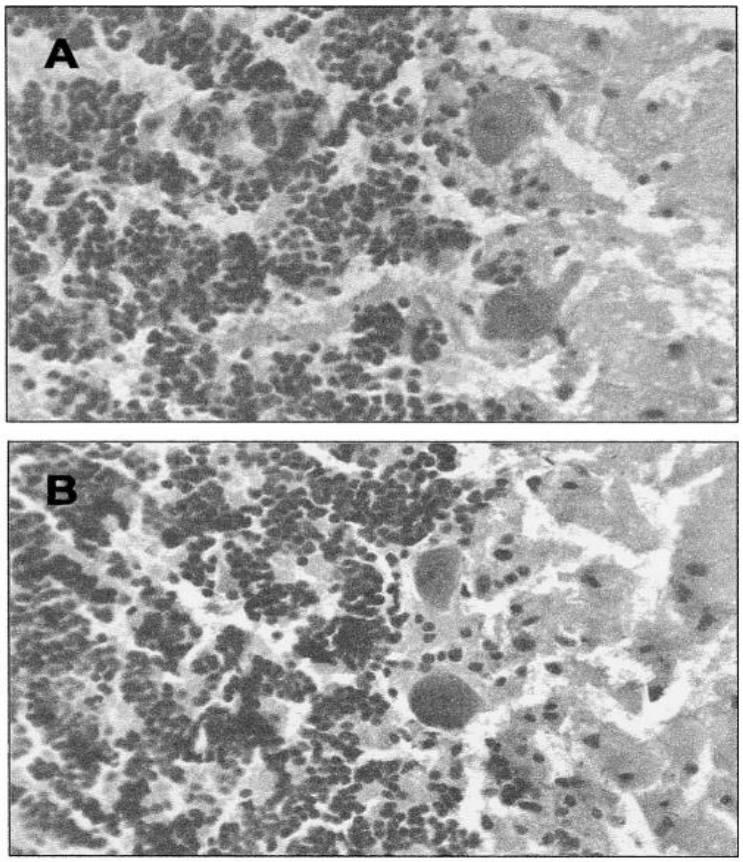



**Figure 3:** Représentation des cellules de Purkinje de (A) témoins (B) et TSA. (Fatemi et al., 2002)

De plus, au niveau de l'amygdale, Kemper et Bauman (1993) ont été parmi les premiers à observer des anomalies dans l'amygdale des sujets atteints de TSA, car ils ont trouvé des densités cellulaires accrues et une diminution de la taille des neurones chez ces sujets (Kemper & Bauman, 1993). De plus, plus récemment, une étude de 52 cerveaux post-mortem humains de TSA a révélé que l'amygdale élargie chez les enfants atteints de TSA peut être due à un nombre excessif de neurones (Avino et al., 2018).

Au niveau de l'hippocampe, les études ont montré qu'il y a des différences significatives dans les textures hippocampiques chez les sujets TSA comparativement aux témoins (Chaddad et al., 2017).

D'autre part, la connectivité cérébrale est différente chez les personnes atteintes de TSA. Une connectivité plus faible entre les régions cérébrales distales et une connectivité accrue dans les régions cérébrales proximales ont été trouvées (Mohammad-Rezazadeh et al., 2016).

Cependant, il existe des données contradictoires et plusieurs études n'ont pas pu confirmer ce résultat.

Par ailleurs, il existe des preuves d'une forme neuro-immune des TSA basée sur les découvertes d'une neuroinflammation continue dans la majorité des cerveaux post-mortem des sujets de TSA. Ce phénotype neuroinflammatoire dans le cerveau se traduit par des niveaux accrus de cytokines, de chimiokines et de transcriptions astrogliales et microgliales réactives. (Vargas et al., 2005)

Les altérations dans des régions cérébrales spécifiques dans les TSA discutées jusqu'à présent, y compris des changements dans la densité, le nombre, l'organisation et la composition des neurones, sont susceptibles de modifier la connectivité locale dans des régions spécifiques du cerveau. Deux grandes hypothèses ont été proposées. L'une concerne les modifications de l'équilibre excitateur/inhibiteur provoqués par des modifications de la composition des différents types de cellules neuronales ou des activités dans le cerveau et la seconde propose une hyperconnectivité dans des zones cérébrales spécifiques. (Donovan & Basson, 2017)

## 1.5 Neurochimie des TSA

Les premières données sur l'implication de la neurotransmission dans les TSA ont été obtenues à partir des études sur le cerveau post-mortem. Récemment, grâce à l'imagerie moléculaire et aux arguments génétiques, l'implication des neurotransmetteurs est plus étudiée. Les neurotransmetteurs jouent un rôle important dans le développement normal du cerveau et contribuent à la régulation de la mémoire, du comportement et de l'activité motrice (Quaak et al., 2013). Effectivement, ils ont un effet sur la migration des cellules neuronales, la différenciation, la synaptogenèse et l'apoptose. Par conséquent, un dysfonctionnement dans le système des neurotransmetteurs peut causer des troubles dans le développement du cerveau, aboutissant aux TSA (Arya & Sindhwani, 2016)

### *1.5.1 Le GABA*

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur, est dérivé du glutamate grâce à l'action de la glutamate décarboxylase. Il joue un rôle primordial dans la régulation de la migration cellulaire, la différenciation neuronale et des stades de maturation (Marotta et al., 2020). La réduction de la transmission par le GABA a été associée à des

troubles de sommeil, une hyperactivité, un retard mental, des convulsions, et des problèmes de la coordination motrice (Deidda et al., 2014). Mais il peut également avoir des effets excitateurs en fonction de la concentration intracellulaire du chlore. Les actions des co-transporteurs cation-chlorure sont essentielles pour déterminer si le GABA est hyperpolarisant ou dépolarisant. Ainsi, quand le récepteur de GABA ouvre un pore de chlorure lorsqu'il est actif en raison de la concentration élevée de chlorure intracellulaire, la probabilité de dépolariser un neurone exprimant les récepteurs est déterminée par le rapport de l'activité de l'influx de chlorure à l'efflux de chlorure (McNeill et al., 2018).

De nombreux résultats proposent que le système GABAergique a un rôle important dans les TSA. Les études montrent que chez les sujets TSA, il y une diminution des enzymes du système GABAergique, une élévation des taux plasmatiques de GABA et une réduction de la disponibilité du GABA (Al-Otaish et al., 2018). La diminution des concentrations de GABA pourrait aboutir à la diminution du seuil des crises d'épilepsie qui sont souvent liées aux TSA (Deidda et al., 2014).

Quelques études ont montré une association entre les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) des récepteurs GABA dans le chromosome 15q11–q13 chez des sujets TSA (Cellot & Cherubini, 2014). Alors que d'autres études n'ont montré aucune corrélation entre différents SNP des récepteurs GABA et les TSA (Mahdavi et al., 2018; Sgadò et al., 2013)

### *1.5.2 Le glutamate*

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du SNC. Il joue un rôle important dans l'apprentissage et la mémorisation. Par la décarboxylase de l'acide glutamique, le glutamate se transforme en GABA.

Les récepteurs du glutamate existent en deux groupes : les récepteurs canaux formés des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDAR), récepteurs de l'acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPAR) et kaïnate, et les récepteurs métabotropiques du glutamate, à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Figure 4). Les études ont proposé que les récepteurs NMDAR et AMPAR ont un rôle dans la neurophysiologie des TSA (Lim et al., 2021). De plus, des modèles murins tels que les souris Shank3 DC/DC, les souris Fmr1−/− et les souris Shank2−/−, montrent des altérations des NMDAR (Kouser et al.,

2013). Dans un modèle murin déficitaire en CDKL5 et présentant un phénotype de type autistique, il a été montré qu'il existe une diminution significative de la sous-unité AMPAR GluA2 dans l'hippocampe (Yennawar et al., 2019). Dans des modèles murins, une correction précoce des altérations des NMDAR a abouti à une amélioration considérable des comportements autistiques (Chung et al., 2019). Egalement, les récepteurs NMDA ont été associés aux TSA suite à l'association des variants des gènes *GRIN2A* et *GRIN2B* codant les sous-unités GluN2A et GluN2B, avec les TSA (H. J. Yoo et al., 2012).

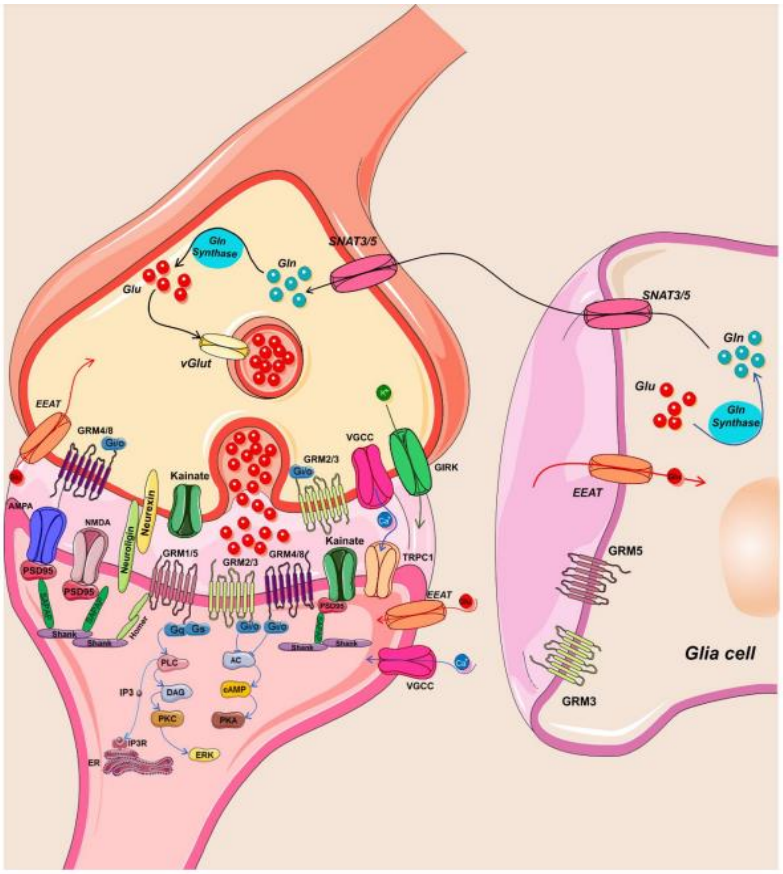



**Figure 4:** Dessin schématique de la voie synaptique glutamatergique altérée dans les TSA. Une fois libéré, le glutamate peut se lier et activer les récepteurs ionotropes AMPA, Kainate et NMDA ou les récepteurs métabotropes couplés aux protéines G sur les neurones postsynaptiques ou présynaptiques ainsi que sur les cellules gliales. Le glutamate, absorbé dans les cellules gliales par les transporteurs de glutamate, est converti en glutamine, qui peut être transportée dans les neurones glutamatergiques par les transporteurs. (Montanari et al., 2022)

### *1.5.3 La sérotonine*

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est un neuromédiateur synthétisé à partir du tryptophane et impliquée dans la division cellulaire, les prolifération et plasticité corticales, et la synaptogenèse (Carvajal-Oliveros & Campusano, 2021) (Figure 5) . En outre, elle régule plusieurs processus cérébraux tels que la mémoire, l'humeur, la capacité à l'apprentissage et le cycle veille-sommeil (Jenkins et al., 2016). En effet, les altérations précoces dans le système sérotoninergique ont été liées à plusieurs troubles neuro-développementaux, y compris les TSA et les troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité (TDAH) (Carvajal-Oliveros & Campusano, 2021). Les études ont montré que les concentrations de la sérotonine dans le sang sont plus élevées chez les sujets TSA comparé aux témoins (Abdulamir et al., 2018; Muller et al., 2016). En fait, l'augmentation de la sérotonine est un trouble métabolique souvent observé chez les sujets TSA (Khramova et al., 2017).

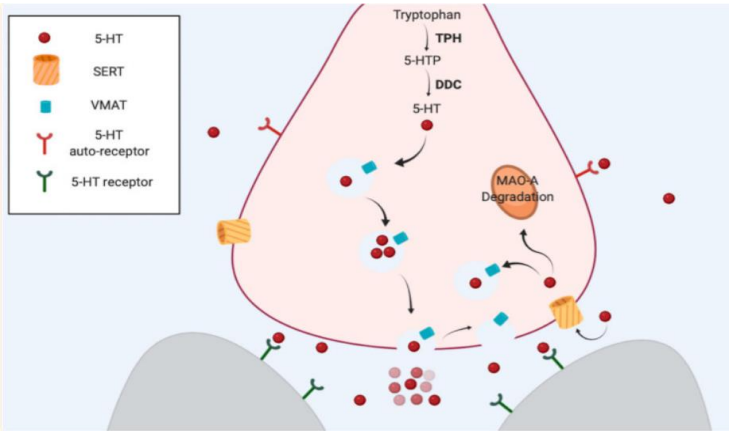



**Figure 5:** Dessin schématique de la synapse sérotoninergique. La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane. La première étape est l'hydroxylation du tryptophane réalisé par l'enzyme tryptophane hydroxylase (TPH). L'enzyme Dopa décarboxylase (DDC) catalyse l'étape finale. Le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT) transporte la sérotonine du cytosol vers les vésicules. Après qu'un potentiel d'action ait atteint le terminal, la sérotonine est libérée des vésicules et le neurotransmetteur est capable de se lier et d'activer des récepteurs spécifiques dans le même neurone (présynaptique) ou dans d'autres neurones (postsynaptique). Le transporteur de membrane plasmique SERT recapture la sérotonine dans le cytosol du neurone présynaptique qui peut être réutilisée comme neurotransmetteur ou bien peut être dégradée par l'enzyme MAO-A. (Carvajal-Oliveros & Campusano, 2021)

D'autre part, les facteurs génétiques ont une influence sur la régulation de la sérotonine. Les polymorphismes au niveau du gène *SLC6A4* (solute carrier family 6 member 4) qui code le transport plaquettaire et neuronal de la 5-HT, ont été corrélés aux TSA (Jaiswal et al., 2015). Dans un modèle animal, on a montré que les embryons des mères Slc6a+/- ont une résistance réduite au stress prénatal, ce qui augmente le risque pour les descendants de développer un TSA (Sjaarda et al., 2017).

### *1.5.4 La dopamine*

La dopamine, synthétisée à partir de la tyrosine, est un neurotransmetteur de la classe des catécholamines et le précurseur de la noradrénaline et de l'adrénaline. La dopamine est également une neuro-hormone qui est produite par l'hypothalamus et qui sert à inhiber la libération de la prolactine par l'hypophyse. En plus d'être associée au contrôle moteur, la dopamine joue un rôle primordial dans les comportements sociaux et la cognition (Marotta et al., 2020). En fait, des altérations dans le système dopaminergique peuvent entrainer des troubles neuropsychiatriques comme les TSA (Schalbroeck et al., 2021).

Les études génétiques ont montré une association entre les TSA et plusieurs polymorphismes dans les récepteurs de la dopamine DR3 et DR4 et le transporteur DAT (Staal, 2015). Une étude menée sur des souris mâles et femelles sur C57BL/6, a montré que des mutations dans le transporteur *DAT* cause un efflux anormal de dopamine conduisant à des phénotypes de TSA (DiCarlo et al., 2019). Par ailleurs, l'haplo insuffisance de *SHANK3* réduit l'activité dopaminergique neuronale aboutissant à des anomalies comportementales comme une altération des compétences sociales (Bariselli et al., 2016).

### *1.5.5 L'acétylcholine*

L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur du système nerveux parasympathique. Il est utilisé par les motoneurones à la jonction neuromusculaire et il agit comme neuro-modulateur au niveau du SNC. L'acétylcholine se lie aux récepteurs nicotinique et muscarinique au niveau post-synaptique.

Des anomalies du système cholinergique, y compris la réduction significative du sous-type nicotinique α4β2 des récepteurs de l'acétylcholine (nAChR) dans le cortex pariétal et frontal, ont été détectées dans des cerveau post-mortem de patients TSA (Martin-Ruiz et al., 2004).

Diverses études menées sur des modèles animaux de TSA ont montré que les nAChRs sont impliqués dans la modulation des comportements sociaux et répétitifs (L. Wang et al., 2015).

D'autre part, des variations dans le gène *CHRNA7*, codant le nAChRα7, sur le chromosome 15q13.3 ont étés associées à des phénotypes autistiques (Yasui et al., 2011). Chez des modèles murins mutants du gène Chrna7, une étude a montré une augmentation de l'interleukine 6 dans le cerveau fœtal en raison de l'activation immunitaire maternelle (libération des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine 6, le facteur de nécrose tumorale alpha et d'autres), suivie d'une augmentation des troubles comportementaux chez les descendants. De plus, il a été rapporté que la supplémentation en choline gestationnelle améliorait la réponse du cerveau fœtal à l'activation immunitaire maternelle et prévenait plusieurs anomalies comportementales induites chez les descendants. (W.-L. Wu et al., 2015).

### *1.5.6 L'ocytocine*

L'ocytocine, un neuropeptide synthétisé dans l'hypothalamus, est impliquée dans la parturition et la lactation. Il a été démontré aussi qu'elle modifie et module la plasticité synaptique et les comportements sociaux (Hammock, 2015).

Les résultats des études sur le rôle de l'ocytocine dans l'étiologie des TSA ne sont pas tous cohérents. L'association entre les TSA et le degré de méthylation du récepteur du gène *OXTR* a été rapporté dans plusieurs études (Moerkerke et al., 2021). Par ailleurs, des variations au niveau de gène *SHANK3* dont la protéine joue un rôle important dans le développement des synapses et qui est l'un des gènes responsable des troubles neuro-développementaux, causent des altérations dans le système ocytocinergique (Boccuto, Lauri, et al., 2013). Les effets de ces mutations pourraient causer des troubles comportementaux liés à la plasticité synaptique dans les TSA à cause de l'échec dans le fonctionnement du système ocytocinergique au cours de premiers stades du neuro-développement (Rajamani et al., 2018).

### *1.5.7 La mélatonine*

La mélatonine est une neuro-hormone, synthétisée à partir de la sérotonine. Elle joue un rôle important dans la régulation des rythmes circadiens, spécifiquement le rythme veille-sommeil. De plus, elle protège le fœtus contre l'inflammation et les lésions cérébrales avant

la maturation de la glande pinéale, qui est responsable de la sécrétion de la mélatonine (Jin et al., 2018) (Figure 6).

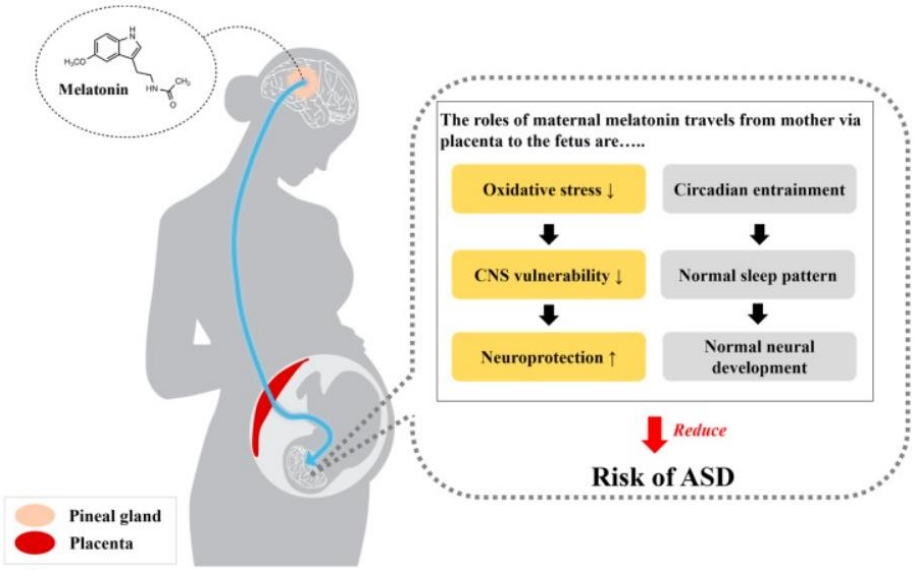



**Figure 6:** Les rôles de la mélatonine maternelle qui passe de la mère au fœtus via le placenta. Les fonctions de la mélatonine dans la protection contre l'inflammation et l'entraînement circadien peuvent réduire le risque de TSA. Les concentrations normales de la mélatonine pendant la grossesse contribuent à la protection contre l'inflammation et les lésions cérébrales et au développement neurologique normal du fœtus en inhibant le stress oxydatif dans le SNC. De plus, comme des niveaux adéquats de mélatonine maintiennent le schéma de sommeil et le rythme circadien normaux, la sécrétion normale de mélatonine peut également déclencher un développement neurologique normal. (Jin et al., 2018)

Plusieurs études montrent des taux faibles de la mélatonine plasmatique chez les sujets TSA (Tordjman et al., 2013). De plus, une autre étude dans laquelle la concentration de 6-sulfatoxymélatonine, un métabolite de la mélatonine, a été mesurée dans l'urine de 60 mères d'enfant atteint des TSA, a montré que ces concentrations sont significativement plus faibles chez les mères des sujets TSA que chez les mères des témoins (Braam et al., 2018).

Les études ont montré que des variations dans les gènes *MTNR1A, MTNR1B, GPR50* et *ASMT* pourraient conduire à diminuer les concentrations de mélatonine ou à changer la fonction de ses récepteurs qui aboutit à sa synthèse en petite quantité chez les sujets atteints de TSA (Rossignol & Frye, 2011; Z. Wu et al., 2020).

La mélatonine a le potentiel d'agir sur une variété de symptômes associés aux TSA mais des études supplémentaires sur son rôle dans l'étiologie des TSA seraient utiles pour confirmer et développer ces résultats.

## 1.6 Comorbidités associées aux TSA

Les comorbidités sont les troubles associés avec un trouble primaire et sont plus observées chez les patients TSA que dans la population générale. Il est important de connaître ces troubles car ils peuvent être des marqueurs de la physiopathologie sous-jacente qui nécessitent une approche thérapeutique plus spécifique. Les comorbidités associées aux TSA sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Comorbidités associées aux TSA.

| **Comorbidité** | **Fréquence et effet** | **Références** |
|---|---|---|
| Déficience intellectuelle | - Elle est fréquente chez les patients TSA.<br>- Caractérisée par un fonctionnement intellectuel inférieur à la moyenne (QI < 70) ainsi que des limitations importantes du fonctionnement adaptatif.<br>- Une coexistence de la déficience intellectuelle et des TSA survient, avec 70 % des patients atteints de TSA présentant également une déficience intellectuelle et 40 % des patients avec une déficience intellectuelle présentant un TSA. | (Bishop et al., 2015; Rujeedawa & Zaman, 2022) |
| Epilepsie | - Un trouble cérébral caractérisé par des changements épisodiques et imprévisibles de l'état mental avec des crises ou des convulsions récurrentes.<br>- 60% des sujets TSA ont un électroencéphalogramme (EEG) anormal par rapport à 6-7% chez les enfants normaux.<br>- 10% à 30% des sujets TSA souffrent d'épilepsie. | (Al-Beltagi, 2021). |
| Syndrome de l'X fragile | - Caractérisé par la perturbation de la connectivité neuronale qui entraînent des symptômes de TSA. | (Devitt et al., 2015). |

| | | |
|---|---|---|
| | - Les enfants atteints à la fois de FXS et de TSA ont des fréquences plus élevées d'anxiété sociale, de déficience intellectuelle, d'hyperexcitation, de comportements répétitifs | |
| Troubles de sommeil | - Surviennent chez 80% des sujets TSA et sont dû à des déséquilibres hormonaux, des troubles gastro-intestinaux, des convulsions, ou à l'effet de certains médicaments utilisés dans le traitement des symptômes autistiques.<br>- La mélatonine joue un rôle important dans la régulation du rythme veille-sommeil. Plusieurs études montrent des taux faibles de la mélatonine plasmatique chez les sujets TSA. | (Al-Beltagi, 2021) (Tordjman et al., 2013) |
| Troubles gastro-intestinaux | - La constipation, la diarrhée, le reflux, la colite, les ulcères et l'intolérance alimentaire surviennent chez 46% à 84% des enfants atteints de TSA.<br>- Les allergies alimentaires représentent 20 à 25 % contre 5 à 8 % dans la population générale.<br>- Les mécanismes causant les troubles gastro-intestinaux comprennent le dysfonctionnement immunitaire, l'inflammation intestinale, la dérégulation et la dysbiose du microbiote.<br>- L'insistance des sujets TSA sur certains aliments conduit à un apport insuffisant en fibres, fluides et autres aliments, participant aux symptômes gastro-intestinaux. | (G. Xu et al., 2018) |
| Les anomalies immunitaires | - 25% d'enfants atteints de TSA présentent des signes de neuroinflammation persistante, de réponses inflammatoires altérées et d'anomalies immunitaires.<br>- Les troubles allergiques, tels que l'asthme, les allergies nasales, les allergies alimentaires et les intolérances, sont significativement plus fréquents chez les sujets atteints de TSA. L'inconfort et la douleur associés aux états allergiques exacerbent les symptômes comportementaux. | (Al-Beltagi, 2021; Gładysz et al., 2018). |

| | | |
|---|---|---|
| Les maladies métaboliques | - Les troubles mitochondriaux, les troubles du métabolisme du folate, des acides aminés et de la créatinine affectent la synthèse et la fonction des protéines.<br>- Les études ont montré une prévalence de 5% des dysfonctionnements mitochondriaux chez les patients TSA.<br>- Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions cellulaires, particulièrement dans le cerveau, puisqu'elles produisent la majeure partie de l'énergie cellulaire. | (Cheng et al., 2017) |
| Syndrome de Down | - Un petit nombre d'enfants atteints de TSA peuvent également avoir le syndrome de Down qui survient dans 1/800 naissances.<br>- Les sujets TSA atteints du syndrome de Down sont plus susceptibles d'avoir des comportements moteurs répétitifs, des troubles de la communication et des compétences sociales, des vocalisations inhabituelles, des problèmes d'attention et du sommeil, des problèmes d'alimentation et une augmentation d'anxiété et d'hyperactivité. | (Dube et al., 2016; Oxelgren et al., 2017). |

## 1.7 Etiologies des TSA

Au cours des dernières décennies, un grand nombre d'études a été mené dans le but d'identifier les facteurs étiologiques des TSA.

De nombreuses études ont montré la forte implication des facteurs génétiques dans les TSA comme par exemple dans les études menées sur les frères et sœurs nés dans des familles avec un sujet TSA. Ces études ont montrés que ces sujets présentent un risque de développer la pathologie des TSA qui est multiplié par 10 (Woodbury-Smith & Scherer, 2018). De plus, l'absence de concordance complète dans les études sur des jumeaux identiques pourrait indiquer l'influence de facteurs de risque environnementaux dans l'étiologie des TSA (Hallmayer et al., 2011). Par conséquent, l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux a été proposée comme un mécanisme principal et important pour l'étiologie des TSA (Sauer et al., 2021).

Par ailleurs, l'épigénétique peut influencer l'apparition des TSA en étant un médiateur dans les interactions entre l'environnement et le génome (Figure 7). Les modifications épigénétiques, provoquées par l'environnement, peuvent modifier l'expression des gènes sans altérer la séquence nucléotidique de l'ADN (Forsberg et al., 2018). Par conséquent, les facteurs environnementaux tels que l'âge parental et le régime alimentaire durant la grossesse ainsi que l'exposition à des agents environnementaux nocifs tels que les toxines peuvent entrainer des modifications dans l'expression ou la régulation des gènes du neuro-développement, ce qui pourrait augmenter le risque des TSA (Forsberg et al., 2018; Tzoumis, 2020).

La mutagenèse est le processus entraînant une mutation génétique qui peut aboutir à une altération de la fonction protéique et des changements phénotypiques. Ces mutations peuvent être soient héritées des parents soient *de novo*. Ces dernières surviennent spontanément et ne se retrouvent que chez l'enfant et non chez ses parents. Dans les TSA, la fréquence augmentée des mutations *de novo* indique l'importance de cette mutagenèse dans la détermination du risque.

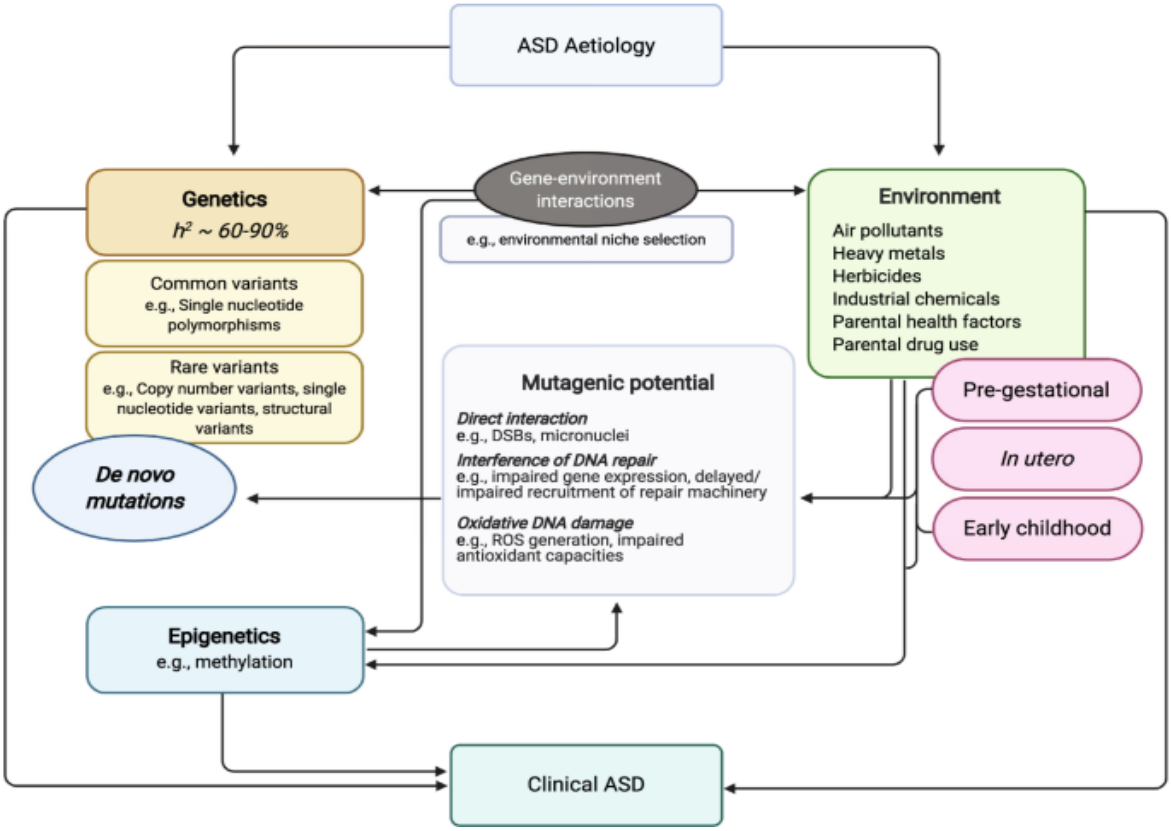



**Figure 7 :** Représentation de l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux dans l'étiologie des TSA. Ces deux groupes de facteurs peuvent influencer indépendamment et réciproquement le développement des TSA. Le potentiel mutagène des facteurs environnementaux suggère que les substances toxiques peuvent jouer un rôle dans le déclenchement de mutations spontanées. Les mutations *de novo* indiquent l'importance de cette mutagenèse dans la détermination du risque des TSA. De plus, l'épigénétique joue le rôle du médiateur dans les interactions entre l'environnement et le génome. Donc, l'expression des gènes sera altérée suite à l'intervention de l'environnement. (Pugsley et al., 2021)

### *1.7.1 Composante environnementale*

Les études ont montré que des événements prénatals, périnatals et postnatals peuvent être associés à un risque augmenté de TSA. Ces facteurs sont susceptibles d'augmenter le risque de l'apparition des TSA lorsqu'ils sont associés à des facteurs génétiques car seuls, ces facteurs ne suffisent pas pour causer les TSA (Cheroni et al., 2020).

#### 1.7.1.1 Facteurs de risque des TSA

##### 1.7.1.1.1 Facteurs prénatals

Durant la grossesse, de nombreux facteurs prénatals ont un rôle dans l'apparition des TSA. Dans ce qui suit, un ensemble de ces facteurs sera présenté.

- Les faibles niveaux économiques, sociaux et éducatifs des parents sont corrélés à un risque élevé des TSA (Kelly et al., 2019). Les familles avec des tels niveaux rencontrent des conditions de vie inappropriée à cause des problèmes financiers et du stress psychologique. De plus, l'inaccessibilité aux soins de santé et l'exposition au stress imposent une tension psychologique sur la mère et augmente la susceptibilité aux TSA.

- L'exposition maternelle au stress durant le deuxième trimestre de la grossesse augmente la vulnérabilité du fœtus à des effets indésirables tels qu'une naissance prématurée et un faible poids de naissance (Schendel & Bhasin, 2008; Talmi et al., 2020). Diverses études ont rapportées une association entre le développement des TSA et l'expérience du stress maternel intense (Beversdorf et al., 2019; Bitar et al., 2020). Egalement, il a été constaté que la sévérité de TSA était significativement augmenté avec de multiples événements stressants parentaux dans la vie (Beversdorf et al., 2018).

- Certaines études suggèrent que les infections virales (rubéole, la grippe) pourraient contribuer à l'augmentation du risque de TSA chez les descendants (Shuid et al., 2021). Cependant, d'autres études n'ont retrouvé aucune association entre les infections maternelles au cours de la grossesse et le risque de TSA (Zerbo et al., 2015). Ces infections pourraient entrainer une activation immunitaire anormale chez la mère et la sécrétion élevée de cytokines affectant le développement du cerveau embryonnaire et augmentant le risque des TSA (Shuid et al., 2021).

- Les déficiences en acide folique, vitamine A, B, C et D durant la grossesse pourraient contribuer à l'augmentation du risque des TSA chez la progéniture (Levine et al., 2018). La carence en folate affecte la méthylation de l'ADN (Žigman et al., 2021). De plus il a été constaté que la supplémentation en acide folique au début de la grossesse

est associée à une amélioration des symptômes associés aux TSA (Hoxha et al., 2021). En outre, il a été montré que la supplémentation en multivitamines avant et pendant la grossesse aide à la diminution du risque des TSA (Levine et al., 2018; Tan et al., 2020). D'autre part, une déficience en vitamine D durant la grossesse est susceptible d'augmenter le risque des TSA en provoquant des dommages oxydatifs de l'ADN au niveau des cellules neuronales qui peuvent être hypothétiquement reverser par la supplémentation en vitamine D (Haq et al., 2019; Magnusson et al., 2016).

- L'utilisation de certains médicaments durant la grossesse est associée à un risque accru de TSA suite à leur capacité de traverser la barrière placentaire et à entraîner la perturbation du développement fœtale (Bastaki et al., 2020). Par exemple, les médicaments antiépileptiques tels que le valproate causent l'augmentation du stress oxydatif et le changement d'expression génétique ce qui cause des altérations dans le développement, les activités motrices et les comportements sociaux (Dufour-Rainfray et al., 2011; Modabbernia et al., 2017). En outre, une relation a été identifié entre la susceptibilité aux TSA et l'utilisation du misoprostol, un médicament analogue aux prostaglandines utilisé pour le traitement des ulcères gastriques et pour des avortements illégaux (Dufour-Rainfray et al., 2011; Ornoy et al., 2016).
- L'exposition à l'alcool peut provoquer des troubles du développement neurologique tels que le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF). Plusieurs études ont rapporté une association entre le SAF et le risque du développement des TSA (Jung et al., 2017; von Ehrenstein et al., 2021). D'autre part, le tabagisme prénatal actif et passif a été associé à un risque élevé de TSA suite à l'exposition du fœtus à des molécules toxiques pour le développement comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux qui entraînent une hypoxie fœtale (Ekblad et al., 2015; von Ehrenstein et al., 2021).

##### 1.7.1.1.2 Facteurs périnatals

Les risques périnatals doivent être aussi pris en compte dans l'étiologie des TSA. Plusieurs complications durant la phase périnatale augmentent la susceptibilité aux TSA, telles que l'accouchement prématuré (<37 semaines) et post terme (>42 semaines) (Agrawal et al., 2018; Bitar et al., 2020). De plus, les saignements maternels pendant la grossesse, la détresse

fœtale, les complications du cordon ombilical telles que le cordon nucal et l'accouchement par césarienne augmentent la susceptibilité aux TSA suite à leur association à l'hypoxie (Gardener et al., 2011; Yong et al., 2021). Le cordon nucal fœtal entraîne une carence en sang et en oxygène ce qui cause le développement anormal du cerveau fœtal menant à des malformations dans le SNC (Karimi et al., 2017; Peesay, 2017).

1.7.1.1.3 Facteurs postnatals

Les facteurs de risque postnatals jouent un rôle dans la susceptibilité aux TSA tels que les infections postnatales et l'ictère néonatal qui peuvent soit entraîner le décès pendant une période sensible postnatale soit entraîner une susceptibilité plus importante pour l'apparition des TSA (Cordero et al., 2020; Tunç et al., 2021). En outre, les infections postnatales comme la méningite, les oreillons, la varicelle, et les otites au cours des premiers jours de vie ont été corrélées à un risque élevé des TSA (Karimi et al., 2017).

De plus des facteurs cités précédemment, la dysbiose microbienne intestinale représente un facteur postnatal pour l'apparition des TSA. Le dysfonctionnement gastro-intestinal est une comorbidité qui a été associée aux TSA (M. Xu et al., 2019). Les symptômes les plus fréquents de ces dysfonctionnements sont : la constipation, la diarrhée et les douleurs abdominales. Il y a peu de temps, une attention considérable a été accordée à l'interaction entre l'intestin et le cerveau dans les TSA. Les études ont mis en évidence que le microbiote intestinal peut influencer le développement du système nerveux par l'intermédiaire d'un axe intestin-cerveau (Mayer et al., 2015; M. Xu et al., 2019).

1.7.1.2 Facteurs de protection contre les TSA

Contrairement aux facteurs de risque précédemment élaborés, certains facteurs semblaient être protecteurs contre les TSA. Les études ont montré qu'un apport en multivitamines en particulier la vitamine B, un régime alimentaire riche en céréales et en acides gras insaturés, une supplémentation en fer pendant la grossesse aident à diminuer le risque des TSA (Haggarty, 2004). Les investigations suggèrent que la supplémentation en acide gras insaturés et en oméga 3 et 6 est cruciale pour le développement rétinien et cérébral car un apport élevé de ces nutriments a été inversement associé au risque des TSA avec diminution de 34% de ce risque en leur présence (Deckelbaum et al., 2006; Lyall et al., 2013). D'autre part, il a été rapporté qu'un apport en acide folique 3 mois avant la grossesse et durant

le premier mois est capable de protéger contre le risque des TSA chez les enfants ayant un des génotypes polymorphes C677T et A1298C du gène *MTHFR* (Hoxha et al., 2021). De plus, il a été constaté que la supplémentation en acide folique au début de la grossesse est associée à une amélioration de la compétence verbale et de l'attention, à une diminution de l'hyperactivité et du retard de langage et particulièrement des TSA chez les descendants (Hoxha et al., 2021; Schmidt et al., 2012).

### *1.7.2 Composante génétique*

#### 1.7.2.1 Arguments épidémiologiques

Les TSA ont une étiologie multifactorielle complexe et les études menées sur les jumeaux ont prouvé une forte contribution génétique. Les études ont montré que le taux de concordance des TSA chez les jumeaux monozygotes est de 70 à 90 %, tandis que chez les jumeaux dizygotes, il est de 5 à10% (Ronald & Hoekstra, 2014; Rosenberg et al., 2009). De plus, une concordance deux fois plus grande entre les frères et sœurs de mêmes parents que chez les demi-frères et sœurs a confirmé l'importance des facteurs génétiques (Constantino et al., 2013). En outre, Sandin et al. 2014, ont révélé que le risque d'un enfant de développer des TSA est 10 fois plus élevé dans la présence d'un frère/sœur atteint et 2 fois plus élevé si l'un des cousins est atteint (Sandin et al., 2014). Chez environ 20% des sujets atteints de TSA, des variations génomiques telles que des anomalies chromosomiques, des variations du nombre de copies d'ADN et des variations mononucléotidiques ont été observées (Alonso-Gonzalez et al., 2018).

D'autre part, les données épidémiologiques ont montré que la consanguinité et la présence de patients atteints de TSA dans la famille et de patients atteints du TDAH dans la famille étaient significativement associés aux TSA (Bitar et al., 2020). De plus, une association a été rapportée entre la présence de TSA, de schizophrénie et des troubles polaires chez les enfants nés des parents consanguins et le risque élevé des TSA (Dahdouh et al., 2016; Xie et al., 2019). De plus, l'exposition maternelle aux antidépresseurs au cours du premier trimestre de grossesse en raison de problèmes psychiatriques (Morales et al., 2018) et l'utilisation d'inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS) avant la conception par le père augmentent fortement le risque des TSA (Fen et al., 2017). Ces études suggèrent que la présence de troubles mentaux et neurologiques chez les parents peut être associée au risque

de TSA. Par ailleurs, l'âge avancé des parents a été repéré comme un facteur de risque important pour les TSA. Plusieurs études ont montré qu'un âge maternel et paternel supérieur à 34 ans est associé à un grand risque de TSA (Lyall et al., 2020). Des études ont rapporté que l'augmentation de l'âge des parents cause diverses anomalies chromosomiques. Cette augmentation peut aboutir à plusieurs troubles neuro-développementaux y compris la schizophrénie, le TDAH, les TSA et le syndrome de Down (Janecka et al., 2017). En plus, il a été prouvé que par l'augmentation de l'âge maternel, la mère sera plus exposée à divers types de toxines environnementales qui provoquent des dommages à l'ADN conduisant à l'apparition de TSA (Lyall et al., 2020).

#### 1.7.2.2 Les anomalies chromosomiques

Le caryotype est la première technique mise au point il y a une cinquantaine d'année pour étudier les anomalies chromosomiques, elle permet la détection des anomalies de grande taille (en général au-dessus de 5 Mbases). Les anomalies chromosomiques peuvent être des anomalies du nombre de chromosome (numériques) ou des anomalies de la structure (structurales).

Dans les anomalies numériques, il manque à un individu l'un des chromosomes d'une paire dans le cas de monosomie, ou il a plus que deux chromosomes dans le cas de trisomie.

Les anomalies structurales signifient que la structure du chromosome a été altérée de plusieurs façons et elles peuvent être constitutionnelles, qui sont présentes dès la naissance, ou acquises, qui apparaissent au cours de la vie. Les anomalies structurales comprennent :

- Les délétions : une partie du chromosome est supprimée.
- Les duplications : une partie du chromosome est dupliquée.
- Les inversions : une partie du chromosome s'est cassée, retournée et recollée.
- Les substitutions : une partie du chromosome est remplacée par une différente partie.
- Les translocations : une partie du chromosome est transférée sur un autre chromosome.

Il a été démontré que, dans certains cas de TSA avec des caractéristiques dysmorphiques, un grand nombre d'anomalies chromosomiques telles que les délétions, les duplications, les inversions et les translocations, a été constaté (figure 8) (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019). L'anomalie chromosomique détectée chez 1 à 3 % des enfants atteints

de TSA est la duplication dans la région 15q11q13, dans laquelle de nombreux gènes jouent des rôles essentiels dans le cerveau, tels que le *GABRA5* et *GABRB3* (récepteurs de GABA), *UBE3A* et *HERC2* (composants du complexe de la voie ubiquitine-protéasome) (Hogart et al., 2010).

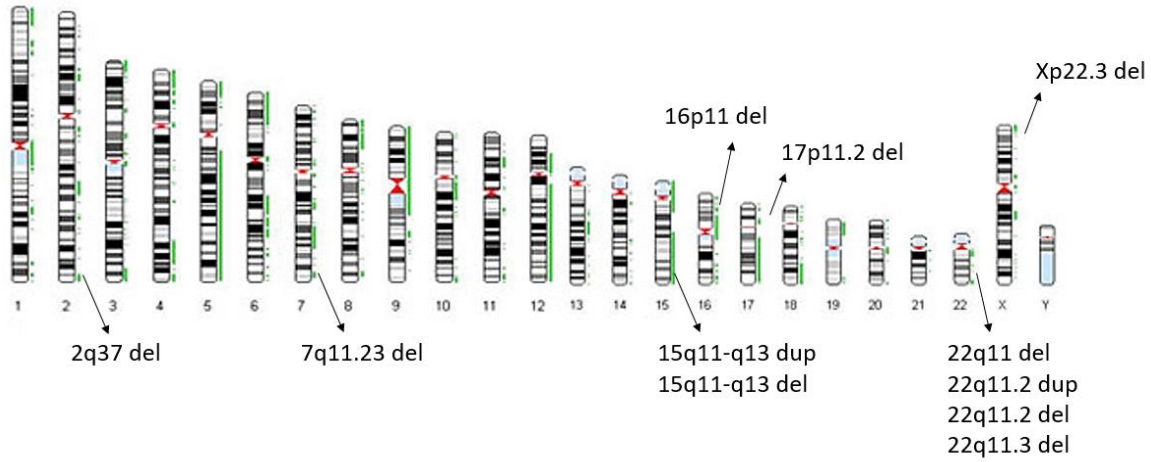



**Figure 8:** Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes décrites dans les TSA. (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019; H. Yoo, 2015)

### 1.7.2.3 Les variations du nombre de copies d'ADN

La technique FISH (fluorescent in situ hybridization) permet la détection des anomalies de petite taille c'est-à-dire de centaines de kilo bases grâce à l'hybridation de sondes fluorescentes. Cette technique reste limitée en raison de l'incapacité de détecter des anomalies de très petites tailles. Par contre, le séquençage à haut débit et la CGH array permettent de détecter les CNVs.

Les CNVs sont les variations de copies d'une région génomique dont la taille varie de 1 kb à plus de 50 kb. Ces variations correspondent à un gain ou une perte du matériel génétique. La technique CGH array permet de détecter des microdélétions et des microduplications chromosomiques trop petites pour être identifiées par la technique du caryotypage. Des études utilisant la technique CGH array ont détectées des CNVs chez 7 à 14 % des patients atteints de TSA, qui étaient invisibles dans l'analyse du caryotype (Roberts et al., 2014; Rosenfeld et al., 2010). La CGH array consiste à co-hybrider un échantillon d'ADN du patient et un autre d'un contrôle. Chacun de ces échantillons est marqué avec un colorant

fluorescent différent, sur une lame contenant des sondes d'ADN qui couvrent le génome humain.

Les CNVs peuvent être classés en récurrents et non récurrents. Les CNVs récurrentes possèdent une taille et des points de rupture communs et sont causées par une recombinaison homologue non allélique (NAHR) entre des répétitions à faible nombre de copies nommées « Low Copy Repeat » (LCR) qui sont des blocs d'ADN ≥ 10 kb. Les CNV non récurrents surviennent généralement par jonction d'extrémités non homologues, ont des tailles variables et leur rupture survient dans des zones du génome non spécifiées.

Les CNVs sont formés par :

- Recombinaison homologue non allélique : crossing over entre les duplications segmentaires. La différence entre les variations obtenues est due à différentes orientations des séquences répétées. Les variations obtenues diffèrent selon l'orientation des séquences et le type de recombinaison (intra-chromosomiques, inter-chromosomiques ou intra-chromatides). (Figure 9)

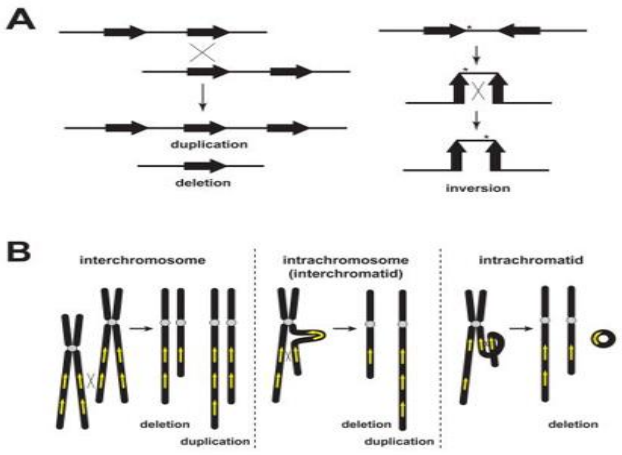



**Figure 9:** Les variations formées par la recombinaison homologue non alléliques. (A) Le crossing over entre des répétitions directement orientées peut aboutir à une délétion et une duplication réciproque ; tandis que le crossing over entre des répétitions inversement orientées peut entraîner une inversion. (B) Cette recombinaison peut produire une délétion ou une duplication de trois manières : croisement entre deux chromosomes (interchromosomique), croisement entre deux chromatides (intrachromosomique) et croisement sur la même chromatide (intrachromatidal).

- Jonction d'extrémité non homologue (NHEJ) : le mécanisme utilisé pour réparer la rupture de l'ADN double brin. Il laisse une cicatrice moléculaire dans les nouvelles jonctions.
- Levée du blocage par changement de matrice (FoSTeS) : mécanisme basé sur la réparation des cassures au niveau du double brin proche de la fourche de réplication. Le brin en élongation s'hybride sur une autre fourche de réplication et selon sa position il y aura une duplication ou une délétion.

Les CNVs rares peuvent être soit héritées, soit *de novo*. Les études ont trouvé un taux élevé de CNVs rares chez les sujets atteints de TSA (Pizzo et al., 2019; Sebat et al., 2007). Les CNVs *de novo* sont identifiés plus fréquemment chez les patients TSA sporadiques que chez les cas ayant un frère ou sœur atteint. L'une des premières études sur les CNVs de *novo* était menée par Sébat et al. (2007) qui ont montré que ces CNVs sont présents chez 10 % des patients issus de familles simplex, chez 3 % des individus issus de familles multiplex, et chez 1 % des témoins (Sebat et al., 2007). Cela suggère que de rares CNV *de novo* peuvent être des facteurs de risque importants pour les TSA. D'autres études ont également rapporté des CNV *de novo* dans 5,8 à 8,4 % des cas TSA sporadiques (Marshall et al., 2008; Sanders et al., 2011). En fait, les CNVs couramment associés aux TSA sont les microdélétions et les microduplications au niveau de la région 16p11.2, identifiées chez environ 1 % des cas de TSA. D'autres CNVs détectés dans les cas de TSA comprennent les régions citées dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Les CNVs couramment associés aux TSA. (Rylaarsdam & Guemez-Gamboa, 2019; Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019)

| Région | Type | Troubles associées |
|---|---|---|
| 1q21.1 | Délétion | Microcéphalie et déficience intellectuelle |
| | Duplication | Macrocéphalie et déficience intellectuelle |
| 2p16.3 | Délétion | Schizophrénie et déficience intellectuelle |

| | | |
|---|---|---|
| 2q37 | Délétion | Déficience intellectuelle |
| 7q11.23 | Délétion | Syndrome de Williams-Beuren, déficience intellectuelle, difficultés d'apprentissage |
| 15q13.3 | Duplication | Schizophrénie, trouble bipolaire |
| 16p11.2 | Duplication | Déficience intellectuelle, schizophrénie et trouble bipolaire |
| | Délétion | Déficience intellectuelle |
| 17p11.2 | Duplication | Syndrome de Smith Magenis |
| 22q11.2 | Duplication | Déficience intellectuelle |
| | Délétion | Déficience intellectuelle, schizophrénie et trouble bipolaire |
| 22q13.3 | Délétion | Syndrome de Phelan-McDermid |

#### 1.7.2.4 Variants mononucléotidiques (SNV)

Les variants mononucléotidiques sont des variations d'un seul nucléotide dans la séquence du génome. Ces variants peuvent être rares ou communs dans une population. Les variants mononucléotidiques sont appelés polymorphismes mononucléotidiques s'ils sont présents dans plus de 1% de la population.

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) notamment le séquençage de l'exome entier (WES) et le séquençage du génome entier (WGS) a fourni une opportunité importante de découvrir les variants rares dans tout le génome des patients atteints de TSA. À ce jour, il existe plusieurs études de séquençage des patients atteints de TSA qui ont été menées en trios, l'enfant atteint et ses deux parents. La plupart de ces études ont trouvé un taux plus élevé de SNV *de novo* et hérité dans les cas de TSA par rapport aux témoins (Doan et al., 2019; O'Roak et al., 2014; Sanders et al., 2012). À partir du NGS, de nombreux gènes candidats des TSA ont été identifiés. Mais les études fonctionnelles supplémentaires doivent continuer à être réalisées pour valider le rôle de beaucoup de ces gènes.

#### 1.7.2.5 Les gènes impliqués dans les TSA

À ce jour, le nombre élevé d'études sur les TSA a conduit à la découverte des gènes avec une confiance élevée d'un rôle causal dans les TSA. La majorité des gènes associés aux TSA est impliquée dans les processus du développement neuronal, de la prolifération cellulaire et la plasticité neuronale. Le tableau 3 montre les principaux gènes impliqués dans les TSA et dont la validation a été effectuée par des approches de validation expérimentale et des méthodes standard de PCR et de séquençage Sanger. (Daghsni et al., 2018; Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019)

**Tableau 3 :** Les principaux gènes impliqués dans les TSA (Daghsni et al., 2018; Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019)

| **Gène** | **Nom** | **Chromosome** | **Fonction** | **Caractéristiques cliniques associées aux TSA** |
|---|---|---|---|---|
| *ANK3* | Ankyrin 3 | 10 | Code une protéine qui se localise dans le segment initial de l'axone et les nœuds de Ranvier et participe au maintien du segment initial et de la polarité neuronale | Déficience intellectuelle, trouble du langage, schizophrénie |
| *CACNA1C* | Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C | 12 | Code une sous-unité de canaux calciques qui sont impliqués dans la mémoire et la transmission rapide des signaux nerveux | Syndrome de Timothy |
| *CHD8* | Chromodomain helicase DNA-binding protein 8 | 14 | Régulation de l'expression des gènes par remodelage de la chromatine. | Macrocéphalie |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *CNTNAP2* | Contactin-associated protein-like 2 | 7 | Impliqué dans les interactions neuronales et gliales et le regroupement des canaux potassiques dans les neurones. | Epilepsie, Pitt-Hopkins syndrome, déficience intellectuelle, troubles de la parole, dysplasie corticale. |
| *CTTNBP2* | Cortactin-binding protein 2 | 7 | Module la mobilité de la cortactine dans les neurones et régule la formation et le maintien de l'épine dendritique. | Symptômes extrapyramidaux |
| *FMR1* | Fragile X mental retardation protein | X | Code une protéine impliquée dans la régulation de la traduction dans les neurones. | Syndrome de l'X fragile, déficience intellectuelle |
| *FOXP1* | Forkhead Box P1 | 3 | Exprimé dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le thalamus durant le développement embryonnaire.<br>Régule la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires | Déficience intellectuelle, trouble du langage |
| *FOXP2* | Forkhead Box P2 | 3 | Exprimé dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le thalamus durant le développement embryonnaire.<br>Régule la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires | Dyspraxie verbale développementale |
| *MECP2* | Methyl-CpG-binding protein 2 | X | Nécessaire pour la maturation des cellules nerveuses. | Syndrome de Rett, déficience intellectuelle |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *NRXN1* | Neurexin 1 | 2 | Se lie aux neuroligines pour former un complexe neurexine/ neuroligine Ca2+ dépendant au niveau des synapses du système nerveux central. | Pitt-Hopkins syndrome, schizophrénie, dysmorphie faciale légère, déficience intellectuelle |
| *NLGN3* | Neuroligin 3 | X | Se lie aux neurexines des synapses glutamatergiques *et d'autres aussi* | Syndrome d'Asperger |
| *NLGN4* | Neuroligin 4 | X | Se lie aux neurexines et localisée au niveau des épines dendritiques | Déficience intellectuelle, syndrome d'Asperger |
| *PTCHD1* | Patched domain containing 1 | X | Code une proteine membranaire dans les neurones GABAergiques et glutamergiques.<br>Exprimé dans le cerveau et dans les tissus cérébraux adultes.<br>Régulation des rythmes du sommeil, de l'attention et traitement sensori-moteur. | Déficience intellectuelle |
| *PTEN* | Phosphatase and tension homolog | 10 | Régulation des événements de transduction du signal dans le cerveau.<br>Régulation négative de la voie de MAPK. | Macrocéphalie, syndrome de Cowden, déficience intellectuelle |
| *SHANK2* | SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2 | 22 | Code une protéine d'échafaudage abondante dans les synapses excitatrices postsynaptiques | Déficience intellectuelle |
| *SHANK3* | SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3 | 22 | Code une protéine d'échafaudage abondante dans les synapses excitatrices postsynaptiques | Schizophrénie, Phelan–McDermid syndrome, deficience intellectuelle, traits |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | dysmorphiques légers, altération de la parole |

1.7.2.6 Les modèles génétiques

La génétique des TSA peut être expliquée par un modèle monogénique autrement dit un modèle Mendélien ou par un modèle polygénique.

1.7.2.6.1 Modèle Mendélien

La transmission monogénique est une maladie génétique due à une mutation dans un seul gène. Environ 5 à 10 % des sujets atteints de TSA ont des maladies monogéniques. Le syndrome de l'X fragile (FXS) est un syndrome diagnostiqué chez environ 1,5 à 3 % des personnes atteintes de TSA. Ce syndrome est causé par des mutations du gène *FMR1* impliquée dans la modification de la transmission et la plasticité synaptiques. Le FXS est la cause monogénique la plus fréquente des TSA (Davis & Broadie, 2017). De plus, des variations dans le gène *MECP2* sont responsables du développement du syndrome de Rett qui est observé chez 1 % de filles atteintes de TSA. D'autres exemples de syndromes monogéniques associés aux TSA comprennent la neurofibromatose de type 1 (gène *NF1*), la dystrophie musculaire de Duchenne (gène *DMD*) et le syndrome de Timothy (gène *CACNA1C*). (Tableau 4) (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019)

**Tableau 4:** Les principales maladies monogéniques chez les sujets atteints de TSA. (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019)

| **Maladie** | **Gene responsable** |
|---|---|
| Syndrome de l'X Fragile | *FMR1* (FMRP translational regulator 1) |
| Syndrome d'Angelman | *UBE3A* (ubiquitin protein ligase E3A) |
| Sclérose tubéreuse | *TSC1* (TSC Complex Subunit 1)<br>*TSC2* (TSC Complex Subunit 2) |
| Syndrome de Rett | *MECP2* (Methyl-CpG Binding Protein 2) |
| Neurofibromatose de type 1 | *NF1* (Neurofibromin 1) |
| Dystrophie musculaire de Duchenne | *DMD* (Dystrophin) |
| Syndrome de Timothy | *CACNA1C* (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C) |

#### 1.7.2.6.2 Pénétrance incomplète et expression variable

La pénétrance incomplète et l'expressivité variable sont observés chez les sujets atteints de TSA (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019). Certaines variations associées aux TSA sont héritées d'un parent non atteint ou peuvent être trouvées dans des populations témoins ce qui montre une pénétrance incomplète de ces variations. D'autre part, les mêmes variations peuvent être détectées chez les sujets TSA et chez d'autres sujets atteints d'autres troubles neuro-développementaux, tels que le retard mental, l'épilepsie, la schizophrénie, le trouble bipolaire et le TDAH, ce qui suggère que le phénotype final des patients dépend de l'interaction d'une variation génétique avec d'autres évènements génétiques ou environnementaux (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019). La variabilité phénotypique des troubles génomiques s'explique premièrement par la différence de la taille des CNV ce qui implique ainsi plusieurs gènes tout en provoquant différents phénotypes. De plus, un variant nucléotidique peut se trouver à proximité immédiate du CNV, ce qui modifie ainsi le schéma d'expression des gènes dans la région du CNV. Une autre cause de pénétrance incomplète des CNV est l'hypothèse double-hit. Les variations secondaires chez un individu pourraient entraîner une différence dans la gravité et la variabilité des caractéristiques cliniques. Il est possible qu'un hit soit suffisant pour provoquer certaines caractéristiques cliniques mais un second hit est responsable d'un phénotype plus sévère (Girirajan & Eichler, 2010).

#### 1.7.2.6.3 Modèle polygénique

Une hypothèse alternative du risque des TSA est le modèle polygénique. Dans le modèle polygénique, l'association de plusieurs variations entraine le développement de la maladie. Deux modèles extrêmes sont proposés dans l'hypothèse polygénique : le modèle des variants communs qui sont trouvés dans plus de 1% de la population générale, et le modèle des variants rares qui sont présents dans moins de 1% de la population générale. Ainsi, quatre modèles polygéniques ont été proposé afin d'expliquer l'origine multigénique des TSA. (Figure 10) (Berg & Geschwind, 2012)

Dans le premier modèle polygénique, il a été proposé que de nombreux variants génétiques communs contribuent aux TSA. Ces variations ont été étudiées par les études d'association

(GWAS) qui ont montré que l'apparition d'une maladie nécessite l'association de plusieurs variants communs.

Le deuxième modèle suppose que le TSA est le résultat de l'apparition d'un seul variant rare parmi les variants communs.

Dans le troisième modèle, il a été supposé que le TSA est le résultat d'une combinaison de plusieurs variants rares et communs.

Selon le quatrième modèle, un variant rare prédispose au trouble, tandis que le second provoque le trouble. Ce modèle est nommé le modèle double-hit qui consiste à associer deux variants rares pour manifester la maladie.

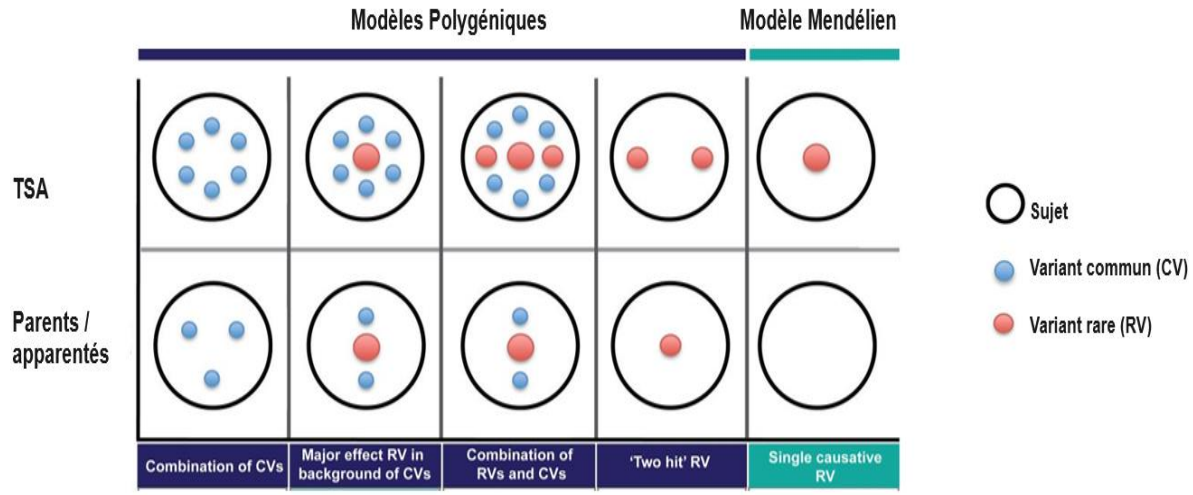



**Figure 10 :** Modèles génétiques de risque de TSA. Des représentations schématiques des modèles mendéliens et polygéniques du risque de TSA sont décrites. Les cercles noirs représentent le type d'individu : ceux qui ont un TSA (première ligne) et les parents non affectés qui présentent des facteurs de risque mais pas suffisants pour manifester la maladies (deuxième ligne). La taille des variants est proportionnelle à leur effet, un symbole plus grand indique un effet accru. (Berg & Geschwind, 2012)

#### 1.7.2.7 Moyens d'identification des gènes candidats

Au cours des dernières décennies, de nombreux variants génétiques ont été identifiés par les études de liaison et d'association génétiques qui étaient parmi les premières techniques utilisés dans le but de l'identification de la base génétique des maladies. Ensuite, le domaine

de la génétique moléculaire a été révolutionné par l'introduction du NGS en 2005 qui a rendu possible le WES et le WGS.

1.7.2.7.1 Etudes de liaison à l'échelle du génome

En pratique, les études de liaison examinent la co-ségrégation des régions chromosomiques avec le phénotype (Feingold, 1998). Ces études exigent des familles avec au moins 2 cas index atteints. Elles nécessitent le génotypage de plusieurs marqueurs de polymorphisme nucléotidique unique (SNP) ou des microsatellites (répétition de motifs composés de 2 à 10 nucléotides) bien caractérisés répartis uniformément sur l'ensemble du génome. Cette co-ségrégation est due à la liaison entre le locus du gène et celui du marqueur et peut être identifiée à l'aide des criblages systématiques de génome. Ainsi, les loci seront dits liés s'ils sont à proximité suffisante sur le même chromosome.

Les études de liaison sont divisées en études paramétriques et non-paramétriques. Les études de liaison paramétriques requièrent la connaissance du mode de transmission de la maladie et sont utilisées pour étudier les maladies monogéniques. Tandis que les études de liaison non-paramétriques ne nécessitent pas la connaissance du mode de transmission et sont basées sur le fait que des apparentés qui se ressemblent au niveau phénotypique, peuvent partager le même segment chromosomique et les mêmes allèles.

En 1988, la première étude de liaison sur des familles ayant au moins deux sujets atteints des TSA a été effectuée. Cette étude a rapporté une liaison entre six régions chromosomiques différentes, et la région 7q en particulier (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998). Ensuite, plusieurs études de liaison ont été réalisés sur des cas de TSA et ont identifiés différentes régions liées tels que : 2q, 4q12-q13.2, 7q22-q34, 8p21.1, 8q13.2, 15q23-q25.3, 20q13 (Fradin et al., 2010; Mpoulimari & Zintzaras, 2022; Werling et al., 2014).

Néanmoins, les études de liaison peuvent avoir une faible puissance pour détecter les gènes impliqués dans les troubles ayant une étiologie complexe où la corrélation entre le génotype et le phénotype est réduite en raison de la possibilité de gènes à faible effet. De plus, l'analyse de liaison est basée sur l'observation que les marqueurs génétiques, qui sont physiquement proches sur le même chromosome, ont tendance à être hérités ensemble ce qui rend difficile son application lorsque plusieurs locus en interaction sont susceptibles d'être impliqués. Donc,

la puissance de l'analyse de liaison est rapidement atténuée à mesure que la complexité génétique sous-jacente augmente. (The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2004)

1.7.2.7.2 Etudes d'association à l'échelle du génome

Les études d'association à l'échelle du génome sont appelées en anglais Genome Wide Association Studies (GWAS). Elles sont conçues pour identifier des associations génétiques avec des maladies en utilisant les marqueurs SNP bi-alléliques (présence ou absence) ou les CNV bi-alléliques ou multi-alléliques (nombre de copies). En d'autres termes, elles visent à identifier les allèles associés à une maladie en comparant la fréquence allélique dans une population atteinte par rapport à une population témoin. Les GWAS s'appuient sur les informations des SNP et sur les modèles de déséquilibre de liaison (LD) à travers le génome. Cependant, la plupart des GWAS ont identifié des SNP conférant de petits effets, qui ne peuvent expliquer qu'une faible proportion de risque de maladie. Ce phénomène est appelé « héritabilité manquante » d'une maladie commune.

Plusieurs études GWAS ont permis d'identifier de nombreux gènes associés aux TSA tels que *RIT2* localisé en 18q12.3, *MACROD2* localisé en 20p12.2, *TRIM33, NRAS, CSDE1* localisés en 1p13.2, *PITX3* localisé en 10q24.32, GORASP2 localisé en 2q31.1, GABBR2 localisé en 9q22.33… (Al-Sarraj et al., 2021; An & Claudianos, 2016; Hu et al., 2011). Cependant, plus il y a des gènes associés aux TSA et de nombreux polymorphismes affectent son hétérogénéité, plus la maladie sera complexe.

1.7.2.7.3 Séquençage des gènes candidats

Avant le NGS, de nombreux tests de diagnostic fonctionnels étaient demandés pour identifier les gènes candidats, qui étaient séquencés un par un. De nos jours, pour faire face au problème de « l'héritabilité manquante », des études de séquençage de variants rares ont été mis en place. Les technologies de NGS permettent une analyse précise de l'exome ou du génome entier des patients afin de détecter les variations nucléotidiques par séquençage d'une grande quantité d'ADN. Le WES est utilisé en routine comme outil pour diagnostiquer de nombreux troubles avec un grand nombre de gènes candidats et un large spectre clinique, tels que les troubles neuro-développementaux (Figure 11).

Avant l'introduction du NGS, le séquençage traditionnel par Sanger a permis d'identifier les premiers gènes candidats des TSA ; les neuroliguines 3 et 4 *(NLGN3* et *NLGN4)* qui appartiennent à la famille des molécules d'adhésion cellulaire et dirigent le maintien et la fonction des synapses. Une étude a montré qu'au niveau de la région Xp22.3, des délétions *de novo* dans le gène *NLGN3* ont été présent chez trois filles avec TSA (Thomas et al., 1999). Ensuite, une mutation faux-sens dans *NLGN3* et une autre dans *NLGN4X* entraînant un décalage du cadre de lecture ont été trouvé dans deux familles ayant chacune un frère atteint de TSA et un autre atteint du syndrome d'Asperger (Jamain et al., 2003).

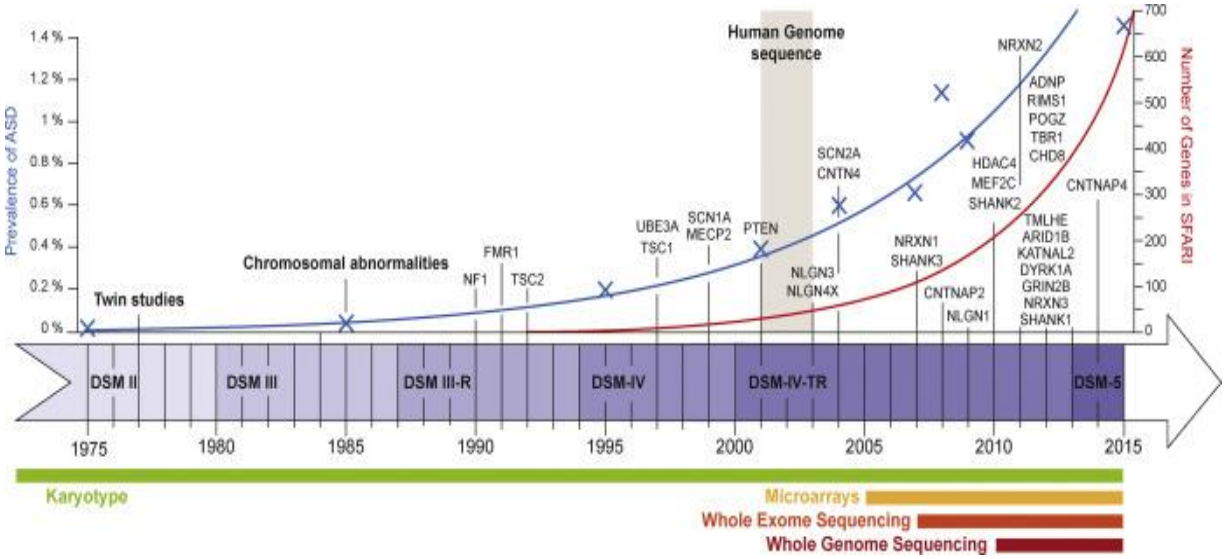



**Figure 11:** Evolution chronologique de la découverte des gènes associés aux TSA. La courbe rouge représente l'augmentation des gènes référencés dans SFARI et la courbe bleue représente l'estimation de la prévalence des TSA d'après le centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC). Les différentes versions du DSM (du DSM-II au DSM-V) sont présentées par la frise chronologique et au-dessous les outils de détection du génome sont présentés. (Bourgeron, 2016)

## 1.8 Le séquençage à haut débit d'Exome

### *1.8.1 Description*

Depuis l'introduction du NGS en 2005, et en particulier le WES, le domaine de la génétique moléculaire a été révolutionné. Le WES capture et séquence seulement les exons qui constituent la partie du génome qui code les protéines (Rodenburg, 2018).

L'application de WES a permis de découvrir de nouveaux gènes et des mutations pathogènes dans plusieurs disciplines. La première étude d'exome dans les TSA a été réalisée par O'Roak et.al en 2011 sur 20 sujets avec TSA et a permis la découverte de quatre mutations *de novo* dans les gènes *FOXP1, GRIN2B, SCN1A* et *LAMC3* (O'Roak, Vives, Girirajan, et al., 2012). De plus, au fil des années, des mutations exoniques de novo dans les gènes exprimés dans le cerveau ont été identifiées chez environ 5 à 14 % des personnes atteintes de TSA idiopathique (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019).

Les résultats les plus fréquemment issus du WES sont :

- La détection d'un variant connu dans un gène pathogène connu avec un phénotype correspondant.
- La détection d'un variant inconnu dans un gène pathogène connu avec un phénotype correspondant.
- La détection d'un variant connu dans un gène pathogène connu avec un phénotype non correspondant.
- La détection d'un variant inconnu dans un gène pathogène connu avec un phénotype non correspondant.
- La détection d'un variant inconnu dans un gène qui n'était pas précédemment associé à une maladie.

### *1.8.2 Procédé du WES*

Le WES se fait en plusieurs étapes :

1. Extraction d'ADN : la première étape du WES implique l'extraction d'ADN génomique de haute qualité à partir d'échantillons biologiques, le plus souvent extrait du sang.
2. Préparation de la librairie d'exome : pour la préparation de la librairie, Agilent, Illumina et NimbleGen sont plus couramment utilisés pour capturer l'exome. Le processus de capture se fait en trois étapes :

- La fragmentation de l'ADN : l'ADN est fragmenté d'une façon aléatoire, soit mécaniquement par des méthodes d'ultrasonication, soit biologiquement par digestion enzymatique.
- La ligature de l'adaptateur : les extrémités des fragments sont réparées et ensuite ligaturées avec des adaptateurs.
- L'enrichissement de la cible : l'enrichissement ciblé des régions exoniques d'intérêt se fait après la préparation de la librairie. Par contre, les séquences non ciblées sont emportées et les fragments hybrides sont élués et la librairie sera amplifiée. Cette étape se fait en utilisant la technologie Illumina ou Thermo Fisher. Dans le cas de la technologie Illumina, l'enrichissement se fait en capturant des séquences et par suite en utilisant des sondes spécifiques et complémentaires aux séquences cibles dans le but de s'hybrider et retenir ces séquences. Par contre, avec Thermo Fisher, l'enrichissement se fait par la PCR multiplex en utilisant des amorces pour amplifier les régions cibles. (Vickers & Gibson, 2019)

3. Séquençage de l'exome : après l'enrichissement, la librairie doit être soumise à un séquençage à haut débit pour produire des millions de lectures de séquence d'intérêt nommé « sequence reads ». Ces séquences doivent ensuite être filtrées pour laisser seulement les séquences ayant une bonne qualité. Ensuite les séquences qui restent seront alignées avec une séquence de référence du génome humain. Après l'alignement, des outils in silico sont utilisés dans l'appel de variants nommé « variant calling ». Le GATK est l'un des algorithmes de découverte des SNVs les plus utilisés, qui utilisent le principe de détection bayésienne. Ensuite, les fichiers VCF, contenant l'annotation des variants, sont générés. Dans ces fichiers, plusieurs informations sont attribuées à chaque variant telles que le nom du gène, la location cytogénétique, la fréquence allélique, les scores de pathogénicité ... L'annotation des variants fournit les informations essentielles requises pour l'analyse et l'interprétation. Elle peut être effectuée par un outil couramment utilisé qui est ANNOVAR. La dernière étape implique un processus de filtrage pour l'identification des gènes responsables.

*1.8.3 Analyse des données et filtrage des variants*

L'analyse des données issues du séquençage de l'exome sont analysées soit en solo soit en trio. Dans le séquençage d'exome en solo, l'ADN du patient est uniquement séquencé. La mode de transmission des variants n'est pas prise en compte dans cette analyse. Tandis que le séquençage en trio permet de séquencer l'ADN du patient et celui des deux parents (Carvill & Mefford, 2015) ce qui permet de rechercher les variations *de novo* qui sont présents chez le patient mais absents chez les parents. L'analyse en trio a été adapté en 2010 pour la première fois et a abouti à l'identification de 6 variants *de novo* dans la déficience intellectuelle (Vissers et al., 2010). Ce type d'analyse permet aussi d'identifier des variations autosomiques récessifs et liée à l'X.

Les données issues du WES génèrent environ 50 000 variants par individu, ce qui nécessite des méthodes de filtrage pour réduire le nombre et garder seulement les variants candidats. Les méthodes de filtrage sont expliquées ci-dessous :

Premièrement, le nombre des variants sera réduit par la suppression des variants de mauvaise qualité par le contrôle de la qualité (QC). De plus, une profondeur de lecture suffisante (> 20) est nécessaire pour la sensibilité et la spécificité des variants.

Ensuite, seuls les variants dont la fréquence dans les bases de données tels que GnomAD et DGV est inférieure à 1%, sont conservés pour différencier les variants rares des polymorphismes. Malgré le choix de cette valeur, on ne peut pas supposer que des variants fréquents ne peuvent pas contribuer à l'étiologie d'une maladie. De plus, la combinaison de variants fréquents à faible effet et de variants rares peut aboutir au phénotype de la maladie. (Bomba et al., 2017)

Puis, les variants seront divisés et regroupés selon le mode de transmission. Les variants hétérozygotes sont recherchés dans le cas d'une transmission dominante et les variants homozygotes dans le cas d'une transmission récessive (Bruel et al., 2020).

Ensuite, la nature des variants est évaluée. Les variants synonymes et les variants bénins sont les variations qui ne provoquent pas de changement d'acide aminé.

Les variants de décalage de cadre (frameshift), de faux-sens dommageable (damaging missense) et de site d'épissage canonique (canonical splice site variants) sont considérées

comme les plus susceptibles de perturber la fonction des gènes. La pathogénicité des variants peut être prédite à l'aide d'outils informatiques tels que SIFT (Sorting Intolerant Form Tolerant), Polyphen2, GERP (Genomic Evolutionary Rate Profiling) et CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) (Bruel et al., 2020). Les SNV faux-sens dommageables ont été définis comme ceux ayant une prédiction délétère dans l'un des outils cités.

Les variants restants peuvent être soumis à une analyse supplémentaire pour leur implication dans certaines pathologies. Cette étape se fait à l'aide des bases de données qui regroupent diverses variations retrouvées chez des sujets atteints d'une telle pathologie. Nous citons quelques bases de données : Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), PubMed, Decipher, Human Gene Mutation Database (HGMD), Gene cards et ClinVar. Dans le cas des études sur les TSA, des bases de données supplémentaires sont utilisées dans cette étape en plus de celles précédemment citées telles que : SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative) et Autism KB (Autism KnowledgeBase).

Les variants prioritaires sont regroupés selon les directives de l'ACMG (Richards et al., 2015) sur la pathogénicité et notés selon leurs critères : variant pathogène, variant probablement pathogène, variant de signification incertaine, variant probablement bénin et variant bénin.

Les variants qui ont été trouvé cliniquement significatifs doivent être confirmés par le séquençage Sanger (Vickers & Gibson, 2019).

### *1.8.4 Avantages et points faibles du WES*

Le WES permet de séquencer toute la partie codante du génome en une seule expérience. En séquençant l'exome, on obtient plus d'informations génétiques avec une bonne qualité et efficacité en termes de temps. Egalement, la réduction des coûts et la procédure de collecte d'échantillons relativement simple constituent deux principaux avantages du WES. (Goh & Choi, 2012)

Cependant, comme la plupart des méthodes, le WES a aussi ses limites, notamment la profondeur de couverture n'est pas à 100% et pas uniforme dans toutes les régions de l'exome (Goh & Choi, 2012). En conséquent, les variants pathogènes de ces exons manqués ne seront pas détectées. Cela peut se produire en raison de biais dans les processus de capture, de séquençage et d'alignement. Le processus de capture peut être biaisé par les différences de

contenu en GC. De plus, l'alignement de séquences peut également être biaisé et peut mal fonctionner dans la discrimination des séquences hautement homologues ou répétées. En outre, le plus grand défi est l'interprétation des données car le WES génère une énorme quantité de variants par individu. Mais comme la technologie de la génération rapide de données a augmenté, les stratégies analytiques pour classer rapidement les variants pathogènes par rapport aux variants bénins se multiplient. (Burdick et al., 2020; Topper et al., 2011)

En raison de ces limitations, des tests supplémentaires sont toujours exigés afin de capturer les régions manquées et de confirmer les variants détectés. Par exemple, des études fonctionnelles sont ensuite menées afin de valider une pathogénicité donnée. (Rodenburg, 2018)

## 1.9 Les gènes impliqués dans les voies biologiques des TSA

Plusieurs études ont montré que les sujets atteints de TSA présentent des perturbations dans les processus biologiques et métaboliques de base.

### *1.9.1 La synapse chimique*

Au niveau des synapses chimiques, ils existent des synapses excitatrices dites glutamergiques et des synapses inhibitrices dites GABAergiques. Plusieurs variations dans des gènes au niveau des synapses ont été rapportées. Ces gènes codent des protéines qui participent dans la transcription synaptique en affectant la formation des synapses, la transmission synaptique et la plasticité (Guang et al., 2018).

- *NRXN* : famille de protéines transmembranaires présynaptiques. Plusieurs études ont montré que des mutations dans le gène *NRXN1* sont présents chez des sujets atteints de TSA (Cameli et al., 2021; Y. Liu et al., 2021, p. 1; Tromp et al., 2021). En outre, des variations beaucoup plus rares dans les gènes homologues *NRXN2* et *NRXN3* ont été associées aux TSA (Yuan et al., 2018).
- *NLGN* : une classe de molécules d'adhésion cellulaire sur les membranes postsynaptiques. Des mutations dans *NLGN3* et *NLGN4* ont été trouvées chez des sujets TSA. Ces gènes codent des protéines membranaires qui ont un rôle important dans la formation et le développement des synapses. (Maxeiner et al., 2020; Quartier et al., 2019)

- *SHANK* : codent des protéines intracellulaires d'échafaudage dans les synapses excitatrices qui avec autres protéines synaptiques participent à la formation des synapses, au trafic des récepteurs glutamique et à la signalisation neuronale (Monteiro & Feng, 2017). Des mutations de *SHANK3* ont été identifiées chez des sujets atteints de TSA. Les variations dans le gène *SHANK3* sont plus fréquentes que dans *SHANK1 et SHANK2.* (Vyas et al., 2021)
- *FMR1* : code la protéine fragile X mental retardation (FMRP) qui est un suppresseur de la traduction de l'ARNm et qui est impliquée dans la liaison de l'ARN et des protéines afin de moduler la transmission et la plasticité synaptiques. Le syndrome de l'X fragile, provoqué par la perte de FMRP, est le cause monogénique la plus courante de TSA. (Davis & Broadie, 2017)
- *MECP2* : code pour une protéine nucléaire qui se lie à l'ADN méthylé entraînant une répression transcriptionelle globale, des mutations de ce gènes du chromosome X sont létales chez les garçons et entrainent le syndrome de Rett chez les filles. Des duplications du *MECP2* sont responsables du développement du syndrome de duplication de MECP2 qui est un trouble neuro-développemental se manifestant par un retard du développement moteur, de l'épilepsie, de l'anxiété et des symptômes de type autistique (Guang et al., 2018) .

### *1.9.2 La voie de signalisation Wnt*

La voie de signalisation Wnt intervient dans la différentiation et la prolifération cellulaire. De plus, cette voie participe dans des processus du neuro-développement tels que la migration neuronale, la neurogenèse, la synaptogenèse, le développement des dendrites et la plasticité neuronale (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015; Bielen & Houart, 2014; Inestrosa & Varela-Nallar, 2015). En fait, une perturbation dans la voie de signalisation Wnt a été signalée dans plusieurs troubles neuro-développementaux tels que les TSA, la schizophrénie et la déficience intellectuelle (Gazestani et al., 2019; Kwan, Unda, et al., 2016; Oron & Elliott, 2017). Il existe deux voies de signalisation Wnt : la voie canonique qui est dépendante de la β-caténine, ainsi que la voie non canonique qui est indépendante de la β-caténine. De nombreuses mutations génétiques rapportées chez les patients atteints de TSA sont impliquées dans une des deux voies (Kumar et al., 2019).

1. La voie canonique
   - *WNT* : des mutations rares dans les *WNT1, 2, 3* et *9B* ont été associées aux TSA. Notamment, les mutations du *WNT1* (Martin et al., 2013) et *WNT3* (Chow et al., 2012) conduisent à une sur activation de la signalisation Wnt dans le cortex préfrontal.
   - *APC* : des mutations du gène inactivant l'APC, un suppresseur de tumeur, ont été rapporté chez des sujets TSA (Cruz-Correa et al., 2020). Des souris avec un *APC* knockout conditionnel présentent des problèmes de la mémoire, de l'apprentissage et du comportements (Mohn et al., 2014).
   - *CTNNB1* : des mutations *de novo* du *CTNNB1* ont été rapporté chez des sujets atteints de TSA avec des troubles moteurs et de parole et une déficience intellectuelle (Krumm et al., 2014; Kuechler et al., 2015). En plus, l'haplo insuffisance *CTNNB1* a été lié à une perte neuronale, des anomalies cranio-faciales et des anomalies du follicule pileux (Dubruc et al., 2014).
   - *TCF7L2* : des mutations *de novo* avec perte de fonction ont été signalées chez des patients TSA (De Rubeis et al., 2014). Il a été constaté que chez la souris, Tcf7l2 est nécessaire pour la formation de projections axonales thalamo-corticales, ce qui suggère que des projections anormales peuvent aboutir aux TSA (Lee et al., 2017).
   - *ANK3* : des études de séquençage chez des sujets atteints de TSA ont rapportées des mutations au niveau du gène *ANK3* (Bi et al., 2012, p. 3; Shi et al., 2013). Ce gène code pour une protéine qui se localise dans le segment initial de l'axone et les nœuds de Ranvier et participe dans le maintien du segment initial et de la polarité neuronale.
   - *CHD8* : des mutations perte de fonction hétérozygotes conduisent à une macrocéphalie, des anomalies cranio-faciales et des déficits dans le comportement chez la souris (Platt et al., 2017).
   - *DIXDC1* : des mutations rares et faux sens dans le gène *DIXDC1*, identifiées chez des sujets atteints de TSA, empêchent la phosphorylation de l'isoforme 1 du *DIXDC1*, ce qui aboutit à une altération de la croissance des dendrites. Il a été montré que ce gène régule le développement des dendrites, des neurones

excitateurs et la fonction synaptique dans le cortex (Kwan, Meka, et al., 2016, p. 1).

- *PGE2* : code l'enzyme prostaglandine E synthase associée à la membrane, qui catalyse la conversion de la prostaglandine H2 en prostaglandine E2 (PGE2) qui a été liée aux TSA. PGE2 peut modifier l'expression des gènes régulés par la signalisation Wnt et elle a été précédemment associée aux troubles neuro-développementaux (Wong et al., 2016).

2. La voie non canonique
    - *PRICKLE2* : des mutations rares hétérozygotes et non synonymes ont été rapporté dans des sujets TSA. Il a été constaté que les souris déficientes en Prickle2 présentent des anomalies au niveau des interactions sociales, du comportement et de l'apprentissage (Sowers et al., 2013).

*1.9.3 La voie de l'ubiquitinylation/protéasome*

Le système d'ubiquitine est parmi les processus cellulaires affectés dans les TSA. L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle par laquelle une molécule d'ubiquitine s'attache à un substrat pour influencer différentes fonctions des protéines. Plusieurs gènes liés à la voie de l'ubiquitine sont impliqués dans les TSA.

- *UBE3A* : code une enzyme E3 ligase qui régule la signalisation Wnt. Une mutation dans ce gène, liée aux TSA, perturbe cette signalisation. Un dysfonctionnement de ce gène a été lié aux TSA et au syndrome d'Angelman. (Yi et al., 2017)
- *USP7* : code une enzyme proteolytique qui est capable de cliver des liaisons de la chaine d'ubiquitine. Elle joue un rôle dans la transcription, la réparation de l'ADN, la réponse immunitaire et le cancer. Au niveau de ce gène, des variations ont été identifiées chez des personnes avec déficience intellectuelle et TSA (Fountain et al., 2019). Il a été montré que *USP7* fonctionne dans la voie de recyclage des protéines endosomales via son incorporation dans le complexe MAGEL2-USP7-TRIM27 (Hao et al., 2015).
- *MAGEL2* : code un activateur d'ubiquitine ligase importante pour le recyclage des protéines endosomales. Des mutations au niveau du gène *MAGEL2*, ont été

observées chez des patients TSA, des syndrome Prader-Willi et Schaaf-Yang (Sanderson et al., 2021).

- *PARK2* : code pour un composant du complexe multi-protéique E3 ubiquitine ligase qui joue un rôle dans la dégradation protéasomique. Il a été montré que *PARK2* est associé à la maladie de Parkinson (Ming et al., 2020), à la schizophrénie (Jarick et al., 2014), au TDAH (Jarick et al., 2014) et aux TSA (Bacchelli et al., 2020).

*1.9.4 La voie de remodelage de la chromatine*

Les gènes régulateurs de la chromatine sont parmi les gènes les plus souvent mutés chez les sujets TSA. Ces gènes contrôlent la production des protéines indispensable au développement des circuits neuronaux et à la transmission des impulsions électriques dans le cerveau. Plusieurs gènes, comme *SMARCC1, SMARCC2, ARID1A, ARID1B et ATRX,* qui codent des composants des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF, présentent de rares mutations chez les patients (O'Roak, Vives, Girirajan, et al., 2012). De plus, plusieurs études sur les TSA ont montré des mutations rares dans les gènes codant la *CHD8,* hélicases de la chromatine dépendantes de l'ATP, avec des variantes trouvées dans les membres de la famille *CHD1*, *CHD3* et *CHD7* (Hoffmann & Spengler, 2021; Neale et al., 2012).

*1.9.5 Les altérations du métabolisme*

Le métabolisme est le processus par lequel les organismes convertissent les nutriments en énergie. Dans les troubles métaboliques, les voies biochimiques, qui sont des séquences spécifiques de réactions chimiques, sont perturbées. Ces troubles sont généralement causés par des mutations dans des enzymes spécifiques. Si ce processus est perturbé, les aliments s'accumulent, en causant une toxicité, ce qui affectera le fonctionnement normal de nombreux organes, y compris le cerveau. De nombreuses études ont rapporté que les TSA peuvent être associés à des erreurs du métabolisme (Glinton & Elsea, 2019; Žigman et al., 2021), telles que :

- Le métabolisme des acides aminés : la phénylcétonurie (PCU) s'accompagne d'une concentration élevée de phénylalanine dans le sang et de niveaux toxiques dans le SNC. Elle est causée par une variation dans le gène de la phénylalanine hydroxylase *PAH* qui métabolise la phénylalanine en tyrosine. La PCU s'accompagne d'une

déficience intellectuelle, et peut également être associée à des symptômes autistiques, des convulsions et des déficits moteurs (Žigman et al., 2021).

- Le déficit en cystathionine β-synthase (CBS), connu sous le nom d'homocystinurie (HCU), empêche la conversion de l'homocystéine en cystathionine, entraînant une augmentation de l'homocystéine. Les sujets atteints d'HCU peuvent avoir des troubles du SNC, y compris les symptômes de TSA (Kiykim et al., 2016).

- Le métabolisme de la créatine : la créatine est un intermédiaire énergétique dans le muscle. Des mutations du gène *SLC6A8* (Solute Carrier Family 6 Member 8) ainsi que les déficiences de deux enzymes l'arginine-glycine amidinotransférase (AGAT) et la guanidinoacétate méthyltransférase (GAMT) conduisent au syndrome de déficit cérébral en créatine (CCDS) entraînant une déplétion de la créatine dans le cerveau. Les manifestations cliniques de ce syndrome regroupent les TSA, l'épilepsie et le dysfonction motrice (Farr et al., 2020). Les études ont montré que la perturbation du métabolisme de la créatine joue un rôle dans la neurobiologie des TSA (Schulze et al., 2016).

- Le métabolisme du cholestérol : le cholestérol est essentiel à la croissance des membranes de myéline et au développement embryonnaire normal. Un déficit en cholestérol peut perturber ces mécanismes en favorisant le développement des TSA, comme observé dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) qui est causé par des mutations du gène *DHCR7* (7-Dehydrocholesterol Reductase). Le SLOS se caractérise par une élévation du 7-déhydrocholestérol et un faible taux de cholestérol plasmatique. Une carence en cholestérol entraîne la formation anormale du SNC, du visage et des membres (X. Li et al., 2021). Une supplémentation en cholestérol pour des enfants atteints de SLOS avec des critères de TSA a amélioré les symptômes autistiques (Donoghue et al., 2018).

- Le métabolisme mitochondrial : les mitochondries participent dans la production d'énergie cellulaire, ceci influençent la différenciation neuronale et la synaptogenèse. Les perturbations mitochondriales entraînent des dysfonctionnements immunitaires chroniques et une augmentation du stress oxydatif qui ont été observés chez les sujets

atteints de TSA (Hollis et al., 2017; Žigman et al., 2021). De plus, les études ont rapporté chez les sujets TSA, des variations au niveau du gène *IMMP2L* (Inner Mitochondrial Membrane Peptidase Subunit 2) codant une protéine de type protéase de la membrane mitochondriale interne (Rose et al., 2018).

- Le métabolisme des purines et des pyrimidines : le déficit en adénylosuccinate lyase (ADSL) est un trouble du métabolisme des purines qui réduit leur synthèse et recyclage. Des anomalies du comportement et des TSA peuvent se manifester (Žigman et al., 2021). Dans les formes sévères, des symptômes neurologiques tels qu'une encéphalopathie aiguë et chronique peut être observée. Un déficit dans l'enzyme adénosine désaminase, importante pour le fonctionnement du système immunitaire et la régulation de la dopamine et la sérotonine, a été observé chez des sujets TSA (Garcia-Gil et al., 2021). D'autre part, les données ont montré qu'un déficit au niveau de la dihydropyrimidine déshydrogénase et la dihydropyrimidinase est observé chez des patients TSA (Žigman et al., 2021).

- Le cycle de l'urée : une voie métabolique qui sert à éliminer l'excès d'azote, principalement sous forme d'ammoniac. Un excès d'ammoniac peut entraîner des conséquences mortelles et peut traverser la barrière hémato-encéphalique et pénétrer dans le SNC (Matsumoto et al., 2019). Plusieurs mutations dans des gènes nécessaires à la production des enzymes du cycle de l'urée provoquent sa perturbation telles que: le déficit en ornithine transcarbamylase (OTC) (gène locus Xp21.1), le déficit en carbamyl phosphate synthétase (2q35) et le déficit en N-acétylglutamate synthétase (17q21.3) (A. Liu et al., 2019).
- Le métabolisme des folates : le déficit cérébral en folate (CFD) est la condition dans laquelle la concentration de méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) est faible tandis que les concentrations plasmatiques de folate restent normales. Plusieurs symptômes sont caractéristiques de cette déficience tels que les troubles du sommeil, les convulsions sévères, les TSA, et l'ataxie progressive. De plus, le déficit en méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) est la cause la plus fréquente d'hyperhomocystéinémie car le MTHFR joue un rôle important dans la conversion de l'homocystéine en méthionine. Il existe deux polymorphismes courants du gène

*MTHFR* : le 677C > T et le 1298A> C. Le dernier n'entraîne une élévation des taux d'homocystéine que s'il est combiné avec 677C>T. Les résultats d'une étude utilisant une souris Mthfr hétérozygote knock-out (KO) montrent la contribution du polymorphisme 677C>T dans le développement des comportements de type autistique chez les souris (Sadigurschi & Golan, 2019).

- Le métabolisme de l'acide γ-aminobutyrique : le déficit en succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH-D) est une maladie génétique causée par une perturbation du métabolisme de l'acide γ-amino butyrique (GABA) qui catalyse la conversion de GABA en acide succinique. Le SSADH-D est très hétérogène car il est associé à des symptômes autistiques, au retard mental, à l'hypotonie, à l'ataxie, à l'épilepsie et à un retard dans le développement de la parole (Žigman et al., 2021).

# CHAPITRE 2

# METHODES ET RESULTATS

## 2.1 Etude épidémiologique : Identification de facteurs de risque et de protection des TSA au Liban.

### *2.1.1 Présentation de l'étude*

Considérant que les facteurs environnementaux des TSA ne sont pas entièrement élucidés, et que la plupart des études ont été effectuées dans les pays occidentaux ou en Amérique du Nord, notre étude qui a été menée auprès de la population Libanaise a été concentrée sur l'identification des facteurs de risque et de protection qui peuvent aider à mieux comprendre ces troubles et mener à des stratégies d'atténuation des risques. Cette étude a été donc menée afin d'identifier les facteurs prénataux, postnataux, et familiaux qui peuvent soit augmenter le risque des TSA soit le diminuer.

L'étude a été conforme aux normes et directives éthiques de la Déclaration d'Helsinki en 1964 et de ses modifications ultérieures. Le comité d'éthique de l'Université Saint Esprit de Kaslik a examiné et approuvé le protocole d'étude (livré en 2014 et renouvelé en 2018). Notre équipe de recherche a contacté des organisations spécialisées travaillant avec des patients atteints de TSA pour expliquer les objectifs de l'étude. Les parents qui ont accepté de participer ont signé un consentement éclairé et ont rempli un questionnaire rétrospectif couvrant les facteurs démographiques, prénataux et postnataux, sous la supervision d'un membre de l'équipe. Simultanément, la même procédure utilisée pour le recrutement des patients a été utilisée pour recruter le groupe témoin. C'est la deuxième étude épidémiologique menée par notre équipe (Bitar et al., 2020). L'étude précédente était complétée à travers la présente étude par un agrandissement de l'échantillon et l'élaboration d'une enquête plus détaillée portant sur l'historique clinique des parents et des participants et leur régime alimentaire. Dans cette étude, on a recruté 100 patients TSA et 100 contrôles par rapport à 64 patients TSA et 67 contrôles dans l'étude précédente. Notre questionnaire était divisé en trois parties. La première partie concerne les parents, la deuxième concerne le statut de la mère durant la grossesse et la dernière concerne le participant (Annexe 1). Par la suite, les 100 patients atteints de TSA et

les 100 sujets sains ont été recrutés de toutes les régions Libanaises. Les données issues des questionnaires ont été analysées sur le logiciel SPSS 23.0. L'analyse bivariée des données a été réalisée par le test T pour les variables quantitatives et par le test de Chi-2 pour les variables qualitatives. De plus, les variables révélant une valeur $p$ <0,05 ont été utilisés pour l'analyse multivariée.

Nos résultats ont montré que le stress pendant la grossesse (OR = 6,339; IC à 95% [2,845–14,125]), la présence de patients atteints de TSA dans la famille (OR = 7,878; IC à 95% [1,877–33,065]) et de patients atteints du TDAH trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention dans la famille (OR = 6,981; IC à 95% [1,362–35,789]) étaient significativement associés aux TSA. D'autre part, un apport en multivitamines en particulier oméga 3 et vitamine B (OR= 0,257; à 95% ; IC [0,115–0,579]), un régime riche en céréales (OR = 0,212; IC à 95% [0,089–0,510]) et une supplémentation en fer durant la grossesse (OR = 0,229; IC à 95% [0,083-0,627]) ont été identifiées comme des facteurs de protection contre les TSA.

Le stress prénatal est bien connu pour affecter le développement du fœtus. Il a été lié à plusieurs résultats neurocomportementaux indésirables, qui peuvent partager une physiopathologie commune avec les TSA (J. Li et al., 2009). Des études ont suggéré que l'exposition au stress maternel peut être un facteur important dans les TSA (Beversdorf et al., 2018; Bitar et al., 2020). Ensuite, le rôle de la génétique dans les TSA a été soutenu par le fait que l'histoire de TSA et de TDAH dans la famille constitue un facteur de risque. Ce résultat est concordant avec les conclusions des deux études Libanaises montrant que la présence des antécédents familiaux avec TSA est significativement associée à l'apparition du trouble chez les descendants (Bitar et al., 2020; Chaaya et al., 2016). D'autre part, la nutrition maternelle prénatale influence le développement neurologique du fœtus et pourrait augmenter le risque de TSA. Cependant, les résultats des études précédentes ont suggéré que l'apport maternel en multivitamines peut réduire la récurrence des TSA. (Levine et al., 2018). Des études cas-témoins ont rapporté des risques réduits de TSA avec une supplémentation prénatale en acide folique. À l'inverse, une autre étude n'a rapporté aucune association entre la supplémentation précoce en acide folique ou en multivitamines et le risque de TSA (Virk et al., 2016). De plus, le fer est essentiel pour le fonctionnement neuronal (Wiegersma et al., 2019). Il est difficile de clarifier le rôle potentiel des suppléments nutritionnels, étant donné la difficulté de

quantifier et d'identifier précisément les apports nutritionnels, et que le développement des TSA diffère par la présence d'autres facteurs de risque.

L'identification de ces facteurs de risque et de protection associés aux TSA nous aidera à comprendre sa prévalence et à constituer des importantes mesures préventives. Etant donné que notre étude n'est pas expérimentale et ne prouve pas la causalité, des recherches plus rigoureuses avec un grand nombre d'échantillons devraient être menées pour identifier le moment de l'exposition aux facteurs environnementaux et sa relation avec les phases critiques du développement.

Les résultats de notre étude épidémiologique ont fait l'objet d'une publication dans le journal intitulé *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Facteur d'impact 3.390 ; Rang Q2).

### *2.1.2 Article 1: Risk and protective factors in Autism Spectrum Disorders: a case control study in the Lebanese population.*

International Journal of *Environmental Research and Public Health*

MDPI

*Article*

# Risk and Protective Factors in Autism Spectrum Disorders: A Case Control Study in the Lebanese Population

**Perla Gerges [1,2,*], Tania Bitar [1,*], Mirna Hawat [1], Abbas Alameddine [3,4], Michel Soufia [5], Christian R. Andres [2] and Walid Hleihel [1,5]**

1 Faculty of Arts and Sciences, Holy Spirit University of Kaslik (USEK), Jounieh 446, Lebanon; mirna.chawat@net.usek.edu.lb (M.H.); walidhleihel@usek.edu.lb (W.H.)
2 UMR Inserm 1253 Ibrain, Université de Tours, 37032 Tours, France; christian.andres@univ-tours.fr
3 Department of Psychology, University of Balamand, 100 Tripoli, Lebanon; abbas.alameddine@gmail.com
4 North Autism Center (NAC), Zgharta 1304, Lebanon
5 School of Medicine and Medical Sciences, Holy Spirit University of Kaslik (USEK), Jounieh 446, Lebanon; michel_soufia@hotmail.com
* Correspondence: perla.a.gerges@net.usek.edu.lb (P.G.); taniabitar@usek.edu.lb (T.B.)

Received: 1 August 2020; Accepted: 25 August 2020; Published: 31 August 2020

check for updates

**Abstract:** Autism spectrum disorders (ASD) are among the most common childhood neurodevelopmental disorders. Identification of risk and protective factors are necessary to improve the guidance of prevention and intervention strategies. Our study aims to determine the potential risk and protective factors in ASD in the Lebanese population. Our case-control study included 100 ASD patients and 100 healthy matched controls recruited from all the Lebanese districts. The data collected from the questionnaires was analyzed using SPSS 23.0. Independent Student T-test and Chi-Square test were carried out for the bivariate analysis of the data. In addition, the variables revealing a $p$-value < 0.05 were used for the multivariate logistic regression analysis. Multivitamins intake, especially omega 3 and vitamin B (Odds Ratio (OR) = 0.257; 95% Confidence Interval (CI) [0.115–0.579]), rich cereal diet (OR = 0.212; 95% CI [0.089–0.510]), and supplementation in iron during pregnancy (OR = 0.229; 95% CI [0.083–0.627]) were identified as protective factors against ASD. On the other hand, stress during pregnancy (OR = 6.339; 95% CI [2.845–14.125]), the presence of ASD patients in the family (OR = 7.878; 95% CI [1.877–33.065]) and the presence of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) patients in the family (OR = 6.981; 95% CI [1.362–35.789]) were associated with ASD. This study shed light on risk and protective factors associated with ASD in the Lebanese population. Further rigorous research, taking into consideration these factors, is needed to assist in early detection, prevention and subsequent intervention targeting ASD and its associated comorbidities, given that our study is not experimental and does not prove causality.

**Keywords:** Autism spectrum disorders; protective factors; multivitamins; cereal; iron; risk factors; attention deficit disorder; stress

## 1. Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) are defined as complex, neurodevelopmental conditions characterized by impairment in reciprocal social communication, restrictive and repetitive behaviors [1], reflecting the interaction between genetics and environmental risk factors [2,3]. Worldwide, the prevalence of ASD is estimated to affect 1/160 according to the World Health Organization (WHO) [2]. However, the prevalence is estimated to be 1/66 children in Lebanon [4].

In fact, genetic abnormalities in more than 1000 genes which are important for synaptic function, ubiquitination and chromatin remodeling have been identified in ASD [5]. Furthermore, the diverse observed phenotypes in ASD patients suggest that environmental factors play a role in the manifestation of the disorder in genetically susceptible subjects. To date, several environmental factors have been mentioned for ASD [6]. Exposure of the mother and the child to harmful environmental agents during central nervous system development can change the expression of some genes that are essential to embryonic development, leading to an increased risk of developmental disorders which are frequently associated with ASD [7].

Such findings, emphasizing the contribution of the environment in the etiology of ASD, strengthen the importance of identifying risk and protective factors in order to minimize the deleterious interaction between environmental and genetic factors. Several studies have proven that some parental, prenatal and postnatal factors increase the risk of ASD [8,9]. For example, a significantly higher incidence of ASD has been observed in children having mothers without folic acid supplementation during pregnancy compared to whom had their mothers supplemented [10]. As for iron, it has been reported that its deficiency, especially during breastfeeding, could lead to an increased ASD risk [11]. To date, there is no curative treatment for ASD. However, associated comorbidities could be reduced by prenatal measures and early behavioral interventions [12,13].

Considering that the environmental factors of ASD are not fully elucidated, our study which was conducted in the Lebanese population focused on identifying protective and risk factors that can help in designing future studies aiming for ASD prevention or risk attenuation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Participants

This case-control study included 100 ASD patients and 100 matched controls aged between 1 and 31 years old recruited from specialized institutions covering all the Lebanese territories between 2015 and 2020. With a confidence level of 95% and a power of 80%, we wanted to be able to detect a difference of at least 15% in the distribution of the factors between the two groups; therefore, we needed at least 99 persons per group. ASD patients were diagnosed using the fifth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM V).

### 2.2. Recruitment and Data Collection

Our research team contacted specialized organizations working with ASD patients to explain the objectives of the study. Following the call, a letter demonstrating the objectives of our study was sent to the families, followed by a meeting during which two members of the team answered the questions of the parents. The parents who accepted the invitation to participate in the study signed an informed consent and filled a questionnaire by either the mother or the father, or sometimes both under the supervision of a member from the team with the highest standards of confidentiality (see Supplementary File S1).

Simultaneously, the same procedure used in the recruitment of ASD patients was used to recruit the control group. The research team contacted regular schools and explained the objectives and stages of the study. After signing the informed consent, the surveys were filled out by either one or both of the parents in the presence of a member of our team (see Supplementary File S2). The control group matched the ASD group for age. According to the answers of the survey, control subjects did not have any neurodevelopmental disorders and they were socially active.

### 2.3. Variables and Trial Design

The retrospective survey, covering demographic, prenatal and postnatal factors, was prepared by our team according to the findings of available studies on ASD. It was conducted among the spoken language, which is Arabic.

Demographic factors such as the participant's age and parental age at conception were investigated. In addition, the parental and sibling's medical history was considered for: ASD, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), dyspraxia, and autoimmune diseases.

As for the prenatal factors, maternal stress, multivitamins intake, iron supplementation, rich cereal diet, coffee, tea and alcohol consumption, and passive exposure to tobacco at home during pregnancy were all checked. The binary "Yes/No" questions concerning these factors were directed at the conception period.

The associated disorders in ASD patients were also investigated for: digestive disorders, allergic reaction to some foods, mental retardation, and epilepsy.

This case control study has complied with the ethical standards and guidelines declared by the Declaration of Helsinki in 1964 and its later amendments and approved by the Holy Spirit University Ethical Committee after reviewal (delivered on 13 August 2014 and renewed on 9 January 2019).

### 2.4. Statistical Analysis

SPSS software version 23.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for the analysis. Student independent $t$-test was carried out to compare means in two groups. Chi-Square test was used to compare the distributions in two groups. A $p$-value $< 0.05$ was considered significant. Moreover, the multivariate logistic regression analysis was achieved using variables with $p < 0.05$ in the bivariate analysis and the absence/presence of ASD was used as the dependent variable. Odds ratios (OR) are also reported within 95% confidence intervals (CI) to determine whether the variable is a risk or protective factor.

## 3. Results

Our study showed a predominance of 84% male ASD patients compared to 16% female ASD patients. Furthermore, the independent student $t$-test was performed for the participant age and parental age at conception which showed a non-significant difference in all ages for both groups as shown in Table 1.

**Table 1.** Demographic characteristics of control and Autism Spectrum Disorders (ASD) group.

| Variable | Control Group | ASD Group | $p$-Value |
|---|---|---|---|
| Gender | | | 0.000 * |
| Male | 55 (55%) | 84 (84%) | |
| Female | 45 (45%) | 16 (16%) | |
| Age | | | 0.731 |
| Mean ± standard deviation | 10.40 ± 5.21 | 10.14 ± 5.51 | |
| Mother's age at conception | | | 0.551 |
| Mean ± standard deviation | 28.52 ± 5.75 | 29.02 ± 6.19 | |
| Father's age at mother's conception | | | 0.716 |
| Mean ± standard deviation | 35.77 ± 8.36 | 36.17 ± 7.13 | |

* Significant $p$-value $< 0.05$.

It is widely known that ASD have many associated disorders [14]. Moreover, our results revealed that several disorders such as digestive disorders, intellectual disability and epilepsy are present in the ASD patients of our study. Intellectual disability is shown to be the most common condition in ASD patients (44%), as shown in Table 2.

### 3.1. Bivariate Analysis

Our results, presented in Table 3, showed a statistical significance between ASD familial history and ASD onset. A slightly higher percentage of ASD patients compared to controls had an ASD brother/sister (8% versus 1%), ASD patients in their parent's families (12% versus 4%), ADHD patients in the family (14% versus 2%) and dyspraxic children in the family (8% versus 0%). As for the prenatal factors, our study revealed a significant $p$-value for stress during pregnancy, passive exposure to tobacco at home, multivitamins intake and cereal diet.

**Table 2.** ASD comorbid disorders.

| Variable | Control Group | ASD Group |
|---|---|---|
| Digestive disorders | | |
| Yes | 20 (20%) | 33 (33%) |
| No | 80 (80%) | 67 (67%) |
| Allergic reaction to food | | |
| Yes | 3 (3%) | 5 (5%) |
| No | 97 (97%) | 95 (95%) |
| Intellectual disability | | |
| Yes | 0 (0%) | 44 (44%) |
| No | 100 (100%) | 56 (56%) |
| Epilepsy | | |
| Yes | 0 (0%) | 11 (11%) |
| No | 100 (100%) | 89 (89%) |

**Table 3.** Factors by bivariate analysis for ASD.

| Variable | Control Group | ASD Group | *p*-Value |
|---|---|---|---|
| Maternal stress during pregnancy | | | 0.000 * |
| Yes | 18 (18%) | 47 (47%) | |
| No | 82 (82%) | 53 (53%) | |
| Multivitamins intake during pregnancy | | | 0.005 * |
| Yes | 85 (85%) | 68 (68%) | |
| No | 15 (15%) | 32 (32%) | |
| Iron supplementation during pregnancy | | | 0.027 * |
| Yes | 24 (24%) | 12 (12%) | |
| No | 76 (76%) | 88 (88%) | |
| Coffee consumption during pregnancy | | | 0.086 |
| Yes | 36 (36%) | 48 (48%) | |
| No | 64 (64%) | 52 (52%) | |
| Tea consumption during pregnancy | | | 0.079 |
| Yes | 31 (31%) | 43 (43%) | |
| No | 69 (69%) | 57 (57%) | |
| Alcohol consumption during pregnancy | | | 0.081 |
| Yes | 0 (0%) | 3 (3%) | |
| No | 100 (100%) | 97 (97%) | |
| Cereal diet during pregnancy | | | 0.001 * |
| Yes | 88 (88%) | 68 (68%) | |
| No | 12 (12%) | 32 (32%) | |
| Passive exposure to tobacco at home during pregnancy | | | 0.008 * |
| Yes | 30 (30%) | 47 (47%) | |
| No | 70 (70%) | 53 (53%) | |
| ASD brother/sister | | | 0.017 * |
| Yes | 1 (1%) | 8 (8%) | |
| No | 99 (99%) | 92 (92%) | |
| ASD children in the family | | | 0.037 * |
| Yes | 4 (4%) | 12 (12%) | |
| No | 96 (96%) | 88 (88%) | |
| ADHD children in the family | | | 0.002 * |
| Yes | 2 (2%) | 14 (14%) | |
| No | 98 (98%) | 86 (86%) | |
| Dyspraxic children in the family | | | 0.004 * |
| Yes | 0 (0%) | 8 (8%) | |
| No | 100 (100%) | 92 (92%) | |

* Significant *p*-value < 0.05.

### 3.2. Multivariate Analysis

The variables included in the multivariate analysis were the ones having a $p$-value < 0.05 in the bivariate analysis. The presence/absence of ASD was taken as the dependent variable, whereas the independent variables are shown in Table 4. Our results have shown that a rich cereal diet (OR = 0.212), multivitamins intake (especially omega 3 and vitamin B (OR = 0.257)) and iron supplementation during pregnancy (OR = 0.229) were identified as protective factors for ASD occurrence. Whereas reported mother stress during pregnancy (OR = 6.339), the presence of ASD patients in the family (OR = 7.878) and the presence of ADHD patients in the family (OR = 6.981) are risk factors for ASD. Our analysis showed no association between the history of autoimmune diseases in the family and maternal passive tobacco exposure at home during pregnancy and ASD.

**Table 4.** Logistic regression analysis taking the presence/absence of ASD as dependent variable.

| Variable | $p$-Value | Odds Ratio (95% Confidence Interval) |
|---|---|---|
| Risk Factors | | |
| Maternal stress during pregnancy | 0.000 * | 6.339 (2.845–14.125) |
| Presence of ASD patients in the family | 0.005 * | 7.878 (1.877–33.065) |
| History of autoimmune diseases in the family | 0.206 | 4.534 (0.435–47.249) |
| Presence of ADHD patients in the family | 0.020 * | 6.981 (1.362–35.789) |
| Maternal passive tobacco exposure at home during pregnancy | 0.394 | 1.174 (0.812–1.699) |
| Protective Factors | | |
| Maternal rich cereal diet during pregnancy | 0.000 * | 0.212 (0.089–0.510) |
| Iron supplementation during pregnancy | 0.004 * | 0.229 (0.083–0.627) |
| Maternal multivitamins intake during pregnancy | 0.001 * | 0.257 (0.115–0.579) |

Variable(s) entered in the model: Maternal stress during pregnancy, presence of ASD patients in the family, history of autoimmune diseases in the family, presence of ADHD patients in the family, maternal passive tobacco exposure at home during pregnancy, maternal rich cereal diet during pregnancy, iron supplementation during pregnancy and maternal vitamin intake during pregnancy. * Significant $p$-value < 0.05.

## 4. Discussion

This case control study was conducted to determine the prenatal, postnatal, and familial factors related to ASD in Lebanese individuals.

Our study uncovered significant protective factors that could easily be promoted with the objective to reduce the risk of ASD. In our cohort, mothers who reported taking multivitamins, including omega 3 and vitamin B, were less likely to have children with ASD. In parallel with previous studies, prenatal vitamins supplementation was associated with decreased risk of ASD occurrence [15,16]. Pregnancy multivitamins are a combination of many vitamins including omega 3, omega 6, folic acid, iron, and vitamin B. Studies have revealed that vitamin supplementation rich in vitamin B prevents neural tube defects and improves the DNA methylation process [17]. Moreover, maternal deficiency in some vitamins during pregnancy is associated with aberrations in the neurodevelopment of the fetus. For instance, prenatal vitamin D deficiency causes the disruption of structural brain connectivity [15] and increases the risk of genetic mutations [10], which may lead to ASD and intellectual disability in offspring.

In addition, our findings showed that rich cereal diet during pregnancy constitutes a protective factor for ASD. Cereals are an essential source of a variety of nutrients, such as iron, folic acid and vitamins of the B group [18]. In agreement with the results of our study, a study examining maternal iron intake in relation to ASD risk in California showed that low maternal iron intake in addition to other factors, such as advanced maternal age, was associated with a 5-fold increase in ASD risk [11].

One more protective factor showed in our study is iron supplementation during pregnancy. A study conducted on the Lebanese population has shown that prenatal anemia is a risk factor associated with ASD [19]. Moreover, a recent study has shown that maternal anemia during pregnancy is highly associated with neurodevelopmental disorders, including ASD, attention deficit/hyperactivity disorder

(ADHD) and intellectual disability (ID) in offspring [20]. Furthermore, as mentioned previously, Schmidt et al. reported that low iron intake was associated with ASD [11]. Indeed, prenatal anemia is associated with several complications affecting the maternal and fetal well-being. Affected mothers experience fainting and sleep difficulties, and they have an increased risk of developing infections. As for the fetus, iron deficiency has adverse outcomes, including growth delay and prematurity. Therefore, iron is crucial for neural metabolism and functioning [21].

In addition to the cited protective factors, our study uncovered three risk factors. The results of our study were in line with previous reports showing that maternal stress during pregnancy is a risk factor highly associated with ASD [22,23]. Indeed, many studies have shown the effects of prenatal exposure to maternal stress on the behavior and mental health of the offspring. These effects include abnormalities in neurodevelopment, neurocognitive function, and cerebral processing which lead to changes in both the hypothalamo–pituitary–adrenal axis (HPA) and the autonomic nervous system [24]. Corticotropin-releasing hormone (CRH) secretion from the hypothalamus is a result of stress and correlated with the level of stress during pregnancy. Maternal CRH can easily cross the placenta, and the placenta itself can produce considerable amounts of CRH due to external or intrauterine stress. CRH has an immunomodulatory role; it stimulates the activation of mast cells to release pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 6 (IL-6), that increase blood–brain barrier (BBB)'s permeability. These events lead to the action of auto-antibodies against brain peptides, which cause brain inflammation, thus contributing to ASD pathogenesis [25].

Our findings also indicated that familial ASD history is more common among ASD group compared to controls. Our multivariate analysis revealed that having ASD and ADHD patients in the family are risk factors related to ASD, which support the role of genetics in ASD. In fact, a study conducted on a large cohort of Swedish children showed that the heritability of the disorder is approximately 50% and the risk of ASD increases 10-fold if a sibling has the disease and 2-fold if a cousin is diagnosed with ASD [26]. However, this result was concordant with the finding of two Lebanese studies showing that familial history of mental illness and ASD are significantly associated with ASD onset in children [23,27].

Despite the limited sample size of our case-control study, we were able to suggest not only risk factors for ASD but also protective factors. However, our study was of the retrospective type based on the information given from the parents, which leads to the possibility of memory bias and low conclusiveness. In addition, it was difficult to have a proportional geographic sampling since our recruitment was done in centers and schools that do not follow a strict and specific geographic distribution. The two studied groups differ widely in gender distribution, which constitutes a major limitation to our study; hence, a high proportion of patients with intellectual disability comorbidity were present in the ASD group. Another limitation was the difficulty to verify the diagnosis criterion because it was not done by the research team. Thus, taking into consideration the fact that our results come from an observational/correlational non-experimental work, causality is not inferred, and readers are warned to avoid formulating the study results into quick intervention guidelines. The aforementioned limitations should be taken into consideration for complementary studies using a larger population with more precise exposure assessments and potential cofounders.

## 5. Conclusions

ASD is one of the most prevalent childhood neurodevelopmental disorders around the world. Currently, all the Lebanese epidemiological studies conducted on ASD patients have a limited sample size compared with other countries. Subsequently, ASD epidemiological investigation on the Lebanese population should be improved in order to achieve more robust conclusions.

In short, our study suggested that maternal vitamin intake (especially vitamin B group and omega n-3 fatty acids), a cereal-rich diet, and iron supplementation during pregnancy are protective factors in ASD. On the other hand, several risk factors highly associated with ASD were reported, including maternal stress during pregnancy, the presence of ASD and ADHD patients in the family. Identifying

these risk and protective factors associated with ASD will not only help us understand its prevalence but may also constitute important preventive measures.

Future studies with large and heterogeneous sample sizes should be done to identify the time of the exposure to environmental factors and its relation with critical developmental phases.

**Supplementary Materials:** The following are available online at http://www.mdpi.com/1660-4601/17/17/6323/s1, File S1: Survey for ASD group, File S2: Survey for control group.

**Author Contributions:** Conceptualization, W.H., C.R.A. and T.B.; methodology, W.H., C.R.A. and T.B.; formal analysis, T.B., P.G., M.H.; data curation, W.H., T.B., P.G.; writing—original draft preparation, P.G.; writing—review and editing, W.H., C.R.A., T.B., A.A., M.S.; supervision, W.H., C.R.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Council for Scientific Research in Lebanon (CNRSL), Lebanon S/3541, and the Higher Center for Research of the Holy Spirit University of Kaslik (HCR-USEK), Lebanon 90010141.

**Acknowledgments:** This project was supported by the National Council for Scientific Research in Lebanon (CNRSL) and the Higher Center for Research of the Holy Spirit University of Kaslik (HCR-USEK). We thank all the non-governmental organizations and associations that care for patients with autism and graciously shared their data with us.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed.; American Psychiatric Publishing: Washington, DC, USA, 2013.
2. Eissa, N.; Al-Houqani, M.; Sadeq, A.; Ojha, S.K.; Sasse, A.; Sadek, B. Current enlightenment about etiology and pharmacological treatment of autism spectrum disorder. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 304. [CrossRef] [PubMed]
3. Siu, M.T.; Weksberg, R. Epigenetics of autism spectrum disorder. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *978*, 63–90. [PubMed]
4. Chaaya, M.; Saab, D.; Maalouf, F.T.; Boustany, R. Prevalence of autism spectrum disorder in nurseries in lebanon: A cross sectional study. *J. Autism. Dev. Disord.* **2016**, *46*, 514–522. [CrossRef] [PubMed]
5. SFARI | Simons Foundation Autism Research Initiative. Available online: https://www.sfari.org/ (accessed on 3 March 2020).
6. Forsberg, S.L.; Ilieva, M.; Maria Michel, T. Epigenetics and cerebral organoids: Promising directions in autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry* **2018**, *8*, 14. [CrossRef] [PubMed]
7. Karimi, P.; Kamali, E.; Mousavi, S.M.; Karahmadi, M. Environmental factors influencing the risk of autism. *J. Res. Med. Sci.* **2017**, *22*, 27. [PubMed]
8. Hornig, M.; Bresnahan, M.A.; Che, X.; Schultz, A.F.; Ukaigwe, J.E.; Eddy, M.L.; Hirtz, D.; Gunnes, N.; Lie, K.K.; Magnus, P.; et al. Prenatal fever and autism risk. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 759–766. [CrossRef] [PubMed]
9. Wang, C.; Geng, H.; Liu, W.; Zhang, G. Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **2017**, *96*, e6696. [CrossRef]
10. Emberti Gialloreti, L.; Mazzone, L.; Benvenuto, A.; Fasano, A.; Garcia Alcon, A.; Kraneveld, A.; Moavero, R.; Raz, R.; Riccio, M.P.; Siracusano, M.; et al. Risk and protective environmental factors associated with autism spectrum disorder: Evidence-based principles and recommendations. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 217. [CrossRef]
11. Schmidt, R.J.; Tancredi, D.J.; Krakowiak, P.; Hansen, R.L.; Ozonoff, S. Maternal intake of supplemental iron and risk of autism spectrum disorder. *Am. J. Epidemiol.* **2014**, *180*, 890–900. [CrossRef]
12. Reichow, B.; Hume, K.; Barton, E.E.; Boyd, B.A. Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *5*, CD009260. [CrossRef]
13. Zachor, D.A.; Curatolo, P. Recommendations for early diagnosis and intervention in autism spectrum disorders: An italian-israeli consensus conference. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2014**, *18*, 107–118. [CrossRef] [PubMed]
14. Tye, C.; Runicles, A.K.; Whitehouse, A.J.O.; Alvares, G.A. Characterizing the interplay between autism spectrum disorder and comorbid medical conditions: An integrative review. *Front. Psychiatry* **2018**, *9*, 751. [CrossRef] [PubMed]

15. Levine, S.Z.; Kodesh, A.; Viktorin, A.; Smith, L.; Uher, R.; Reichenberg, A.; Sandin, S. Association of maternal use of folic acid and multivitamin supplements in the periods before and during pregnancy with the risk of autism spectrum disorder in offspring. *JAMA Psychiatry* **2018**, *75*, 176–184. [CrossRef] [PubMed]
16. Raghavan, R.; Riley, A.W.; Volk, H.; Caruso, D.; Hironaka, L.; Sices, L.; Hong, X.; Wang, G.; Ji, Y.; Brucato, M.; et al. Maternal multivitamin intake, plasma folate and vitamin B12 levels and autism spectrum disorder risk in offspring. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2018**, *32*, 100–111. [CrossRef] [PubMed]
17. Imbard, A.; Benoist, J.F.; Blom, H.J. Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 4352–4389. [CrossRef]
18. Laskowski, W.; Górska-Warsewicz, H.; Rejman, K.; Czeczotko, M.; Zwolińska, J. How important are cereals and cereal products in the average polish diet? *Nutrients* **2019**, *11*, 679. [CrossRef]
19. Guisso, D.; Saadeh, F.; Saab, D.; El Deek, J.; Chamseddine, S.; El Hassan, H.; Majari, G.; Boustany, R. Association of autism with maternal infections, perinatal and other risk factors: A case-control study. *J. Autism Dev. Disord.* **2018**, *48*, 2010–2021. [CrossRef]
20. Wiegersma, A.M.; Dalman, C.; Lee, B.K.; Karlsson, H.; Gardner, R.M. Association of prenatal maternal anemia with neurodevelopmental disorders. *JAMA Psychiatry* **2019**, *76*, 1–12. [CrossRef]
21. Abu-Ouf, N.; Jan, M. The impact of maternal iron deficiency and iron deficiency anemia on child's health. *Saudi Med. J.* **2015**, *36*, 146–149. [CrossRef]
22. Beversdorf, D.Q.; Stevens, H.E.; Jones, K.L. Prenatal stress, maternal immune dysregulation, and their association with autism spectrum disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* **2018**, *20*, 76. [CrossRef]
23. Bitar, T.; Gerges, P.; Kassab, M.; Hallit, S.; Mattar, H.; Soufia, M.; Andres, C.R.; Hleihel, W. Factors associated with autism spectrum disorder: A case-control study in the lebanese population. *Epidemiol. Biostat. Public Health* **2020**, *17*, e13218-3–e13218-4.
24. Van den Bergh, B.R.H.; Van den Heuvel, M.I.; Lahti, M.; Braeken, M.; De Rooij, S.R.; Entringer, S.; Hoyer, D.; Roseboom, T.; Räikkönen, K.; King, S.; et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2017**, in press. [CrossRef] [PubMed]
25. Angelidou, A.; Asadi, S.; Alysandratos, K.; Karagkouni, A.; Kourembanas, S.; Theoharides, T.C. Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-review and proposal. *BMC Pediatr.* **2012**, *12*, 89. [CrossRef] [PubMed]
26. Sandin, S.; Lichtenstein, P.; Kuja-Halkola, R.; Larsson, H.; Hultman, C.M.; Reichenberg, A. The familial risk of autism. *JAMA* **2014**, *311*, 1770–1777. [CrossRef] [PubMed]
27. Saab, D.; Chaaya, M.; Boustany, R.M. National prevalence and correlates of autism: A lebanese cross-sectional study. *Autism Open Access* **2018**, *8*, 3–5. [CrossRef]


© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 2.2 Etude génétique : Identification de nouvaux variants génétiques chez des patients atteints des TSA dans la population Libanaise.

### *2.2.1 Présentation de l'étude*

Plusieurs études ont mis en évidence que les TSA sont des troubles multifactoriels impliquant une forte composante génétique et des facteurs environnementaux. Les variations dans plusieurs gènes fournissent des preuves solides de l'implication des facteurs génétiques dans les TSA. Des anomalies chromosomiques, des CNVs et des SNVs ont été associés à plusieurs troubles neurodéveloppementaux et observées chez 15 à 20 % des sujets atteints de TSA (Huguet et al., 2013). En raison de la grande hétérogénéité génétique, de la complexité de la transmission et du grand nombre de patients pour lesquels aucune étiologie n'a été révélée, il est intéressant de rechercher des nouveaux gènes candidats dans de nouvelles populations qui conduiront à une meilleure compréhension de l'étiologie.

Dans une étude précédente, dans laquelle la technique CGH array et la qPCR ont été utilisés sur 19 trios Libanais avec TSA, notre équipe a identifié des CNV rares chez 14 sujets. Parmi les CNVs détectés, on a identifié des CNV comportant de nouveaux gènes candidats comme *PJA2, APCS, SYNPO, TAC1* et d'autres gènes précédemment connus associés aux TSA tels que *SHANK3, MBP* et *CHLI*. (Bitar et al., 2019)

Dans la présente étude, nous avons utilisé le WES sur cinq sujets qui n'avaient pas révélé de CNV dans l'étude précédente. Le WES permet l'identification de variations génétiques rares telles que les variations d'un seul nucléotide et les petites insertions/délétions (indels). Pour cela, le WES a été utilisé pour chaque sujet et ses parents lorsqu'ils étaient disponibles pour détecter les variations dans tous les gènes. Nous avons commencé notre analyse avec 95 000 variants/sujet. Dans le premier filtre, les variants avec une profondeur de lecture inférieure à 20 et une fréquence d'allèles variant inférieure à 35 % de l'allèle normal ont été exclus. Par suite, les variants délétères entrainant un décalage de cadre de lecture, d'un faux-sens dommageable, du site donneur ou de l'accepteur dépissage, du codon stop gagné et perdu, et les délétions et insertions dans le cadre ont été conservés. Les variants ont ensuite été analysés à l'aide de la base de données DGV (http://dgv.tcag.ca/) dans le navigateur génome UCSC (https://genome.ucsc.edu/). Un deuxième filtre basé sur l'analyse du trio et l'exclusion de cohorte a été effectuées sur les variants restants en supposant un mode de transmission *de*

*novo*, autosomique récessif et lié à l'X. Afin de vérifier si les variations détectées étaient dans des gènes déjà connus pour être associés aux TSA, nous avons cherché dans les bases de données suivantes : SFARI (https://www.sfari.org/), AutismKB (http://db.cbi.pku.edu.cn/autismkb_v2/), et PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/). Les gènes qui n'étaient pas liés aux TSA ont été soumis à un dépistage plus approfondi à l'aide du site OMIM (https://www.omim.org/), PubMed, Decipher (https://decipher.sanger.ac.uk/) et Gene Cards (https://www.genecards.org/). Ces gènes ont été classés comme nouveaux liés au développement neurologique et/ou aux troubles neurologiques. Finalement, les variants ont été vérifiés par visualisation sur le navigateur Integrated Genome Browser (IGV) et par séquençage Sanger. (Annexe 2)

Notre étude nous a permis d'identifier un nouveaux variant *de novo* dans le gène *MIS18BP1* et deux autres nouveaux variants hérités dans les gènes *SLITRK4* (SLIT et NTRK Like Family Member 4) et *NHSL2* (NHS-Like Protein 2) qui n'ont pas été précédemment identifiés comme liés au TSA. En outre, nos résultats ont confirmé la présence d'autres variations génétiques qui ont été précédemment décrites et sont partagées entre les sujets Libanais et d'autres populations atteintes de TSA. Nos observations fournissent un argument supplémentaire pour les modèles polygéniques fréquents dans les TSA composés de plusieurs variants hérités et *de novo*. Cependant, des études fonctionnelles sont essentielles pour valider nos résultats et renforcer leur implication dans la pathologie.

Les résultats de notre étude génétique ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Genes* (Facteur d'impact 4,096 ; Rang Q2).

### *2.2.2 Article 2: Identification of novel gene variants for Autism Spectrum Disorders in the Lebanese population using whole-exome sequencing.*

genes

MDPI

*Article*

# Identification of Novel Gene Variants for Autism Spectrum Disorders in the Lebanese Population Using Whole-Exome Sequencing

**Perla Gerges [1,2,*], Tania Bitar [1,*], Frederic Laumonnier [2], Sylviane Marouillat [2], Georges Nemer [3], Christian R. Andres [2,4] and Walid Hleihel [1,5]**

[1] Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, Jounieh P.O. Box 446, Lebanon; walidhleihel@usek.edu.lb
[2] UMR 1253 iBrain, Inserm, Faculté de Médecine, Université de Tours, CEDEX 1, 37032 Tours, France; frederic.laumonnier@univ-tours.fr (F.L.); sylviane.marouillat@univ-tours.fr (S.M.); christian.andres@univ-tours.fr (C.R.A.)
[3] Division of Genomics and Translational Biomedicine, College of Health and Life Sciences, Hamad Bin Khalifa University, Doha P.O. Box 34110, Qatar; GNemer@hbku.edu.qa
[4] Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU de Tours, CEDEX 09, 37044 Tours, France
[5] School of Medicine and Medical Sciences, Holy Spirit University of Kaslik, Jounieh P.O. Box 446, Lebanon
* Correspondence: perla.a.gerges@net.usek.edu.lb (P.G.); taniabitar@usek.edu.lb (T.B.)

**Abstract:** In our previous study, in which array CGH was used on 19 Lebanese ASD subjects and their parents, we identified rare copy number variants (CNVs) in 14 subjects. The five remaining subjects did not show any CNVs related to autism spectrum disorders (ASD). In the present complementary study, we applied whole-exome sequencing (WES), which allows the identification of rare genetic variations such as single nucleotide variations and small insertions/deletions, to the five negative CNV subjects. After stringent filtering of initial data on the five families, three novel genes potentially related to neurodevelopment were identified, including a *de novo* mutation in the *MIS18BP1* gene. In addition, genes already known to be related to ASD contained sequence variations. Our findings outline the potential involvement of the novel *de novo* mutation in the *MIS18BP1* gene in the genetic etiology and pathophysiology of ASD and highlights the genetic complexity of these disorders. Further studies with larger cohorts of subjects are needed to confirm these observations, and functional analyses need to be performed to understand the precise pathophysiology in these cases.

**Keywords:** autism spectrum disorders; whole-exome sequencing; single nucleotide variations; insertions/deletions; genetic etiology; *MIS18BP1*

check for updates

Citation: Gerges, P.; Bitar, T.; Laumonnier, F.; Marouillat, S.; Nemer, G.; Andres, C.R.; Hleihel, W. Identification of Novel Gene Variants for Autism Spectrum Disorders in the Lebanese Population Using Whole-Exome Sequencing. *Genes* **2022**, *13*, 186. https://doi.org/10.3390/genes13020186

Academic Editors: Andreas G. Chiocchetti and Zeynep Tümer

Received: 20 December 2021
Accepted: 19 January 2022
Published: 21 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

According to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-5, autism spectrum disorders (ASD) are extremely variable conditions characterized by impairments in reciprocal social communication and the use of restrictive and repetitive routines, typically manifesting before the age of 3 years [1] and affecting boys 4 times more than girls [2]. For 2016, in the United States, the estimated ASD prevalence has gradually risen to affect 1 in every 54 children who are 8 years of age, according to a recently published report by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [3]. However, the prevalence in Lebanon is estimated to be 1 in 66 children in Beirut and Mount regions [4].

In parallel to the considerable clinical heterogeneity of these disorders, several studies have shown that ASD are multifactorial disorders. Variations in multiple genes provide strong evidence of the involvement of genetic factors that explain most of ASD risk [5]. In fact, ASD is thought to potentially involve more than 1000 genes [6], while 102 genes have been formally associated [7], with variable levels of evidence. An important proportion of

these genes encodes proteins implicated in synaptic function, ubiquitination, and chromatin remodeling [8].

Chromosomal abnormalities, rare copy number variations (CNVs) and single nucleotide variants (SNV) have been associated with ASD [9]. Rare, *de novo*, and inherited CNVs have been entangled in several neurodevelopmental disorders and they are observed in 15–20% of subjects with ASD [10]. Despite the great number of identified ASD susceptibility genes, only a small proportion of them have been strongly validated [10]; as such, identifying specific causative genes is an important challenge.

Recent developments in genomic sequencing have transformed variant discovery. Different approaches have been used to uncover gene variants related to ASD, such as next generation sequencing techniques (NGS) including whole genome sequencing (WGS) and whole-exome sequencing (WES). WES has been used to identify rare and novel genetic variations related to neurodevelopmental disorders [11]. Our previous study aimed to evaluate the presence of rare CNVs in a group of 19 Lebanese ASD subjects and their parents using the high-resolution comparative genomic hybridization technique (array CGH) which is an ultra-high-resolution method of genetic testing that identifies small deletions and duplications. We reported a high percentage of CNVs in 14 subjects. Moreover, this study uncovered several CNVs related to ASD and identified *PJA2*, *SYNPO*, *APCS*, and *TAC1* as novel ASD candidate genes [12]. An additional approach to identifying small CNVs, SNVs, and indels in the genome associated with several disorders including ASD [13] could be of interest since array CGH cannot detect balanced structural variations and point mutations. To this end, in this complementary study, whole-exome sequencing (WES) was further implemented among the five families who did not reveal any CNVs related to ASD in the previous study, to identify point mutations in genes and to expand our knowledge of the genetic etiology and the pathophysiology of these disorders. Therefore, the analysis framework was designed to uncover rare *de novo* and inherited variants in novel or ASD-linked genes that have previously been described. This approach enabled us to detect variants in three novel genes potentially related to neurodevelopment, including one *de novo* mutation in the *MIS18BP1* gene. In addition, variants in genes already known as related to ASD were also detected.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Subjects and Clinical Characteristics

The 5 studied subjects were enrolled in the study among the group of 19 [12]. The diagnosis was performed by the psychiatrists of the non-governmental organizations (NGOs). This was based on the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders in its 4th edition [1]. As reported by the NGOs, the average Childhood Autism Rating Scale (CARS) score as well as the levels of intellectual disability were moderate in the subjects included in our study [12]. Subjects were recruited from specialized institutions and NGOs distributed all over Lebanon. First, our research team contacted the NGOs to explain the aim of the project. After the approval of the NGOs, a letter summarizing the objectives was sent to the families. Afterwards, the families were invited to a meeting with our team in which we explained the different steps of the study. The families who accepted to participate in our study provided us with a signed informed consent form before the collection of the data and the samples.

The study was complied with the ethical standards and guidelines of the Declaration of Helsinki in 1964 and its later amendments. The Holy Spirit University Ethical Committee reviewed and approved the study protocol (delivered in 2014).

### 2.2. DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from the blood samples of ASD subjects and their 2 parents (except the mother of subject number 64 who was dead and the father of subject 70 who was unknown) using the QIAsymphony robot, and then the concentration and purity

of the extracted DNA was assessed by spectrophotometry (Thermo Scientific Nanodrop 2000, Waltham, MA, USA).

### 2.3. Genetic Studies

Using the V6 SureSelect kits (Agilent, Santa Clara, CA, USA) on an Illumina HiSeq2500 platform at Macrogen (Seoul, Korea), library preparation and subsequent exome capture were performed. Using Novo align, sequences were aligned to the hg19 human genome and variants were called by the Genome Analyses Toolkit (GATK). A Phred scaled quality score (PSQ) of more than 20 was adopted. The Illumina variant studio was used to annotate and analyze the variants. Further analysis of the filtered variants continued using the Varsome platform (www.varsome.com, accessed on 13 September 2020) [14].

### 2.4. Variant Analysis

We only kept the SNV and indel gene variants with an allele frequency <1% in the Database of Genomic Variants (DGV) in the UCSC Genome browser. Then, all intergenic, intronic, non-coding, splice region, synonymous, downstream, and upstream variants were excluded. Deleterious variants obtained from exonic frameshift, damaging missense, splice donor and acceptor, stop codon gained and lost, and in-frame deletions and insertions were retained (Figure 1). In addition, the variants with a read depth of less than 20 and a variant allele frequency of less than 35% of the normal allele (proportion of variant reads) were removed. Furthermore, trio analysis and cohort exclusion were performed on the remaining gene variants by assuming a *de novo*, autosomal recessive, and X-linked mode of inheritance.

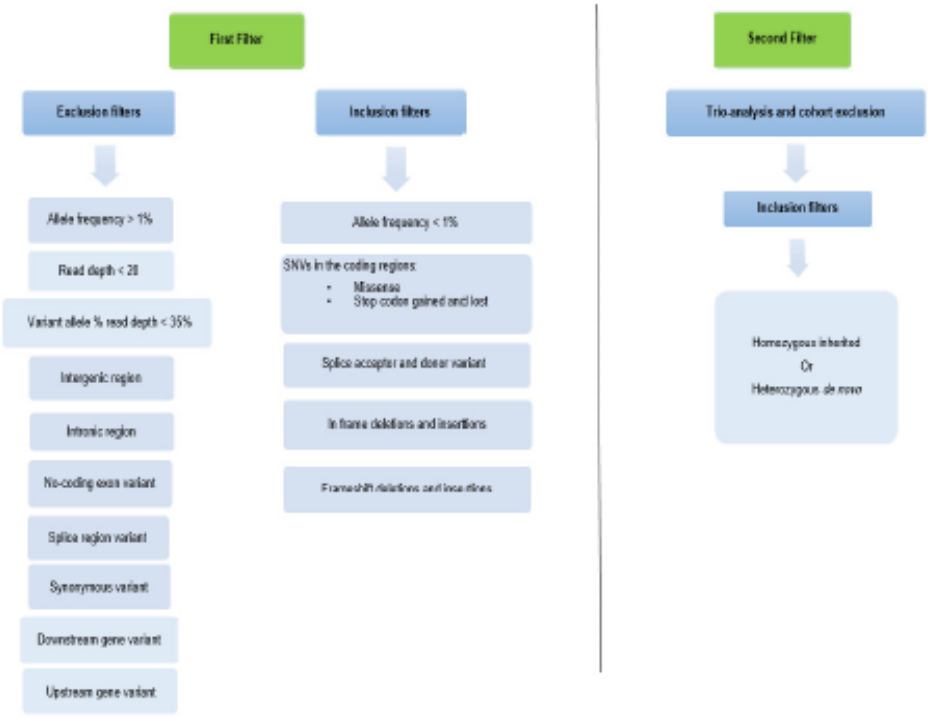



**Figure 1.** Filtering approach of the variables detected by whole-exome sequencing. In total, 2 filters were applied on the obtained variants from the 5 subjects. The first filter was based on the allele frequency and the protein coding consequences of the variants. The second filter was based on the trio analysis and cohort exclusion.

The theoretical pathogenicity of the missense variants was evaluated by in silico predictive software (SIFT: https://bii.a.star.edu.sg/, accessed on 11 September 2020 [15], Polyphen2: http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/, accessed on 11 September 2020 [16], CADD: https://cadd.gs.washington.edu/snv, accessed on 19 December 2021) and scored accordingly. Damaging missense SNVs were defined as those having a deleterious prediction in one of the tools. Then, we manually inspected the likely false positive variants using the IGV [17].

In order to verify if the detected variations were in genes already known to be associated with ASD or neurodevelopmental disorders, we checked the following databases: SFARI (https://www.sfari.org/, accessed on 31 December 2020), AutismKB (http://db.cbi.pku.edu.cn/autismkb_v2/, accessed on 31 December 2020) and PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/, accessed on 31 December 2020 ). The gene variants were subsequently classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [18] as pathogenic, likely pathogenic, variants of uncertain clinical significance, likely benign, and benign. We defined the damaging ASD-associated variants as those meeting likely pathogenic or pathogenic criteria according to ACMG standards. The remaining genes were subjected to further screening for biological significance for neural development, known neurological disorders, and function using Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (https://www.omim.org/, accessed on 15 February 2021), PubMed, Decipher (https://decipher.sanger.ac.uk/, accessed on 15 February 2021), and Gene Cards (https://www.genecards.org/, accessed on 15 February 2021). These genes were classified as novel in ASD related to neurodevelopment and/or neurological disorders. The updated annotation and distribution in the GnomAD database were ascertained using the Varsome portal [14].

### 2.5. Genetic Validation Using Sanger Sequencing

To genotype the variants, we designed PCR primers for each site using the Primer3Plus software (https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi, accessed on 11 October 2021) and used standard PCR conditions for the available 10 samples (Table S1). Sanger sequencing was performed on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions to validate the new candidates. Finally, the 10 variants were validated (Figure S2).

## 3. Results

This study included five eligible subjects with ASD phenotypes. The main characteristics of each subject are displayed in Table 1.

WES was performed for each subject and his/her parents when available to detect SNVs and/or indels in all available genes. The resulting on target-reads of around 40 Mbp showed an ~80X coverage average mean depth of target regions for all samples. We adopted a filtering strategy that associates the genotype to the underlying phenotypes within each family for all variants with less than 1% minor allele frequency (MAF).

We started our analysis with 95,000 variants/subject. After applying the first filter, around 1400 variants/subject were retained. Subsequent filtering based on trio analysis and cohort exclusion reduced the variants to around 3 variants/subject as shown in Figure 2.




**Figure 2.** Number of variants obtained by WES after 2 filtering steps. Around 1400 variants/subject remained after applying the first filter and around 3 variants/subject remained after the second filter.

**Table 1.** Characteristics of ASD subjects included in our study.

| Subject Number | Gender | Age | Region | Parents Availability | Parents Consanguinity | Family History | CARS | Associated Comorbidities |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 23 | Male | 9 | Beirut | Yes | No | Diabetes, cancer, and renal disease on both the paternal and maternal sides | Moderate autism | Hyperactivity, anxiety |
| 45 | Female | 9 | South Lebanon | Yes | No | NA | Moderate autism | Epilepsy, speech delay |
| 64 | Male | 10 | Mount Lebanon | No | No | Hypertension and high cholesterol on the maternal side | Moderate autism | Anxiety |
| 70 | Male | 27 | Bekaa | No | Father unknown | Diabetes, hypertension, high cholesterol, and triglycerides on both the maternal and paternal family sides. | Moderate autism | Anxiety, depression, hyperactivity, self-injurious behavior |
| 73 | Male | 9 | Bekaa | Yes | No | Diabetes, hypertension on both family sides. Intellectual disability in paternal side | Moderate autism | Anxiety, depression, hyperactivity, self-injurious behavior |

The analysis framework of this study was designed to uncover not only *de novo* variants, but also the ones with autosomal recessive and X-linked mode of inheritance in unknown or ASD linked genes, previously described.

### 3.1. Detected Variants

#### 3.1.1. *De Novo* Variants

We detected a missense SNV on chromosome 4 in the *USP46* (OMIM #612849) gene in subject number 23 (Table 2). The c.293C>T (NM_022832.3) predicted a p.Pro98Leu variation which was found to be deleterious by SIFT and benign by Polyphen 2.

**Table 2.** List of *de novo* gene variants. *De novo* variants in 4 genes were detected in subjects 23, 45, and 73. AD: autosomal dominant, PS: strong evidence of pathogenicity, PM: moderate evidence of pathogenicity, PVS: very strong evidence of pathogenicity, PP: supporting evidence of pathogenicity, BP: supporting evidence of a benign impact.

| | | | | Identified Variant | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Subject | Gene | Chromosome | Mode of Inheritance | Type | Base Change | Protein Change | Consequence | SIFT | Polyphen2 | CADD | ACMG Classification |
| 23 | *USP46* | 4 | AD | snv | c.293C>T | p.Pro98Leu | missense | deleterious (0.03) | benign (0.009) | 23.8 | Uncertain significance (PS2, PM2) |
| 45 | *MIS18BP1* | 14 | AD | deletion | c.471delA | p.Lys157Asnfs Ter24 | frameshift | | | 16.6 | Uncertain significance (PVS1, PP3) |
| | *KRT2* | 12 | AD | snv | c.1022G>A | p.Arg341His | missense | deleterious (0) | probably damaging (1) | 27.7 | Likely pathogenic (PM1, PM2, PP2, PP3) |
| 73 | *LSMEM2* | 3 | AD | snv | c.97G>T | p.Gly33Trp | missense | deleterious (0.02) | possibly damaging (0.688) | 22.1 | Uncertain significance (PM2, BP4) |

In subject number 45, a frameshift deletion and a missense SNV were detected on chromosome 14 and 12 in the *MIS18BP1* (OMIM #618139) and *KRT2* (OMIM #600194) genes, respectively. The c.471delA (NM_018353.4) in the *MIS18BP1* gene predicted a p.Lys157AsnfsTer24 variation which was inspected using Integrated Genome Browser Visualization (IGV) (Figure S1). The c.1022G>A (NM_000423.2) on the *KRT2* gene predicted

a p.Arg341His variation which was found to be deleterious by SIFT and probably damaging by Polyphen 2.

In subject number 73, a missense SNV was detected on chromosome 3 in the *LSMEM2* gene. The c.97G>T (NM_153215.1) on this gene predicted a p.Gly33Trp which was considered to be deleterious by SIFT and possibly damaging by Polyphen 2.

3.1.2. Homozygote Variants

In subject number 45, we detected one missense homozygous SNV inherited from both parents on chromosome 2 in the *HAAO* (OMIM #604521) gene (Table 3). The c.371T>C (NM_012205.2) in this gene led to a p.Met124Thr variation which was predicted to be tolerated by SIFT and benign by Polyphen 2 and was inspected on IGV (Figure S1).

**Table 3.** List of autosomal recessive gene variants. In total, 3 homozygous variants were detected in 3 different genes in subjects 45, 70, and 73. AR: autosomal recessive, PM: moderate evidence of pathogenicity, BP: supporting evidence of a benign impact, PVS: very strong evidence of pathogenicity, BS: strong evidence of a benign impact.

| | | | | Identified Variant | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Subject | Gene | Chromosome | Mode of Inheritance | Type | Base Change | Protein Change | Consequence | SIFT | Polyphen2 | CADD | ACMG Classification |
| 45 | *HAAO* | 2 | AR | snv | c.371T>C | p.Met124Thr | missense | tolerated (1) | benign (0) | 0.05 | Uncertain significance (PM1, PM2, BP4) |
| 70 | *ASXL3* | 18 | AR | snv | c.5560G>A | p.Val1854Ile | missense | Damaging (0.09) | Benign (0.05) | 16.5 | Uncertain significance (PM2, BP4) |
| 73 | *KRTAP5-5* | 11 | AR | insertion | c.157_158 insGAGG | p.Ala53Glyfs Ter129 | frameshift | | | 32 | Uncertain significance (PVS1, BS1) |

In subject number 70, one homozygous missense SNV on chromosome 18 in the *ASXL3* (OMIM #615115) gene was detected and inspected on IGV (Figure S1). Since the father was missing, we cannot assume that it was inherited from both parents. The c.5560G>A (NM_030632.1) on this gene predicted a p.Val1854Ile variation which was considered to be damaging by SIFT and benign by Polyphen 2.

In subject number 73, one homozygous frameshift deletion inherited from the father was detected on chromosome 2 in the *KRTAP5-5* gene and inspected using IGV (Figure S1). The c.2773C>T (NM_001001480.2) in *KRTAP5-5* gene predicted a p.Arg925Trp variation which was shown to be deleterious by SIFT and possibly damaging by Polyphen 2.

3.1.3. X-Linked Variants

In male subject number 23, a total of 2 missense SNVs inherited from the mother on chromosome X in the *SLITRK4* (OMIM #300562) and *FLNA* (OMIM #300017) genes were detected (Table 4). The c.1860A>C (NM_001184749.1) on the *SLITRK4* gene predicted a p.Leu620Phe variation which was considered to be deleterious by SIFT and benign by Polyphen2 and was inspected using IGV (Figure S1). The c.1954G>A (NM_001110556.1) in the *FLNA* gene predicted a p.Glu652Lys variation which was predicted to be tolerated by SIFT and probably damaging by Polyphen 2.

In male subject number 64, we detected 2 missense SNVs on chromosome X in *PTCHD1* (OMIM #300828) and *FLNA* (OMIM #300017) genes. The c.1804A>G (NM_173495.2) in *PTCHD1* gene predicted a p.Thr602Ala variation which was predicted to be tolerated by SIFT and probably damaging by Polyphen 2 and was inspected using IGV (Figure S1). On the *FLNA* gene, the c.2590G>T (NM_001110556.1) predicted a p.Val864Phe variation which was predicted to be deleterious by SIFT and possibly damaging by Polyphen 2. Since the mother of subject 64 is dead, we cannot assume whether these SNVs are inherited or *de novo*.

**Table 4.** List of X-linked gene variants. Variants in 4 genes were presented in the X-linked pattern of inheritance in subjects 23, 64, and 73. Two different variants on the *FLNA* gene were detected in subjects 23 and 64. XR: X-linked recessive, PM: moderate evidence of pathogenicity, PP: supporting evidence of pathogenicity, BP: supporting evidence of a benign impact.

| | Identified Variant | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Subject** | **Gene** | **Chromosome** | **Mode of Inheritance** | **Type** | **Base Change** | **Protein Change** | **Consequence** | **SIFT** | **Polyphen2** | **CADD** | **ACMG Classification** |
| 23 | *SLITRK4* | X | XR | snv | c.1860A>C | p.Leu620Phe | missense | deleterious (0) | benign (0.441) | 23.7 | Uncertain significance (PM2, PP3) |
| | *FLNA* | X | XR | snv | c.1954G>A | p.Glu652Lys | missense | tolerated (0.09) | probably damaging (0.929) | 25.3 | Uncertain significance (PM2, PP3, BP1) |
| 64 | *PTCHD1* | X | XR | snv | c.1804A>G | p.Thr602Ala | missense | tolerated (0.32) | probably damaging (0.996) | 20.9 | Uncertain significance (PM2, PP3, BP1) |
| | *FLNA* | X | XR | snv | c.2590G>T | p.Val864Phe | missense | deleterious (0) | possibly damaging (0.745) | 22.7 | Uncertain significance (PM2, PP3, BP1) |
| 73 | *NHSL2* | X | XR | snv | c.2773C>T | p.Arg925Trp | missense | deleterious (0) | possibly damaging (0.847) | 19.8 | Uncertain significance (PM5, PP2, BP1) |

In male subject number 73, we detected a missense SNV in the *NHSL2* gene inherited from the mother. The c.2773C>T (NM_001013627.2) led to p.Arg925Trp variations which was predicted to be deleterious by SIFT and possibly damaging by Polyphen 2.

### 3.2. Oligogenic Model

Our results showed that all the studied subjects had multi-hit SNVs and indels simultaneously. We detected 3 SNVs in subject 23 (Figure 3a), 2 SNVs and 1 deletion in subject 45 (Figure 3b), 2 SNVs in subject 64, whose mother was dead (Figure 3c), 1 SNV in subject 70, whose father was unknown (Figure 3d), and 2 SNVs and 1 insertion in subject 73 (Figure 3e). The homozygous SNV on the *HAAO* gene was retained since it was inherited from both parents.

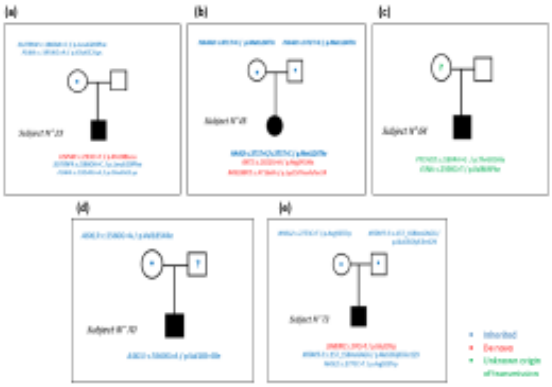



**Figure 3.** Pedigrees of the 5 subjects. (**a**) In subject number 23, 2 SNVs were inherited from the mother and 1 SNV was *de novo*. (**b**) In subject number 45, 1 SNV was inherited from both parents and 1 SNV and 1 deletion were *de novo*. (**c**) In subject number 64, 2 SNVs were detected on chromosome X. (**d**) In subject number 70, we detected 1 inherited SNV on chromosome 18 in the *ASXL3* gene. (**e**) In subject number 73, 1 SNV and 1 insertion were inherited and 1 SNV was *de novo*. Blue color represents the inherited variants, red color represents the *de novo* variants and green color represents the variants with unknown origin of transmission.

Since *de novo* gene variants have been considered a major cause of early-onset genetic disorders such as ASD [19], Pathway Studio software v12.3 (https://mammal.pathwaystudio.com/, accessed on 24 September 2020) was used to identify the cell processes related to the encoded protein of the novel *de novo* mutation in the *MIS18BP1* gene detected in our study. A biological network was created by integrating *MIS18BP1* gene in the software and the encoded protein was connected to its related cell processes (Figure 4).

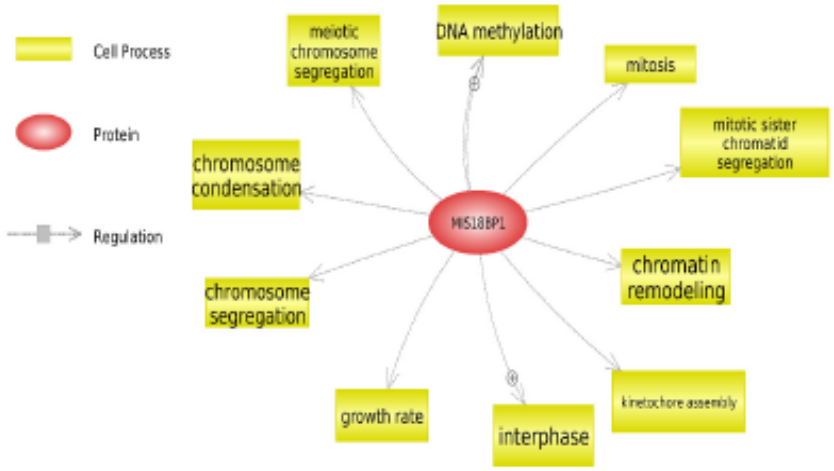



**Figure 4.** Analysis of the cell processes of the encoded protein of *MIS18BP1* gene using Pathway Studio software. A biological network was created connecting the encoded protein of *MIS18BP1* gene by the cell processes.

## 4. Discussion

This is the first study on Lebanese ASD subjects using the WES approach. Due to the high genetic heterogeneity of ASD and the complexity of inheritance, the genetic factors are not yet fully elucidated. Therefore, it is of interest to search for novel ASD candidate genes in new populations that will lead to a better understanding of the etiology based on a strict familial genotyping–phenotyping correlation approach. In our previous study, in which array CGH was used on 19 ASD subjects, we identified rare CNVs in 14 subjects in the novel candidate genes *PJA2*, *APCS*, *SYNPO*, and *TAC1*. Thus, in this study, the genomic characterization of the five ASD subjects, who did not reveal any CNVs related to ASD, with that of their parents (except the mother of subject number 64 who was dead and the father of subject 70 who was unknown) also revealed novel gene variants such as SNVs and indels. Among the novel genes, the *de novo* mutations are considered strong candidates for disease. Ten variants were successfully validated using Sanger sequencing (Figure S3). Furthermore, most of the studied subjects had more than one candidate variant observed, which speaks in favor of a multi-hit genetic model or alternatively on the benignity of some identified variants.

Despite the limited sample size in our study, none of the identified variants had been previously identified in the database of more than 500 exomes of Lebanese subjects with different forms of common and rare diseases [20]. In addition, variants in genes already reported as related to ASD (either in autism databases or in literature) were detected, reinforcing the robustness of our strategy.

Since *de novo* variants contribute to the genetic etiology of ASD, our study aimed to identify these variants. A novel *de novo* frameshift deletion on chromosome 14 was identified in the *MIS18BP1 gene* (MIS18 binding protein1), which is a mitotic regulator. It was confirmed that *MIS18BP1* is regulated via SUMO-ubiquitin crosstalk during mitosis [21]. SUMOylation plays an important role in neuronal differentiation, synapse formation con-

trol, regulation of synaptic transmission and cell survival [22]. Furthermore, the ubiquitin pathway regulates neurotransmitter release, synaptic vesicle recycling, and changes in post synaptic density and dendritic spines [23]. Using Pathway Studio software, cell processes related to the encoded protein of the *MIS18BP1* gene were presented (Figure 4). Chromatin remodeling and DNA methylation, two of the identified processes, are important in human brain development that can be regulated by *MIS18BP1*, strengthening its potential role in ASD [24]. Subject 45, who is epileptic and has a speech delay, had a deletion in the *MIS18BP1* gene. In fact, it has been reported that DNA methylation and chromatin remodeling have been linked to the development of epilepsy [25,26]. Furthermore, variations in mitotic genes which are responsible for kinetochore assembly, chromosome segregation, and condensation can trigger the onset of neurodevelopmental disorders by insufficient cell proliferation and failure in neuronal stem cell replenishment, leading to the underdevelopment of the central nervous system [27]. An important chromatin remodeler, *CDC42* (Cell Division Cycle 42), interacts with the encoded protein of *MIS18BP1* gene [28]. Furthermore, the encoded protein of *CDC42BPB* (CDC42 Binding Protein Kinase Beta) gene is a downstream effector of *CDC42*. *CDC42BPB* gene was identified as ASD risk gene in a study using WES and subsequent transmission and *de novo* association (TADA) analysis [8].

In addition, three *de novo* missense SNVs were detected in the following genes: *USP46, KRT2*, and *LSMEM2*. The deubiquitinating enzyme encoded by the *USP46* gene is specific for the Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPARs). These receptors are the primary mediators for neuronal development and communication and play a substantial role in learning and memory [29]. A deletion in 4q12 involving the *USP46* gene was identified in a female ASD subject in a study on Italian families using oligo array CGH [30].

Two novel missense SNVs were detected in the *SLITRK4* (SLIT and NTRK Like Family Member 4) and *NHSL2* (NHS-Like Protein 2) genes on chromosome X in male subjects 23 and 73, respectively. *SLITRKs* family are transmembrane proteins from the leucine-rich repeat (LRR) superfamily. They are expressed in the central nervous system and participate in neurite outgrowth, neuronal survival, and dendritic elaboration [31]. *NHSL2* gene is a member of the Nance–Horan syndrome (NHS) gene family. Nance-Horan syndrome is an X-linked developmental disorder characterized by intellectual disability, cataracts, and physical and teeth abnormalities [32]. In a study performed on three NHS families, one affected male had severe mental retardation, epilepsy, and hypotonia [33]. In the same study, *NHS* expression was detected in fetal brain, lung, kidney, and thymus, and was largely expressed throughout brain development.

Furthermore, some of the inherited gene variants concerned genes that have been already reported in the literature and may represent strong candidates for ASD. On chromosome X, four missense SNVs were detected involving *FLNA* and *PTCHD1* genes in male subjects 23 and 64. In subjects 23 and 64, two SNVs in *FLNA* (Filamin A) gene were detected. This gene encodes an actin-binding protein which links actin filaments to membrane glycoproteins. In a chromosomal microarray analysis study performed on 195 ASD subjects of Greek origin, a deletion in the *FLNA* gene was found in a subject with ASD, seizures, and dysmorphic features [34]. In addition, the encoded protein of the *PTCHD1* (Patched domain containing 1) gene is a membrane protein with a patched domain. This gene is required for the thalamic reticular nucleus (TRN) development and function. This part of the thalamus is essential for sleep rhythm generation, attention, and sensorimotor processing. In addition, *PTCHD1* interacts with the postsynaptic membrane to provide a direct link with the excitatory synaptic network [35]. A genome-wide assessment for structural abnormalities performed on 427 unrelated ASD patients identified novel loci in the *PTCHD1* gene, which led to it being an ASD susceptibility gene [36]. Moreover, a study conducted on 23 subjects with *PTCHD1* deletions or truncating mutations supported that these gene mutations were the cause of an X-linked non-syndromic neurodevelopmental disorder which has the features of intellectual disability and ASD [37].

On chromosome 2 and 18, two homozygous missense SNVs were detected on the *HAAO* and *ASXL3* genes. Subject 45 was homozygous for the SNV on the *HAAO* (3-Hydroxyanthranilate 3,4-Dioxygenase) gene (Figure 3b). In this case, the combination of the two inherited alleles led to the phenotype since the parents were unaffected. The expression of the *HAAO* gene was previously found to be reduced in ASD subjects [38]. This gene encodes a protein belonging to the intramolecular dioxygenases family which exists in low amounts in the central nervous system. The *HAAO* enzyme catalyzes the synthesis of quinolic acid, which is an excitotoxin. High cerebral levels of this acid may participate in neurologic and inflammatory disorder pathogenesis. Moreover, the *ASXL3* (ASXL Transcriptional Regulator 3) gene encodes an important protein for the regulation of gene transcription. Its encoded protein may also inhibit histone de-ubiquitination. In a WES study performed aiming to uncover the susceptibility genes contributing to ASD, a mutation was found in the *ASXL3* gene in ASD patients with intellectual disability [39].

The WES approach only sequences the coding regions of the genome. Moreover, like other WES studies, one of the potential limitations is the exclusion of causative variants by a stringent filtering approach to remove false positives. Due to the relatively small sample size in our study and the aim of only investigating rare genetic variations, statistical and functional analyses were not performed. However, our findings need to be validated by further functional studies and more robust genetic findings can be obtained from future studies with enlarged sample sizes.

## 5. Conclusions

In our study, using the WES technique for the first time in the Lebanese population, we identified one novel *de novo* mutation in the *MIS18BPB1* gene and two other novel inherited mutations in the *SLITRK4* and *NHSL2* as potential ASD candidate genes. In addition, our results confirmed the presence of other *de novo* and inherited genetic variations that have been previously described and are shared between Lebanese ASD subjects and other studied populations with ASD. Accordingly, our observations provide a further argument for frequent polygenic models in ASD composed of several inherited and *de novo* variants. However, further research work (including functional studies) is essential to reinforce and validate our findings and to strengthen their implication in the pathology.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes13020186/s1. Figure S1: Integrated Genome Browser visualization (IGV) of the variants; Figure S2: Sanger validation of the candidate variants; Table S1: Primer sequences for amplification and sequencing of the candidate genes regions containing the variants.

**Author Contributions:** W.H., C.R.A., G.N. and T.B. conceived and designed the project. P.G., T.B. and W.H. recruited the subjects. P.G., T.B., G.N., F.L. and S.M. performed the experiments. All the authors analyzed the data and discussed the results. P.G. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This project was funded by the National Council for Scientific Research in Lebanon (CNRSL) S/3541, the Higher Center for Research of the Holy Spirit University of Kaslik (HCR-USEK) 90010141 and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

**Institutional Review Board Statement:** This study was performed in line with the ethical standards and guidelines declared by the Declaration of Helsinki in 1964 and its later amendments and was approved by the Holy Spirit University Ethical Committee (delivered on 13 August 2014 and renewed on 9 January 2019).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. All parents of the participants provided informed consent for publication.

**Data Availability Statement:** The datasets generated and analyzed during the current study are available in the European Variation Archive (EVA) repository under the accession number PRJEB44446 at https://www.ebi.ac.uk/eva/, accessed on 1 December 2021.

**Acknowledgments:** We thank all the non-governmental organizations and associations that care for subjects with autism and graciously shared their data with us.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no competing interest.

## References


1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed.; American Psychiatric Association: Arlington, VA, USA, 2013.
2. Baio, J.; Wiggins, L.; Christensen, D.L.; Maenner, M.J.; Daniels, J.; Warren, Z.; Kurzius-Spencer, M.; Zahorodny, W.; Robinson Rosenberg, C.; White, T.; et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill. Summ.* **2018**, *67*, 1–23. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5919599/ (accessed on 7 March 2020). [CrossRef] [PubMed]
3. Maenner, M.J. Prevalence of Autism Spectrum Disorder among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR Surveill. Summ.* **2020**, *69*, 1–12. Available online: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/ss/ss6904ahtm (accessed on 15 February 2021). [CrossRef] [PubMed]
4. Chaaya, M.; Saab, D.; Maalouf, F.T.; Boustany, R. Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Nurseries in Lebanon: A Cross Sectional Study. *J. Autism Dev. Disord.* **2016**, *46*, 514–522. Available online: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10803-015-2590-7 (accessed on 11 March 2020). [CrossRef] [PubMed]
5. Sandin, S.; Lichtenstein, P.; Kuja-Halkola, R.; Hultman, C.; Larsson, H.; Reichenberg, A. The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA* **2017**, *318*, 1182–1184. [CrossRef]
6. SFARI | Simons Foundation Autism Research Initiative. Available online: https://www.sfari.org/ (accessed on 3 March 2020).
7. Satterstrom, F.K.; Kosmicki, J.A.; Wang, J.; Breen, M.S.; De Rubeis, S.; An, J.; Peng, M.; Collins, R.; Grove, J.; Klei, L.; et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell* **2020**, *180*, 568–584. [CrossRef]
8. De Rubeis, S.; He, X.; Goldberg, A.P.; Poultney, C.S.; Samocha, K.; Cicek, A.E.; Kou, Y.; Liu, L.; Fromer, M.; Walker, S.; et al. Synaptic, Transcriptional and Chromatin Genes Disrupted in Autism. *Nature* **2014**, *515*, 209–215. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4402723/ (accessed on 12 February 2020). [CrossRef]
9. Hnoonual, A.; Thammachote, W.; Tim-Aroon, T.; Rojnueangnit, K.; Hansakunachai, T.; Sombuntham, T.; Roongpraiwan, R.; Worachotekamjorn, J.; Chuthapisith, J.; Fucharoen, S.; et al. Chromosomal Microarray Analysis in a Cohort of Underrepresented Population Identifies SERINC2 as a Novel Candidate Gene for Autism Spectrum Disorder. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12096. Available online: https://www.nature.com/articles/s41598-017-12317-3 (accessed on 27 September 2019). [CrossRef]
10. Huguet, G.; Ey, E.; Bourgeron, T. The Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorders. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2013**, *14*, 191–213. Available online: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genom-091212-153431 (accessed on 1 October 2019). [CrossRef]
11. O'Roak, B.J.; Deriziotis, P.; Lee, C.; Vives, L.; Schwartz, J.J.; Girirajan, S.; Karakoc, E.; Mackenzie, A.P.; Ng, S.B.; Baker, C.; et al. Exome Sequencing in Sporadic Autism Spectrum Disorders Identifies Severe *de Novo* Mutations. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 585–589. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572417 (accessed on 1 October 2019). [CrossRef]
12. Bitar, T.; Hleihel, W.; Marouillat, S.; Vonwill, S.; Vuillaume, M.; Soufia, M.; Vourc'h, P.; Laumonnier, F.; Andres, C.R. Identification of Rare Copy Number Variations Reveals PJA2, APCS, SYNPO, and TAC1 as Novel Candidate Genes in Autism Spectrum Disorders. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2019**, *7*, e786. Available online: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/1002/mgg786 (accessed on 1 October 2019). [CrossRef]
13. Iossifov, I.; Ronemus, M.; Levy, D.; Wang, Z.; Hakker, I.; Rosenbaum, J.; Yamrom, B.; Lee, Y.; Narzisi, G.; Leotta, A.; et al. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* **2012**, *74*, 285–299. [CrossRef] [PubMed]
14. Kopanos, C.; Tsiolkas, V.; Kouris, A.; Chapple, C.E.; Albarca Aguilera, M.; Meyer, R.; Massouras, A. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 1978–1980. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6546127/ (accessed on 13 September 2020). [CrossRef] [PubMed]
15. Vaser, R.; Adusumalli, S.; Leng, S.N.; Sikic, M.; Ng, P.C. SIFT missense predictions for genomes. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
16. Adzhubei, I.A.; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V.E.; Gerasimova, A.; Bork, P.; Kondrashov, A.S.; Sunyaev, S.R. A Method and Server for Predicting Damaging Missense Mutations. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 248–249. [CrossRef] [PubMed]
17. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Wenger, A.M.; Zehir, A.; Mesirov, J.P. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, e31–e34. [CrossRef] [PubMed]
18. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4544753/ (accessed on 30 May 2020). [CrossRef]
19. Acuna-Hidalgo, R.; Veltman, J.A.; Hoischen, A. New Insights into the Generation and Role of *de Novo* Mutations in Health and Disease. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 241. Available online: https://search.datacite.org/works/1186/s13059-016-1110-1 (accessed on 24 September 2020). [CrossRef]

20. Refaat, M.M.; Hassanieh, S.; Ballout, J.A.; Zakka, P.; Hotait, M.; Khalil, A.; Bitar, F.; Arabi, M.; Arnaout, S.; Skouri, H.; et al. Non-familial cardiomyopathies in Lebanon: Exome Sequencing Results for Five Idiopathic Cases. *BMC Med. Genom.* **2019**, *12*, 33. Available online: https://search.datacite.org/works/1186/s12920-019-0478-7 (accessed on 24 September 2020). [CrossRef]
21. Cuijpers, S.A.G.; Willemstein, E.; Vertegaal, A.C.O. Converging Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) and Ubiquitin Signaling: Improved Methodology Identifies Co-modified Target Proteins. *Mol. Cell. Proteom.* **2017**, *16*, 2281–2295. Available online: https://search.datacite.org/works/1074/mcp.tir000152 (accessed on 19 December 2021). [CrossRef]
22. Henley, J.M.; Craig, T.J.; Wilkinson, K.A. Neuronal SUMOylation: Mechanisms, Physiology, and Roles in Neuronal Dysfunction. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 1249–1285. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187031/ (accessed on 23 September 2020). [CrossRef]
23. Glessner, J.T.; Wang, K.; Cai, G.; Korvatska, O.; Kim, C.E.; Wood, S.; Zhang, H.; Estes, A.; Brune, C.W.; Bradfield, J.P.; et al. Autism Genome-Wide Copy Number Variation Reveals Ubiquitin and Neuronal Genes. *Nature* **2009**, *459*, 569–573. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2925224/ (accessed on 23 September 2020). [CrossRef]
24. LaSalle, J.M. Autism Genes Keep Turning Up Chromatin. *OA Autism* **2013**, *1*, 14. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3882126/ (accessed on 23 September 2020). [CrossRef] [PubMed]
25. Jesus-Ribeiro, J.; Pires, L.M.; Melo, J.D.; Ribeiro, I.P.; Rebelo, O.; Sales, F.; Freire, A.; Melo, J.B. Genomic and Epigenetic Advances in Focal Cortical Dysplasia Types I and II: A Scoping Review. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 580357. [CrossRef] [PubMed]
26. Conboy, K.; Henshall, D.C.; Brennan, G.P. Epigenetic Principles Underlying Epileptogenesis and Epilepsy Syndromes. *Neurobiol. Dis.* **2021**, *148*, 105179. Available online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096999612030454X (accessed on 19 December 2021). [CrossRef] [PubMed]
27. Degrassi, F.; Damizia, M.; Lavia, P. The Mitotic Apparatus and Kinetochores in Microcephaly and Neurodevelopmental Diseases. *Cells* **2019**, *9*, 49. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016623/ (accessed on 19 December 2021). [CrossRef]
28. Lagana, A.; Dorn, J.F.; Rop, V.D.; Ladouceur, A.; Maddox, A.S.; Maddox, P.S. A Small GTPase Molecular Switch Regulates Epigenetic Centromere Maintenance by Stabilizing Newly Incorporated CENP-A. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 1186–1193. Available online: https://www.nature.com/articles/ncb2129 (accessed on 26 September 2020). [CrossRef]
29. Huo, Y.; Khatri, N.; Hou, Q.; Gilbert, J.; Wang, G.; Man, H. The Deubiquitinating Enzyme USP46 Regulates AMPA Receptor Ubiquitination and Trafficking. *J. Neurochem.* **2015**, *134*, 1067–1080. Available online: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/1111/jnc.13194 (accessed on 25 February 2021). [CrossRef]
30. Mafalda, M.; Marco, C.D.; Canitano, R.; Buoni, S.; Frullanti, E.; Mencarelli, M.A.; Veronica, B.; Amabile, S.; Radice, L.; Baldassarri, M.; et al. A Genome Wide Copy Number Variations Analysis in Autism Spectrum Disorder (Asd) and Intellectual Disability (Id) in Italian Families. *J. Genet. Syndr. Gene Ther.* **2016**, *7*, 2. [CrossRef]
31. Proenca, C.C.; Gao, K.P.; Shmelkov, S.V.; Rafii, S.; Lee, F.S. Slitrks as Emerging Candidate Genes Involved in Neuropsychiatric Disorders. *Trends Neurosci.* **2011**, *34*, 143–153. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3051006/ (accessed on 23 September 2020). [CrossRef]
32. Brooks, S.P.; Coccia, M.; Tang, H.R.; Kanuga, N.; Machesky, L.M.; Bailly, M.; Cheetham, M.E.; Hardcastle, A.J. The Nance-Horan Syndrome Protein Encodes a Functional WAVE Homology Domain (WHD) and is Important for Co-Ordinating Actin Remodelling and Maintaining Cell Morphology. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 2421–2432. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332100 (accessed on 23 September 2020). [CrossRef]
33. Brooks, S.P.; Ebenezer, N.D.; Poopalasundaram, S.; Lehmann, O.J.; Moore, A.T.; Hardcastle, A.J. Identification of the gene for Nance-Horan syndrome (NHS). *J. Med. Genet.* **2004**, *41*, 768. [CrossRef] [PubMed]
34. Oikonomakis, V.; Kosma, K.; Mitrakos, A.; Sofocleous, C.; Pervanidou, P.; Syrmou, A.; Pampanos, A.; Psoni, S.; Fryssira, H.; Kanavakis, E.; et al. Recurrent copy number variations as risk factors for autism spectrum disorders: Analysis of the clinical implications. *Clin. Genet.* **2016**, *89*, 708. [CrossRef] [PubMed]
35. Ung, D.C.; Iacono, G.; Meziane, H.; Blanchard, E.; Papon, M.A.; Selten, M.; Rhijn, J.R.v.; Montjean, R.; Rucci, J.; Martin, S.; et al. Ptchd1 Deficiency Induces Excitatory Synaptic and Cognitive Dysfunctions in Mouse. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 1356–1367. Available online: https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:repository.ubn.ru.nl:2066%2F193089 (accessed on 23 September 2020). [CrossRef]
36. Marshall, C.R.; Noor, A.; Vincent, J.B.; Lionel, A.C.; Feuk, L.; Skaug, J.; Shago, M.; Moessner, R.; Pinto, D.; Ren, Y.; et al. Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *82*, 477–488. [CrossRef] [PubMed]
37. Chaudhry, A.; Noor, A.; Degagne, B.; Baker, K.; Bok, L.A.; Brady, A.F.; Chitayat, D.; Chung, B.H.; Cytrynbaum, C.; Dyment, D.; et al. Phenotypic Spectrum Associated with PTCHD1 Deletions and Truncating Mutations Includes Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorder. *Clin. Genet.* **2015**, *88*, 224–233. Available online: https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:cris.maastrichtuniversity.nl:publications%2F8ce2b8ca-830a-46a3-b59d-1fd464489405 (accessed on 23 September 2020). [CrossRef]
38. Boccuto, L.; Chen, C.; Pittman, A.R.; Skinner, C.D.; McCartney, H.J.; Jones, K.; Bochner, B.R.; Stevenson, R.E.; Schwartz, C.E. Decreased Tryptophan Metabolism in Patients with Autism Spectrum Disorders. *Mol. Autism* **2013**, *4*, 16. Available online: https://search.datacite.org/works/1186/2040-2392-4-16 (accessed on 3 February 2021). [CrossRef]
39. Husson, T.; Lecoquierre, F.; Cassinari, K.; Charbonnier, C.; Quenez, O.; Goldenberg, A.; Guerrot, A.; Richard, A.; Drouin-Garraud, V.; Brehin, A.; et al. Rare Genetic Susceptibility Variants Assessment in Autism Spectrum Disorder: Detection Rate and Practical Use. *Transl. Psychiatry* **2020**, *10*, 77. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7039996/ (accessed on 3 February 2021). [CrossRef]

### *2.2.3 Expression du gène MIS18BP1 dans le cortex de souris par RT qPCR : in vitro vs in vivo*

#### 2.2.3.1 Principe

Nous avons étudié l'expression du gène *MIS18BP1* dans le cortex de souris. Des ARN ont été extraits à l'aide du kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, R2052). Ensuite une RT qPCR a été effectuée, en faisant la PCR classique en présence d'un agent fluorescent le SYBR Green®. La fluorescence est détectée à chaque cycle car le SYBR Green s'intercale dans l'ADN double brin. La fluorescence détectée est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Les valeurs brutes obtenues correspondent au point d'intersection entre la ligne de la dérivée seconde correspondant à l'amplification de l'ADN et la droite qui correspond au bruit du fond. Elles sont exprimées en Cp c'est-à-dire le crossing point qui représente le nombre de cycles nécessaire pour arriver à une valeur seuil.

Premièrement, la préparation d'une gamme étalon se fait en utilisant un ADN contrôle afin d'établir une droite standard pour les amorces. Le but derrière l'élaboration de cette gamme est le contrôle de l'efficacité de la PCR et la détermination de l'échelle de mesure pour la quantification de l'ensemble des échantillons pour un couple d'amorce spécifique. Ensuite, la quantification relative du gène cible par détermination des Cp sera effectuée. Elle est exprimée par rapport à un gène de référence traité avec le même échantillon d'ADN.

Pour chaque étude, les couples d'amorces sont choisis de façon à obtenir des amplicons compris entre 100 et 250 paires de bases, avec un maximum de trois C ou G présent à l'extrémité 3' des amorces et une température de fusion prédite de 60°C. Le choix se fait en utilisant le logiciel Primer3Plus et la spécificité des amplicons choisis sera testée par le logiciel BLAST.

L'efficacité de la qPCR est un facteur crucial pour la reproductibilité des résultats. Pour déterminer l'efficacité sur un échantillon d'ADN, la qPCR est réalisée sur une série de dilutions croissantes qui donnent une courbe d'étalonnage. Elle est ensuite obtenue en effectuant une régression linéaire sur le logiciel LightCycler®480 (Roche), et elle est calculée par l'équation suivante :

$$E = 10^{\frac{-1}{pente}}$$

***E :*** l'efficacité, qui doit être égale à 2 si la PCR est efficace à 100%

***Pente :*** calculée pour la droite de régression de la courbe étalon et doit être égale à environ -3,32 si la PCR est efficace à 100%.

La qualité des couples d'amorces choisis doit être contrôlée par une analyse des courbes de fusion qui sont générées à la fin de la qPCR suite à une mesure de la fluorescence pendant la dernière étape de dénaturation réalisée à 97 °C où un seul pic par paire d'amorces doit être observé.

Ensuite les valeurs brutes des Cp seront calculées à l'aide du logiciel LightCycler®480 II (Roche). Ensuite, les résultats seront exprimés en quantité relative par rapport aux gènes de référence choisis. Pour signaler une amplification acceptable, le Cp doit être inférieure à 30.

#### 2.2.3.2 Méthodes

**1. Dissection**

Toutes les procédures animales réalisées à l'Université de Tours/INSERM sont agréées par le Ministère de la Recherche. Pour la procédure de dissection, les souris de type sauvage à P17,5; P25 et adulte ont été sacrifiée par décapitation à l'aide des ciseaux. Ensuite, la tête et le cou ont été désinfectées avec 70% d'éthanol pour faire une incision médiane, postérieure à antérieure, le long du scalp pour révéler le crâne qui a été ensuite coupé soigneusement du cou vers le nez. Deux coupes supplémentaires, postérieure et antérieure, ont été réalisées pour permettre un meilleur accès au cerveau (Figure 12). À l'aide de la pince à pointe plate, le cerveau a été retiré et placé dans un plat de dissection déposé sur la glace et rempli du PBS froid (Phosphate-buffered saline) (Figure 13, 14A). Puis, les bulbes olfactifs et le cervelet ont été retirés à l'aide de la pince à dissection (Figure 14B). Afin de récupérer le cortex, une incision médiane entre les deux hémisphères a été effectuée et la structure en forme de plaque du cortex frontal et pariétal a été décollée (Figure 14C). Les méninges ont été enlevées avec une pince fine (Figure 14D, D', E). Enfin, chaque cortex a été coupé en petits morceaux à l'aide d'une lame tranchante.

Pour les embryons à E17, la même procédure de dissection a été suivi mais sous un stéréo-microscope. Les souris embryonnaires ont été récupérées par une incision médiane de l'abdomen, après désinfection avec l'éthanol, des souris adultes gestantes qui ont été tuées dans l'étape précédente



**Figure 12** : Photo de la tête de la souris avant le retrait du cerveau du crâne.

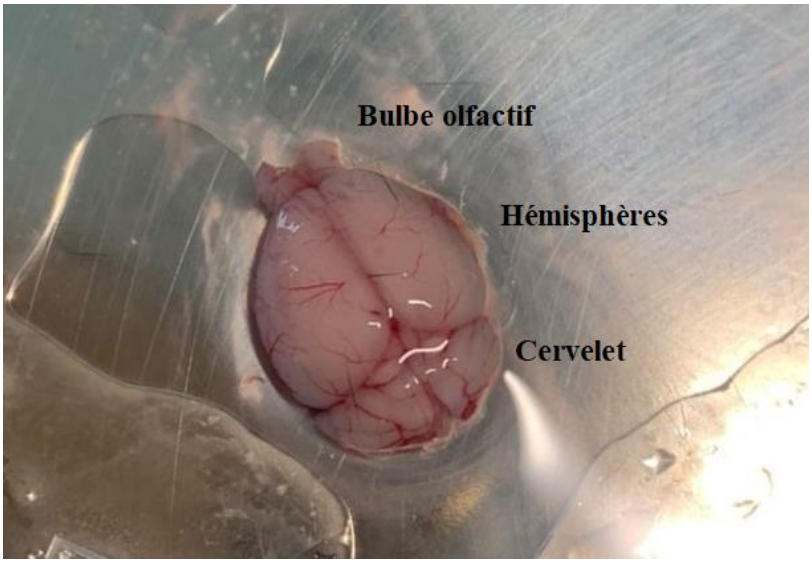



**Figure 13 :** Photo du cerveau total de la souris à P17,5 avant l'isolation du cortex.

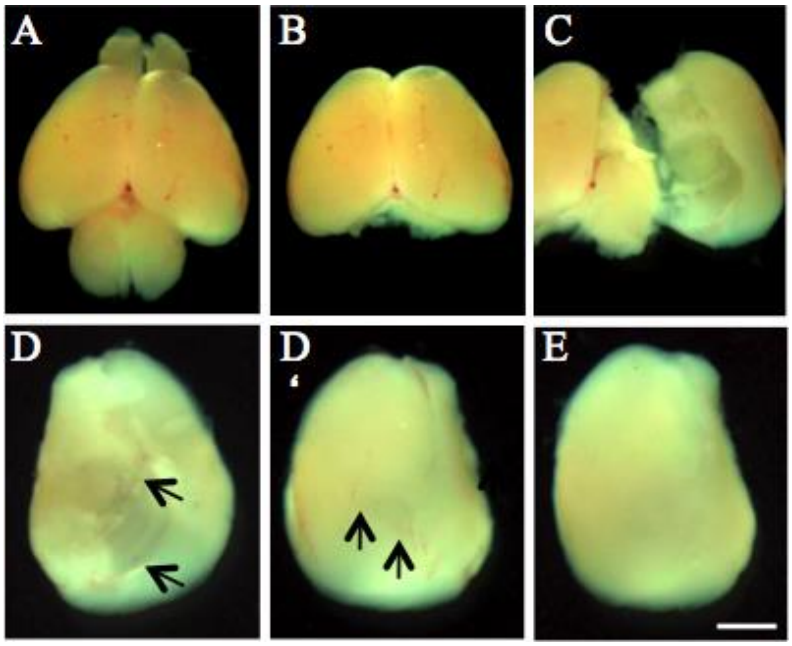



**Figure 14 :** Dissection du cortex de souris postnatal (P3). A) Cerveau entier. B) Cerveau après ablation des bulbes olfactifs et du cervelet. C) Isolement des cortex en décollant la structure en forme de plaque du cortex du cerveau. D, D') Cortex du site ventral et dorsal avec méninges indiqués par les flèches noires. E) Cortex sans méninges. (Schildge et al., 2013) (Illustration tirée du papier de Schildge et al., 2013 en raison de l'incapacité de prendre des photos durant la procédure de dissection).

## 2. Culture cellulaire

Les tissus corticaux à E17,5 seulement ont été incubés avec de la papaïne (10 U/ml; Worthington) à 37°C pendant 22 minutes. Une dissociation mécanique des cellules a été réalisée dans du DMEM : F12 (Gibco, 31331093) avec 10% de FBS (Eurobio, CVFSVF06-01) suivie d'une centrifugation à 250g pendant 5 minutes. Après la centrifugation, les culots de cellules ont été remis en suspension dans du Neurobasal Plus (Gibco, A3582901) avec de B27 Plus (Gibco A35828-01) 1X et de L-glutamine (0,5 mM, Gibco, 25030149). Des lamelles en verre recouvertes de Poly-D-lysine (Sigma, P7280) et de laminine (4 µg/ml ; Gibco, 23017-015) ont été utilisées pour mettre en culture les neurones corticaux dissociés avec une densité de 400 cellules par mm². La moitié du milieu a été changée deux fois par semaine.

## 3. Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

L'ARN total a été isolé des cultures de neurones corticaux aux DIV 7, 12 et 18 avec n=4, et des tissus à E17, P25 et à l'âge adulte avec n=3, à l'aide du kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, R2052) conformément aux instructions du fabricant. Ces cultures ont été lavées avec du PBS glacé avant l'ajout du réactif TRIzol. Pour les tissus à E17, P25 et à l'âge adulte, un petit morceau de chaque cortex a été broyé avec 500µL de TRIzol dans un tube à billes à l'aide du broyeur Ozyme. Ensuite, tous les échantillons ont été traités de la même manière. Après centrifugation, l'éthanol (95-100%) a été ajouté au surnageant, mélangé soigneusement dans la colonne Zymo-Spin et centrifugé. Un traitement DNase I a été fait suivi d'une incubation de 15 minutes à la température ambiante. Les tampons Direct-zol RNA PreWash et RNA Wash ont été ajoutés avec une centrifugation supplémentaire. De l'eau libre de DNase/RNase a été directement ajoutée à la matrice de la colonne qui a été centrifugée pour éluer l'ARN. Ensuite, les ARN ont été testés pour la pureté et la concentration sur un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

L'ADNc a été ensuite synthétisé par reverse transcription à partir de 200ng d'ARN contenu dans un volume final de 20 µL à l'aide du kit SensiFAST (Meridian Bioscience) en suivant les instructions du fabricant. Le programme d'amplification a été réalisé à l'aide du thermocycleur T100 (Laboratoires Bio-Rad). Il a été lancé à 25°C pendant 10 minutes suivi de 42°C pendant

30 minutes et 85°C pendant 5 minutes. L'ADNc a été stocké à -20 °C pour une utilisation future.

### 4. Sélection de gènes de référence et désign d'amorces

Pour tester l'expression du *MIS18BP1* dans les différentes cultures de cortex et les tissus corticaux, nous avons désigné des amorces PCR de souris pour l'ADNc à l'aide des logiciels : UCSC Genome Browser, Primer3Plus (https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) et BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). De plus, trois amorces PCR ont été utilisées pour les gènes de référence : *GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *SDHA* (Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A) et *CYC1* (Cytochrome C1). (Tableau 5)

**Tableau 5 :** Liste des amorces utilisés pour la RT qPCR

| Gène | Amorce F (5'-3') | Amorce R (5'-3') | Taille des amplicons (pb) | Localisation des amorces |
|---|---|---|---|---|
| *MIS18BP1* | ATCACCACAGGGTGAACACA | CTTTGAAATGCACGAAGCTG | 181 | Exon 2 – Exon 3 |
| *GAPDH* | CTGCACCACCAACTGCTTAG | GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT | 108 | Exon 4 – Exon 5 |
| *SDHA* | CTTGAATGAGGCTGACTGTG | ATCACATAAGCTGGTCCTGT | 87 | Exon 15 |
| *CYC1* | TTCCCTGCTCACTGGCTACT | GGGGTGCCATCATCATACTC | 144 | Exon 5 – Exon 6 |

### 5. PCR quantitative et calculs d'efficacité des amorces

L'efficacité de la paire d'amorces *MIS18BP1* a été testée en utilisant des dilutions en série de 5 fois d'ADNc et calculée en utilisant l'équation de l'efficacité. Une gamme d'ADN avec des concentrations variantes de 0,08ng à 50ng a été testée en présence du couple d'amorces du *MIS18BP1*. Des réactions PCR quantitatives ont été réalisées en utilisant le SYBR Green (Takyon No ROX SYBR® MasterMix blue dTTP) sur un LightCycler®480 II (Roche). Le milieu réactionnel contenait : 10ng d'ADNc, 1µL d'amorces sens et antisens (10pmol) et 5µL de SYBR Green dans un volume final de 10 µL pour chaque échantillon. Le programme d'amplification a été initié par une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes suivi de 45 cycles avec une dénaturation à 95°C pendant 10 secondes et une élongation à 60°C de 10 secondes.

Pour obtenir les courbes de fusion, un cycle thermique supplémentaire a été réalisé avec une plage de température comprise entre 65°C et 97°C. Les réactions pour chaque gène ont été faites en duplicata.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

### 2.2.3.3 Résultats et conclusion

La RT qPCR a été utilisée pour suivre l'expression du gène *MIS18BP1*, identifié dans notre étude génétique, dans le cortex de souris à différents stades du développement.

Les conditions optimales pour la qPCR ont été déterminées pour le couple d'amorces du gène *MIS18BP1*. L'efficacité a été déterminée avec 5 dilutions d'ADN choisi à partir d'échantillon de cultures corticales. Les paramètres sont présentés dans la figure 15. Les efficacités de la qPCR se situent entre 2,057 et 2,093 et la pente entre -3,117 et -3,192, ce qui est satisfaisant.

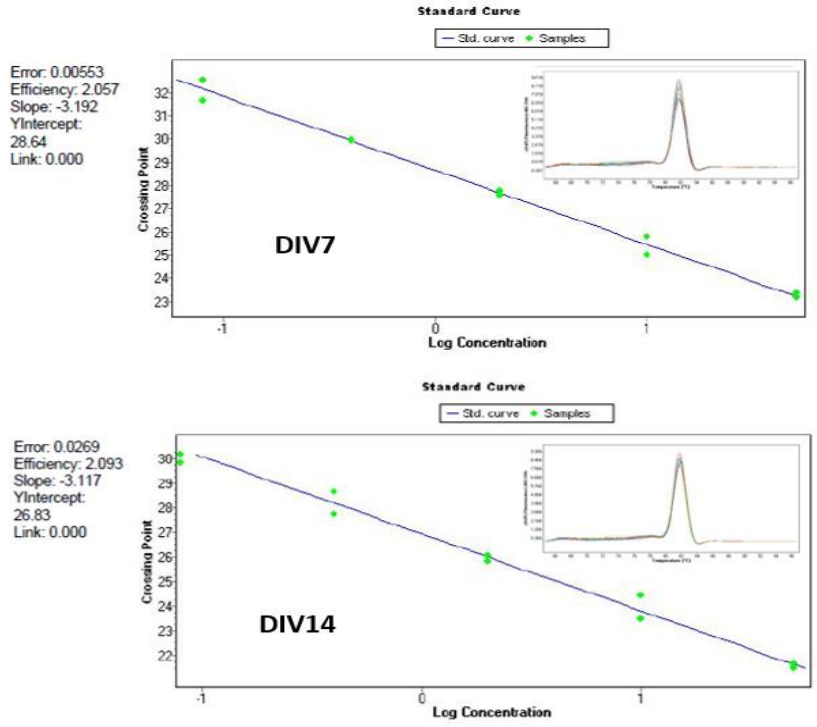


**Figure 15 :** Paramètres de la qPCR pour le gène étudié. Détermination de l'efficacité de la qPCR avec une gamme de 5 dilutions d'ADN avec des concentrations variables. Les courbes standards de chaque échantillon sont présentées et en encart, les courbes de fusion des produits d'amplification.

Ensuite, les courbes de fusion, du gène cible et des gènes de référence, issues de la qPCR des cultures et des tissus corticaux indiquent un produit d'amplification unique pour chaque échantillon, et une fluorescence importante avec des faibles variations entre les échantillons (Figure 16, 17, 18, 19).

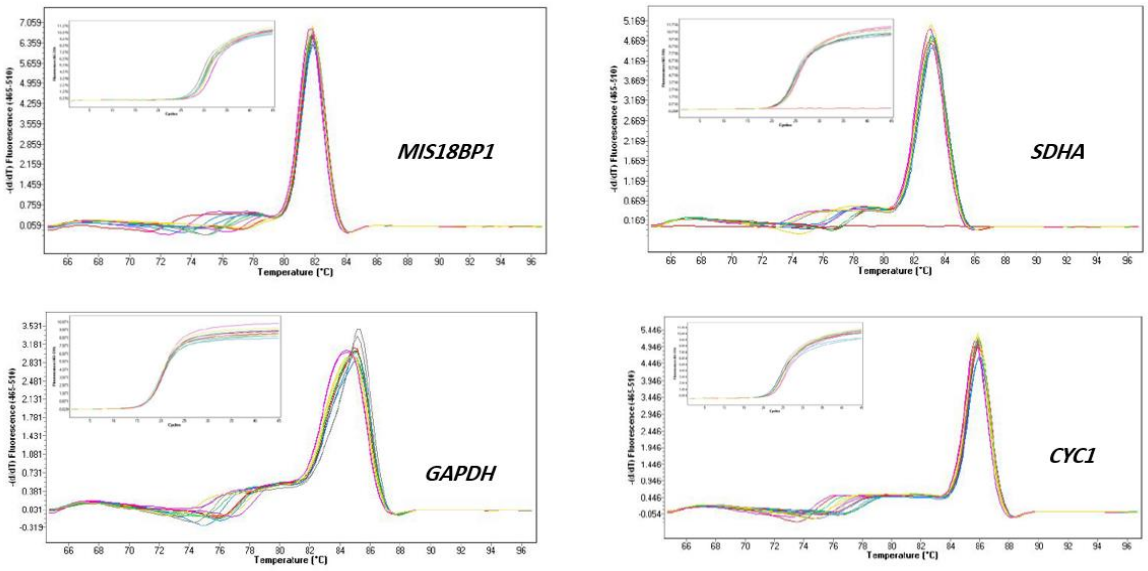



**Figure 16 :** Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène *MIS18BP1* et des gènes de référence *GAPDH, SDHA* et *CYC1* dans les cultures faites à partir du cortex de la première et de la deuxième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR.

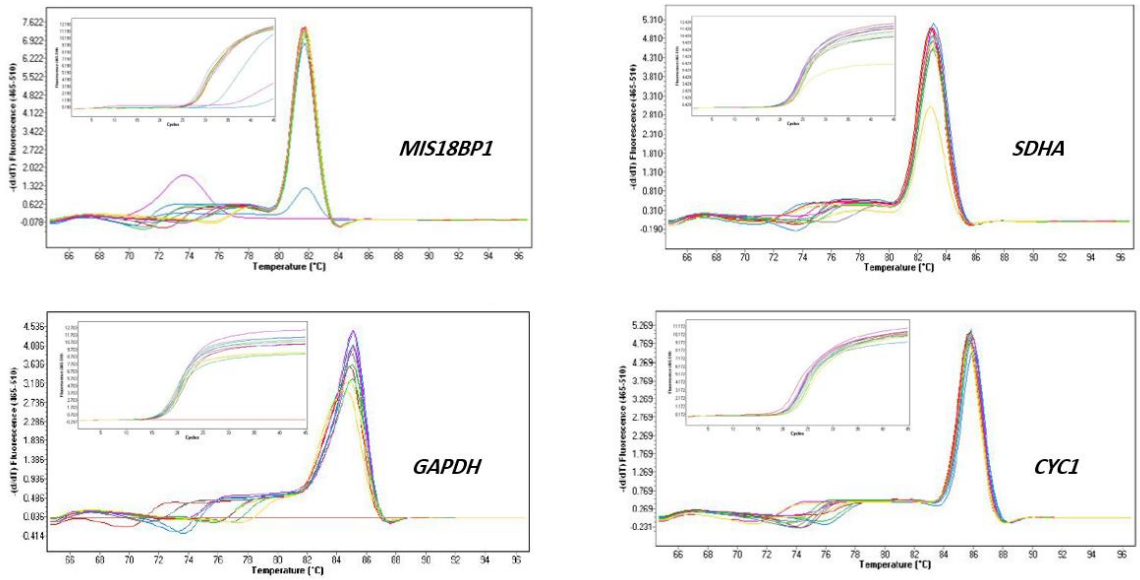



**Figure 17** : Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène *MIS18BP1* et des gènes de référence *GAPDH, SDHA* et *CYC1* dans les cultures faites à partir du cortex de la troisième et la quatrième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR.

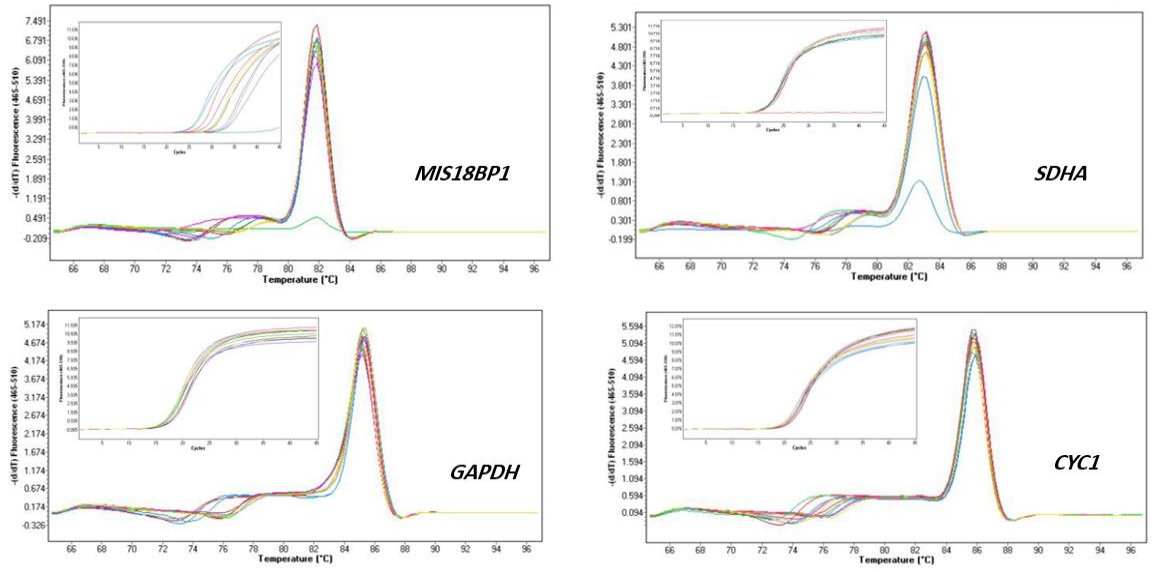



**Figure 18 :** Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène *MIS18BP1* et des gènes de référence *GAPDH, SDHA* et *CYC1* dans les tissus de cortex pris de la première et la deuxième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR.

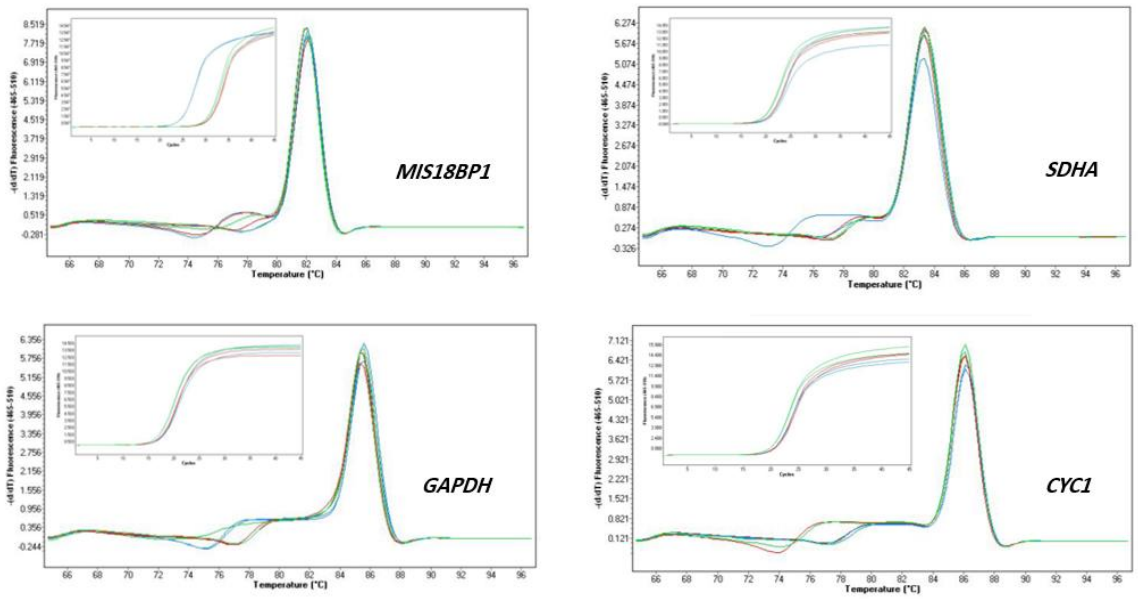



**Figure 19 :** Les courbes de fusion et en encart, les courbes d'amplification des produits amplifiés du gène *MIS18BP1* et des gènes de référence *GAPDH, SDHA* et *CYC1* dans le tissu de cortex pris de la troisième souris. Les courbes de fusion de chaque produit amplifié présentent un seul pic de fusion qui montre la pureté des produits de PCR.

Les Cp issues de la qPCR de l'ensemble des échantillons de culture et de tissu montrent que : dans les cultures à DIV7, 12 et 18, le gène a été fortement exprimé à DIV12 par rapport à DIV7 et DIV18, d'autre part, dans les tissus corticaux à E17, P25 et l'âge adulte, le gène a été fortement exprimé à E17 pour tous les échantillons par rapport à P25 et aux adultes. (Figure 20, Figure 21)

**In vitro**

| Sample name | Target | References | Target Cp Mean | Reference Cp Mean | Ratios Target/Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| Culture 1 DIV7 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 27.48 | 19.76 | 4.75E-3 |
| Culture 1 DIV12 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 27.07 | 19.87 | 8.38E-3 |
| Culture 1 DIV18 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 27.24 | 20.22 | 7.69E-3 |
| Culture 2 DIV7 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 28.63 | 20.68 | 4.05E-3 |
| Culture 2 DIV12 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 26.60 | 19.95 | 9.99E-3 |
| Culture 2 DIV18 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 27.94 | 20.44 | 5.51E-3 |
| Culture 3 DIV7 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 26.07 | 19.58 | 1.20E-4 |
| Culture 3 DIV12 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 26.66 | 19.61 | 6.95E-3 |
| Culture 3 DIV18 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 26.71 | 20.28 | 6.66E-3 |
| Culture 4 DIV7 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 27.27 | 19.62 | 4.97E-3 |
| Culture 4 DIV12 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 26.51 | 19.77 | 9.36E-3 |
| Culture 4 DIV18 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 27.69 | 20.19 | 5.52E-3 |

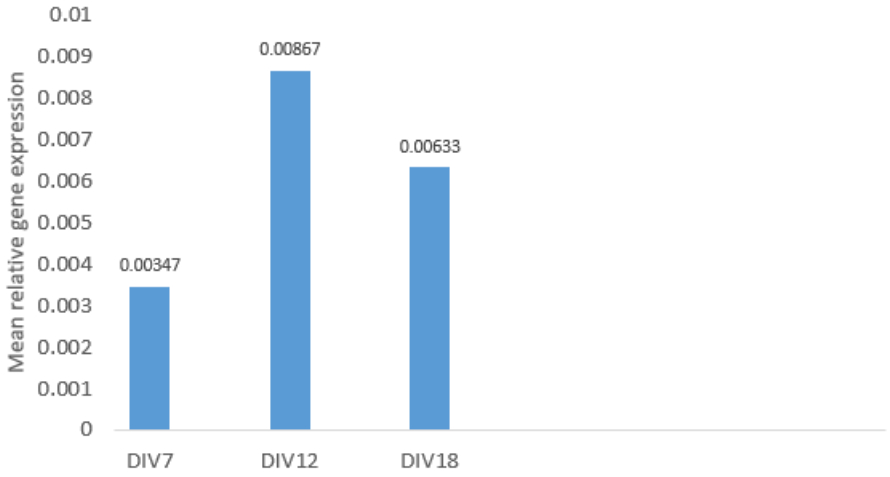



**Figure 20 :** Les valeurs de Cp issues de la qPCR in vitro avec n=4 et le graphique montrant la moyenne de ces valeurs. L'expression est plus élevée à DIV12 dans les cultures.

**In vivo**

| Sample name | Target | References | Target Cp Mean | Reference Cp Mean | Ratios Target/Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| Cortex 1 E17 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 25.64 | 19.53 | 1.98E-2 |
| Cortex 1 P25 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 30.29 | 18.93 | 3.80E-4 |
| Cortex 1 Adult | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 33.26 | 19.32 | 6.33E-5 |
| Cortex 2 E17 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 24.77 | 20.48 | 5.12E-2 |
| Cortex 2 P25 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 30.40 | 19.06 | 3.86E-4 |
| Cortex 2 Adult | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 33.19 | 19.21 | 6.20E-5 |
| Cortex 3 E17 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 24.57 | 19.75 | 3.55E-2 |
| Cortex 3 P25 | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 30.78 | 19.69 | 4.57E-4 |
| Cortex 3 Adult | MIS18BP1 | CYC1;GAPDH;SDHA | 30.21 | 18.95 | 4.07E-4 |

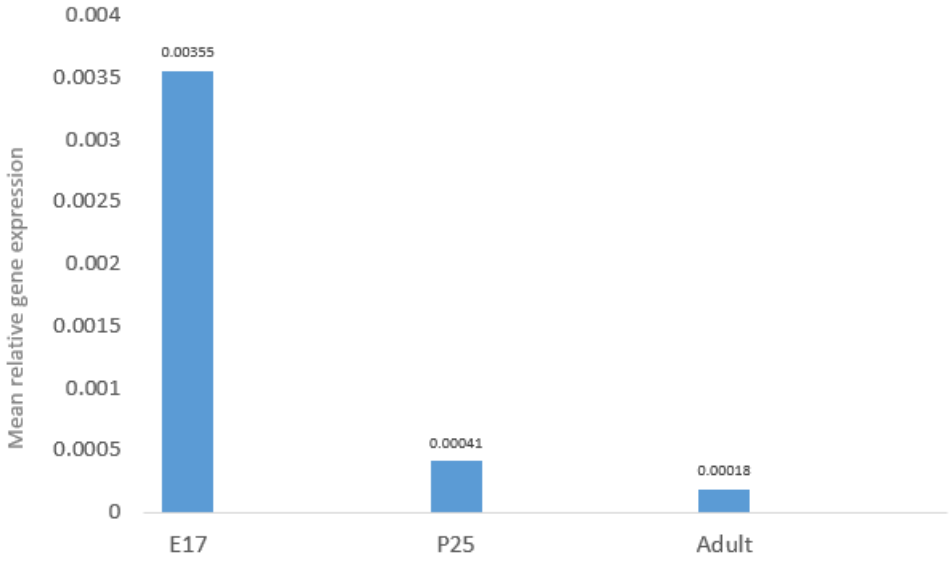



**Figure 21 :** Les valeurs de Cp issues de la qPCR in vivo avec n=3 et le graphique montrant la moyenne de ces valeurs. L'expression est plus élevée à E17 dans les cultures.

Enfin, les résultats ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Un test Kruskal-Wallis a été effectué suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Les résultats sont présentés dans les figures 22 et 23.

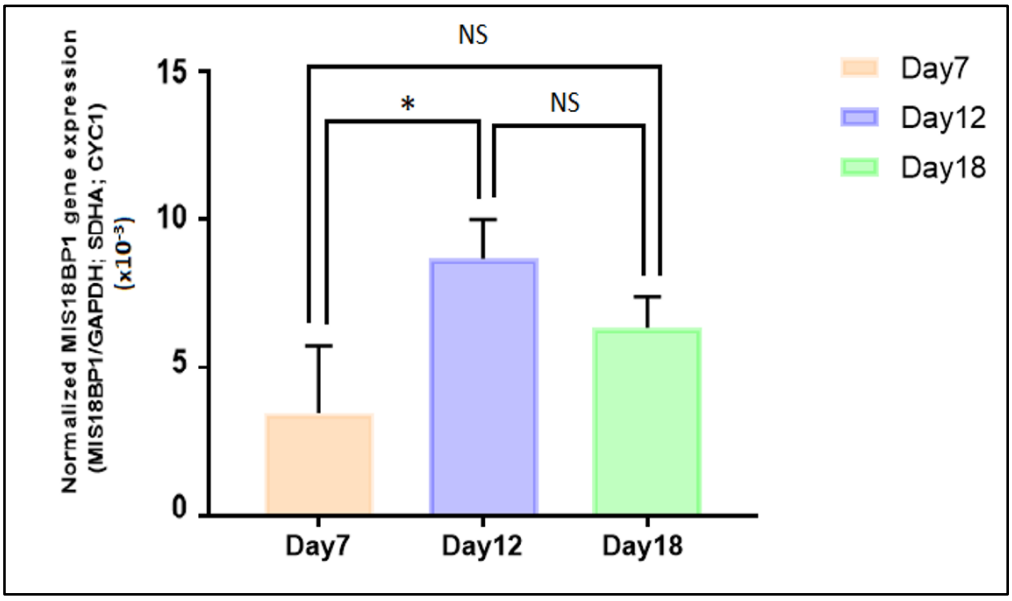



**Figure 22 :** Expression relative du gène *MIS18BP1* normalisée avec trois gènes de référence *GAPDH, SDHA et CYC1*. L'ARN total a été isolé des cultures de neurones corticaux à DIV7, 12 et 18. Les valeurs ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn (*$p$<0,05). NS : non significatif.

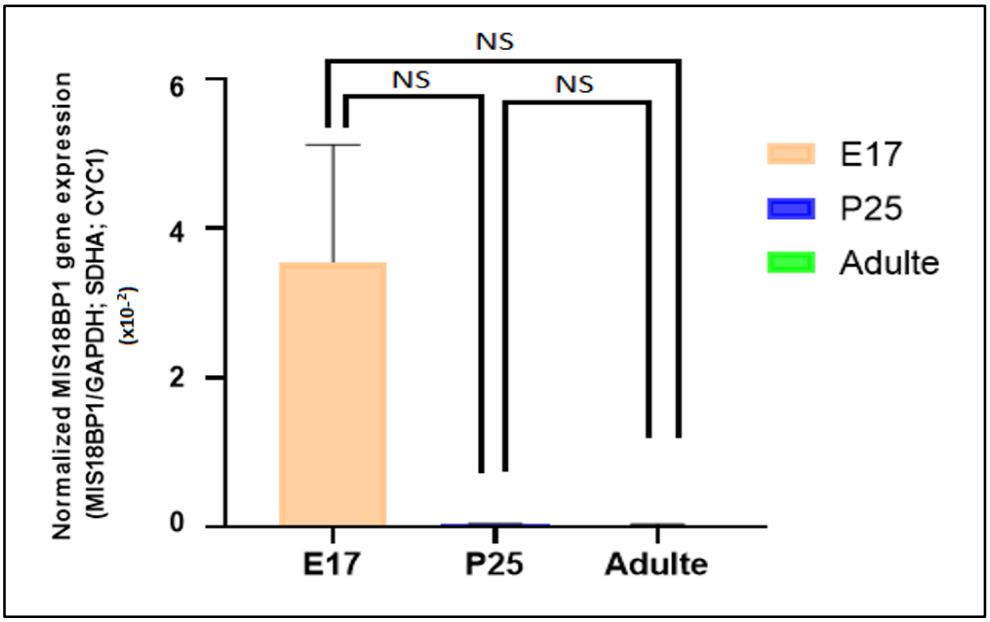



**Figure 23 :** Expression relative du gène *MIS18BP1* normalisée avec trois gènes de référence *GAPDH, SDHA* et *CYC1*. L'ARN total a été isolé de leur cortex. Les valeurs ont été analysées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn (*$p$<0,05). NS : non significatif.

En conclusion, les résultats montrent que le gène *MIS18BP1* est exprimé dans le cortex au stade embryonnaire ce qui signifie qu'il est exprimé au cours du neurodéveloppement. Mais ce travail reste une première approche nécessitant d'autres études fonctionnelles qui examinent l'impact de la diminution de l'expression du *MIS18BP1* par knockdown sur le neurodéveloppement afin de valider les résultats.

# DISCUSSION

Les troubles du spectre autistique (TSA) reflètent l'interaction entre la génétique et l'environnement, ce qui renforce l'importance d'identifier les facteurs de risque et de protection afin de minimiser l'interaction délétère entre ces composants. De plus, en raison de la grande hétérogénéité génétique et de la complexité de la transmission des TSA, les facteurs génétiques ne sont pas encore complètement élucidés. Par conséquent, il est intéressant de rechercher de nouveaux gènes candidats dans une nouvelle population qui conduiront à une meilleure compréhension de l'étiologie.

Considérant les arguments mentionnés ci-dessus, nos études ont été concentrées sur l'identification des facteurs de risque, des facteurs de protection et des nouvelles variations génétiques dans la population Libanaise qui est une nouvelle population ethniquement et socio-culturellement différente des autres populations étudiées à ce jour.

**La première partie du travail a porté sur une étude épidémiologique** qui a été une étude cas-témoin menée pour déterminer les facteurs prénatals, postnatals et familiaux chez les sujets Libanais atteints de TSA. Notre étude nous a permis d'identifier trois facteurs de risque et trois facteurs de protection associés aux TSA au sein de la population Libanaise et de comparer nos résultats avec les résultats d'autres populations.

Notre étude épidémiologique présente plusieurs limitations. Premièrement, la difficulté de vérifier le critère de diagnostic car cela n'a pas été fait par l'équipe de recherche. Les patients atteints de TSA ont été diagnostiqués à l'aide du DSM-V. Deuxièmement, l'étude est de type rétrospectif basée sur les informations fournies par les parents, ce qui conduit à la possibilité d'un biais de mémoire. Le biais de mémoire peut être important lorsque des événements sur un intervalle de temps long sont interrogés. Mais dans notre étude, l'âge moyen pour les 2 groupes était : 10,40 ans pour les sujets TSA et 10,14 ans pour les témoins, ce qui rend le biais de mémoire des parents moins important en raison de l'âge moyen des participants. Troisièmement, il était difficile d'avoir un échantillonnage homogène sur le pays puisque notre recrutement s'est fait dans des centres et des écoles qui ne suivent pas une répartition géographique homogène. Les grands centres et écoles recrutent généralement des enfants de

tout le pays car le Liban est géographiquement petit. Pour cela, la présence des patients et des témoins dans les centres et les écoles au Liban ne suit pas une répartition géographique très stricte et spécifique. La dernière limitation était la différence dans la répartition des sexes entre témoins et contrôle. Notre étude a montré une prédominance de 84% de patients TSA de sexe masculin contre 16% de patientes TSA de sexe féminin, tandis que pour le groupe témoin, les sujets de sexe masculin constituaient 55% contre 45% pour les sujets de sexe féminin. Cette répartition est conforme avec celle de notre étude précédente, dans laquelle une prédominance masculine a également été mise en évidence (73 % de patients TSA de sexe masculin contre 26% de patientes TSA de sexe féminin) (Bitar et al., 2020). De plus, selon une analyse de 54 études de prévalence de TSA dans le monde, les garçons sont environ quatre fois plus susceptibles d'être diagnostiqués avec un TSA que les filles (Loomes et al., 2017). Pour surmonter ces limitations, des études supplémentaires sur un groupe plus grand et bien reparti avec des évaluations d'exposition plus précises seront nécessaires.

L'analyse multivariée des données collectées des questionnaires a montré que le stress pendant la grossesse, la présence de patients atteints de TSA et de patients atteints du TDAH dans la famille sont significativement associés aux TSA. Le stress est une réaction normale du corps lorsqu'il y a des changements, conduisant à des réponses physiques et émotionnelles. Il peut être estimé à l'aide de questionnaires d'auto-évaluation tels qu'une liste des événements de la vie, évalués par un enquêteur, comprenant la solitude, les expériences de discrimination, le stress au travail et les difficultés financières. Lors de l'analyse du stress, l'échelle de temps et de sévérité, les types de réponse au stress, le stade de vie de l'exposition sont pris en considération (Crosswell & Lockwood, 2020). Dans notre étude, la présence ou l'absence de stress pendant la grossesse a été évaluée par une question générale « oui-non ». En effet, de nombreuses études ont suggéré que l'exposition prénatale au stress a une influence sur le développement et le comportement du fœtus (Bitar et al., 2020; Van den Bergh et al., 2020). Ces effets comprennent des anomalies du développement neurologique et de la fonction neurocognitive chez l'enfant induites par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et le système nerveux autonome. En fait, en réponse au stress, l'hypothalamus libère l'hormone de libération de la corticotropine (CRH) qui stimule la libération dans l'antéhypophyse de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). L'ACTH agit sur le cortex surrénalien, où elle stimule la libération de cortisol et d'autres stéroïdes qui libèrent en particulier des réserves d'énergie

pour faire face au stress. Pendant la grossesse, le placenta synthétise la CRH et la libère dans la circulation sanguine à des niveaux croissants. Récemment, il a été montré que la CRH module les protéines de transport du glucose dans le tissu placentaire, et il peut donc y avoir un lien entre les niveaux de CRH et la croissance fœtale. Dans le placenta, le cortisol stimule la synthèse de CRH via l'activation du facteur nucléaire kappa B qui peut également être déclenché par l'hypoxie et l'infection, ce qui indique que le stress intra-utérin pourrait faire avancer l'accouchement. Par conséquent, en raison du stress maternel, la CRH peut facilement traverser le placenta, et le placenta lui-même peut produire des quantités considérables de CRH (Thomson, 2013). De plus, la CRH a un rôle immunomodulateur ; elle stimule l'activation des mastocytes pour libérer des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6, qui augmentent la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Ces événements conduisent à l'action d'auto-anticorps contre les peptides cérébraux, qui provoquent une inflammation cérébrale chez le fœtus et sont détectés plus fréquemment chez les patients atteints de TSA, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle la neuroinflammation et l'auto-immunité jouent un rôle dans la pathogenèse des TSA (Zou et al., 2020). Mais des recherches supplémentaires seront nécessaires car la plupart des études étaient de petite taille et beaucoup n'incluaient pas de témoins de comparaison et pour caractériser les relations entre les auto-anticorps et les régions cérébrales spécifiques afin d'établir une corrélation avec les phénotypes des TSA. (Van den Bergh et al., 2020).

Nos résultats ont également révélé que la présence des sujets atteints de TSA et de TDAH dans la famille est un facteur de risque, ce qui ajoute un argument pour le rôle de la génétique dans la physiopathologie des TSA. En fait, il a été constaté que les TSA et le TDAH sont hautement héréditaires, chacun avec des influences génétiques dont la partie importante d'entre elles étant partagées entre les deux troubles (Ma et al., 2021). Les deux conditions coexistent souvent dans les familles et la plupart des sujets TSA répondent également aux critères du TDAH. Des approches de génétique moléculaire sur des enfants atteints de TSA et/ou de TDAH ont montré que ces sujets présentaient de variants génétiques dans des gènes identiques tels que *SHANK2* (SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 2) et *MAP1A* (Microtubule Associated Protein 1A) (Ma et al., 2021; Satterstrom et al., 2019).

En plus des facteurs de risque cités, notre étude a mis en évidence trois facteurs de protection qui pourraient probablement réduire le risque des TSA. Dans notre cohorte, les mères qui ont déclaré prendre des multivitamines étaient moins susceptibles d'avoir des enfants atteints de TSA. En général, les multivitamines pour la grossesse sont une combinaison d'acides gras oméga 3, oméga 6, d'acide folique, du fer et des vitamines B6, B12 et D. Des études ont suggéré qu'une carence prénatale en vitamine D provoque la perturbation de la connectivité cérébrale et augmente le risque de mutations génétiques (Levine et al., 2018). Pour le rôle de la vitamine D dans l'étiologie des TSA, des résultats contradictoires ont émergé sur le sujet. Une méta-analyse a suggéré que les enfants dont la vitamine D maternelle ou néonatale était abaissée avaient une probabilité de 54 % plus élevée de développer un TSA (Z. Wang et al., 2021). En revanche, une autre revue montre que l'hypothèse selon laquelle la vitamine D pourrait être un facteur contribuant à l'étiologie des TSA n'est pas suffisamment soutenue par les données disponibles (Principi & Esposito, 2020). De plus, nos résultats ont révélé qu'une alimentation riche en céréales pendant la grossesse peut jouer un rôle protecteur contre les TSA car les céréales sont une des sources d'une variété de nutriments, tels que le fer, l'acide folique et les vitamines. Un autre facteur de protection mis en évidence dans notre étude est la supplémentation en fer pendant la grossesse. En effet, l'anémie prénatale ferriprive peut conduire à un retard de croissance et une prématurité car le fer est crucial pour le métabolisme et le fonctionnement neuronal (Abu-Ouf & Jan, 2015). Une étude menée sur la population Libanaise et une autre sur la population Suédoise ont montré que l'anémie maternelle pendant la grossesse était fortement associée à des troubles neurodéveloppementaux, y compris les TSA, le TDAH et la déficience intellectuelle (Guisso et al., 2018; Wiegersma et al., 2019).

**La deuxième partie du travail a porté sur une étude génétique** visant à identifier les SNVs et les petites indels par le WES chez cinq sujets qui n'avaient pas révélé de CNV liées aux TSA dans notre étude précédente, dans laquelle la technique CGH array a été utilisée sur 19 sujets atteints de TSA (Bitar et al., 2019). Précédemment, notre équipe avait identifié des CNV rares comportant de nouveaux gènes candidats : *PJA2, APCS, SYNPO* et *TAC1*.

Comme d'autres études, notre étude génétique présente plusieurs limitations. Le WES ne séquence que les régions codantes du génome, sa couverture n'est pas à 100% et n'est pas uniforme dans toutes les régions. Cependant, la couverture réelle proposée avec le séquençage

d'exome est encore insuffisante, ce qui peut entraîner des manques d'identification de certaines mutations (O'Roak, Vives, Fu, et al., 2012). Cependant, la profondeur de couverture élevée adoptée dans notre stratégie garantit une sensibilité et une spécificité élevée de la détection d'événements pathogènes. De plus, des mutations causales peuvent être également éliminées par le filtrage strict pour éliminer les faux négatifs. Notre étude a permis d'identifier des anomalies génétiques, soient héritées soient *de novo,* chez chacun des sujets dans notre cohorte qui est constituée de 5 patients Libanais atteints de TSA. La fréquence des variations relativement élevée dans notre cohorte n'est pas due à une surestimation de la pathogénicité des variants identifiés car la classification des mutations causales était très stricte ; nous n'avons inclus que les variants dommageables. D'autre part, la population Libanaise est idéale pour découvrir des gènes récessifs en raison d'un taux élevé de mariages consanguins (Kourtian et al., 2017). Cette composition génétique relativement homogène de la population Libanaise peut contribuer à la fréquence d'anomalies génétiques significativement élevée dans notre cohorte (Bizzari et al., 2021). De plus, les patients Libanais présentaient des mutations communes dans des gènes précédemment décrits chez d'autres populations malgré la petite taille de la cohorte et la grande hétérogénéité génétique des TSA. Nos résultats, croisés avec ceux d'autres études, mettent en évidence des mutations au sein de gènes communs.

Toutes les variations sélectionnées ont été vérifiés par séquençage Sanger sauf l'insertion dans le gène *KRTAP5-5* en raison de la mauvaise qualité de l'échantillon et de l'absence du site d'amorçage. Notre étude visait à identifier les variants *de novo*. En fait, le gène est considéré comme un fort candidat dans les TSA lorsqu'il contient un variant *de novo* c'est-à-dire un variant présent chez le patient mais absent chez les parents. Dans notre étude, une délétion *de novo* par décalage de cadre sur le chromosome 14 a été identifiée dans le gène *MIS18BP1*, cette délétion n'a jamais été observée dans les TSA. Le produit de ce gène est un régulateur mitotique. Il a été confirmé que *MIS18BP1* est régulé par la SUMOylation pendant la mitose (Cuijpers et al., 2017). La SUMOylation participe dans la différenciation neuronale, le contrôle de la formation des synapses, la régulation de la transmission synaptique et la survie cellulaire (Henley et al., 2014). Les maladies associées à *MIS18BP1* comprennent l'anémie de Fanconi, groupe de complémentation I qui est un trouble hétérogène se caractérisant par des anomalies du développement dans les principaux systèmes d'organes, une insuffisance médullaire précoce et une forte prédisposition au cancer (Dorsman et al.,

2007). Afin de créer un réseau biologique reliant le gène *MIS18BP1* à ses fonctions biologiques, le logiciel *Pathway Studio* a été utilisé. Les processus cellulaires liés à la protéine codée du gène *MIS18BP1* sont présentés dans la figure 24.

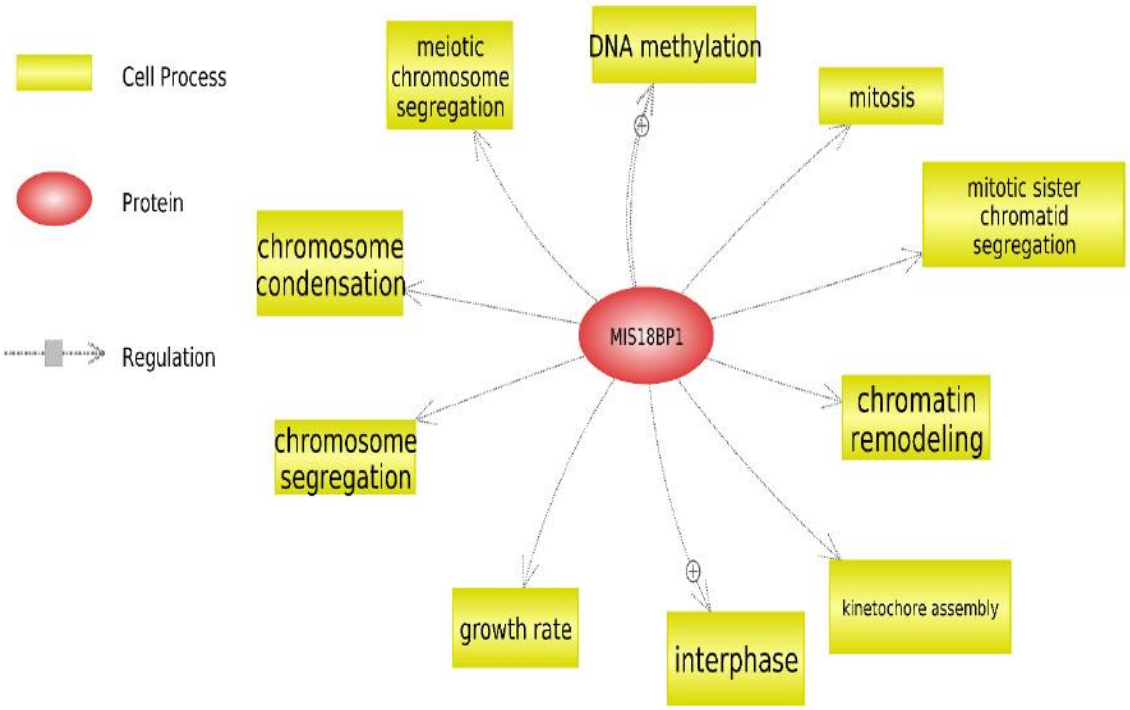



**Figure 24:** Analyse des processus cellulaires de la protéine codée du gène *MIS18BP1* à l'aide du logiciel *Pathway Studio*. Un réseau biologique a été créé reliant la protéine codée du gène *MIS18BP1* avec les processus cellulaires. (Figure 4 dans l'article 2) (Gerges et al., 2022)

Le remodelage de la chromatine et la méthylation de l'ADN, deux des processus identifiés, sont importants dans le développement du cerveau humain qui peut être régulé par *MIS18BP1*, renforçant son rôle potentiel dans les TSA (LaSalle, 2013). De plus, plusieurs études sur les TSA ont montré des mutations dans des gènes liées au remodelage de la chromatine, comme *CHD8, SMARCC1, SMARCC2, ARID1A, ARID1B et ATRX* chez les patients TSA (Daghsni et al., 2018; Hoffmann & Spengler, 2021; O'Roak, Vives, Girirajan, et al., 2012). Egalement, les études génomiques sur des cas de TSA ont révélé des mutations dans des gènes codant pour la machinerie de méthylation de l'ADN tels que *DNMT3A, TET2, MECP2* et *MBD5* (Tremblay & Jiang, 2019). Le sujet 45, ayant la délétion dans le gène

*MIS18BP1*, est épileptique et a un retard de la parole. En fait, Kobow et al., ont été les premiers à proposer un rôle potentiel pour la méthylation de l'ADN dans l'épilepsie chronique suite à la détection des variations au niveau des gènes responsable de ce processus chez des rats (Kobow et al., 2013). Ensuite, le séquençage du génome a permis d'identifier de nouvelles variations pathogènes dans des gènes qui codent pour les enzymes régulatrices épigénétiques responsables de la méthylation de l'ADN et le remodelage de la chromatine chez les patients atteints d'épilepsie (Conboy et al., 2021; Jesus-Ribeiro et al., 2020). Les variations des gènes codant les protéines responsables de l'assemblage du kinétochore, de la ségrégation des chromosomes et de la condensation ont été associés à l'apparition de troubles neurodéveloppementaux. Les mécanismes impliqués sont une prolifération cellulaire insuffisante et un échec de la reconstitution des cellules souches neuronales, conduisant à un sous-développement du système nerveux central (Degrassi et al., 2019). Afin de préciser le niveau d'implication du gène *MIS18BP1* dans le neurodéveloppement, nous avons mesuré son expression dans le cortex de souris à différents stades du développement. L'expression a été mesurée in vitro ainsi que in vivo et les résultats ont montré que le gène *MIS18BP1* est plus exprimé dans le cortex au stade embryonnaire et quasiment non exprimé ensuite. Cela laisse supposer qu'il a une importance pour le neurodéveloppement, en effet car c'est la période pendant laquelle se déroule la majeure partie de la neurogenèse. Généralement, chez les souris, la neurogenèse dans le cortex se déroule sur une période allant d'environ E12 jusqu'à E18, tandis que chez les humains, ce processus se déroule de la semaine 6 jusqu'à la semaine 20 de la période fœtale (Chen et al., 2017; Stagni et al., 2015). Chez les souris, les neurones sont générés à partir du neuroépithélium du tube neural lors de la neurulation initiale, puis à partir des neuroblastes de la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire plus tard au cours de la gestation. Durant cette étape, de E12 jusqu'à E18, le cortex cérébral devient de plus en plus stratifié (Chen et al., 2017). Cependant, nos résultats devront être validés par des études fonctionnelles pour préciser le rôle de ce gène au cours du neurodéveloppement. Les modèles de culture et les expériences de knockdown de ces gènes dans des modèles in vitro nous permettraient de mieux comprendre son rôle et son implication dans le neurodéveloppement et la physiopathologie des TSA.

Par ailleurs, trois SNV faux-sens *de novo* ont été détectés dans les gènes suivants : *USP46* (Ubiquitin Specific Peptidase 46), *KRT2* (Keratin 2) et *LSMEM2* (Leucine Rich Single-Pass

Membrane Protein 2). L'enzyme de déubiquitination codée par le gène *USP46* est spécifique du récepteur de l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPAR). Ces récepteurs sont les principaux médiateurs du développement neuronal et de la communication et jouent un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire (Huo et al., 2015). Une délétion en 4q12 impliquant le gène *USP46* a été identifiée chez un sujet TSA dans une étude sur des familles italiennes (Mucciolo et al., 2016). D'autre part, la protéine codée par le gène *KRT2* fait partie de la famille des gènes de la kératine et contribue à la cornification terminale (Edqvist et al., 2015), à l'activation, la prolifération et la kératinisation des kératinocytes, et joue un rôle dans l'établissement de la barrière épidermique sur la peau plantaire (Bloor et al., 2003). Ce gène n'a été trouvé ni exprimé dans le cerveau ni lié au neurodéveloppement, ce qui ne soutient pas son implication dans les TSA (www.proteinatlas.org). La protéine codée par le gène *LSMEM2* est une protéine membranaire 2 à passage unique riche en leucine. Il a été trouvé fortement exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques et la langue chez les humains mais pas dans le cerveau et sa fonction n'est pas encore claire (NCBI, 2022). Egalement, ce gène n'a pas été lié au neurodéveloppement (www.proteinatlas.org).

D'autre part, si le variant est hérité d'un parent sain on cherche son niveau de pathogénicité. Lorsque le variant est dans un gène qui a déjà été impliqué dans les troubles neurodéveloppementaux y compris les TSA, ce variant peut alors être probablement considéré comme un facteur de risque. Par contre, si le variant est dans un gène qui n'a jamais été impliqué dans un trouble neurodéveloppemental, son interprétation sera plus difficile. Dans notre étude, deux SNV nouveaux faux-sens ont été détectés dans les gènes *SLITRK4* et *NHSL2* sur le chromosome X chez les sujets masculins 23 et 73 respectivement. Ces variations sont héritées de la mère ce qui est en faveur d'une hérédité liée à l'X. La famille des SLITRK sont des protéines transmembranaires de la superfamille des répétitions riches en leucine (LRR) qui sont exprimées dans le SNC et participent à la croissance des neurites, à la survie neuronale et à l'élaboration dendritique (Proenca et al., 2011). Des mutations faux-sens du gène *SLITRK4* ont été associées à des troubles neuropsychiatriques tels que la schizophrénie mais pas les TSA (Kang et al., 2016). Le gène *NHSL2* fait partie de la famille des gènes du syndrome de Nance-Horan (NHS) qui est un trouble du développement lié à l'X et caractérisé par une déficience intellectuelle, des cataractes et des anomalies physiques et dentaires. L'expression

du gène *NHSL2* a été détectée dans le cerveau fœtal, les poumons, les reins et le thymus, et a été largement exprimée tout au long du développement du cerveau (Brooks et al., 2010). Dans une étude réalisée sur trois familles atteintes de ce syndrome, un garçon atteint présentait en addition du syndrome NHS, de retard mental sévère, d'épilepsie et d'hypotonie (Brooks et al., 2004). Cependant, dans des cas d'individus atteints du NHS, le retard mental était fréquent et sévère avec de légères caractéristiques autistiques (Sharma et al., 2017).

Certaines des variations héritées concernaient des gènes qui ont déjà été associées aux TSA et rapportés dans la littérature. Sur le chromosome X, des SNVs faux-sens ont été détectés dans les gènes *FLNA* (Filamine A) et *PTCHD1* (Patched domain contenant 1) chez les sujets masculins 23 et 64.

Deux de ces SNVs se trouvent dans le gène *FLNA.* Il code une protéine de liaison à l'actine reliant les filaments d'actine aux glycoprotéines membranaires. Dans une étude menée sur 195 patients TSA, d'origine grecque, une délétion du gène *FLNA* a été trouvée chez un sujet TSA avec des convulsions et des dysmorphies (Oikonomakis et al., 2016).

Le gène *PTCHD1* code une protéine membranaire située dans les neurones GABAergiques et glutamatergiques avec 12 domaines transmembranaires (Tora et al., 2017). Des études ont mis en évidence que *PTCHD1* peut se lier aux protéines d'échafaudage postsynaptiques PSD95 et DLG3 via un motif de domaine de liaison PDZ à l'extrémité de la queue C-terminale (Tora et al., 2017; Ung et al., 2018). Des investigations in vitro ont suggéré un rôle possible des protéines PTCHD1 dans la régulation de la voie de signalisation sonic hedgehog (SHH) (Chung et al., 2014; Noor et al., 2010). SHH est un facteur pléiotrope agissant dans le cerveau en développement, y compris la croissance et l'allongement axonaux et a également été impliqué dans la régulation de la formation d'épines dendritiques par la voie non canonique qui régule directement le cytosquelette d'actine (Yao et al., 2015). De plus, *PTCHD1* est nécessaire au développement et à la fonction du noyau réticulaire thalamique (TRN), qui est une partie du thalamus essentielle pour la génération du rythme du sommeil, l'attention et le traitement sensorimoteur (Marshall et al., 2008). Ung et al., ont découvert que la délétion de Ptchd1 altère l'activité de l'hippocampe ce qui confirme que le déficit en *PTCHD1* induit un trouble neurodéveloppemental résultant de la dérégulation de la voie neuronale associée à des

complexes de signalisation postsynaptiques et d'une perturbation de l'organisation synaptique excitatrice dans le cerveau en développement (Ung et al., 2018). Une évaluation de l'ensemble du génome pour détecter des anomalies structurelles a été réalisée sur 427 patients atteints de TSA non apparentés et a identifié de nouveaux variants dans le gène *PTCHD1* (Marshall et al., 2008). Une revue récente sur la contribution du *PTCHD1* dans le neurodéveloppement, donne un aperçu des investigations génomiques cliniques qui ont identifié *PTCHD1* comme gène de risque pour l'étiologie des TSA. Dans de nombreux cas masculins de TSA et de déficience intellectuelle, des microdélétions dans Xp22.11 affectant *PTCHD1* ont été signalées (Pastore et al., 2022). Pour évaluer l'impact potentiellement délétère des mutations faux-sens dans la séquence codante de *PTCHD1* (Noor et al., 2010) sur la fonction de la protéine PTCHD1, des expériences de surexpression in vitro des formes sauvages et mutées de PTCHD1-GFP ont été réalisées. Il a été constaté que les variants altéraient le niveau d'expression de la protéine PTCHD1 et étaient retenus dans le réticulum endoplasmique, ce qui suggère un repliement anormal des protéines. Ces résultats ont mis en évidence l'impact pathogène des variants faux-sens dans *PTCHD1* et ont renforcé son implication dans les TSA (Halewa et al., 2021).

Sur les chromosomes 2 et 18, deux SNV faux-sens homozygotes ont été détectés dans les gènes *HAAO* (3-Hydroxyanthranilate 3,4-Dioxygénase) et *ASXL3* (ASXL Transcriptional Regulator 3). Le gène *HAAO* code une protéine qui fait partie de la famille des dioxygénases intramoléculaires qui existe en faible quantité dans le SNC et catalyse la synthèse de l'acide quinolique, qui est une excitotoxine. Des niveaux cérébraux élevés de cet acide peuvent participer à la pathogenèse des troubles neurologiques et inflammatoires. L'expression du gène *HAAO* s'est révélée réduite chez les sujets TSA (Boccuto, Chen, et al., 2013).

Le gène *ASXL3* code une protéine qui joue un rôle important dans la régulation de la transcription génique. Dans une étude réalisée dans le but de découvrir les gènes de susceptibilité dans les TSA, une mutation a été identifiée dans le gène *ASXL3* chez des patients TSA avec une déficience intellectuelle (Husson et al., 2020).

# CONCLUSION

Les TSA sont l'un des troubles neurodéveloppementaux les plus répandus dans le monde. Dans notre travail, nous avons choisis la population Libanaise afin d'étudier une population qui est ethniquement et socio-culturellement différente des autres populations étudiées à ce jour dans le but d'identifier les facteurs de risque, les facteurs de protection et les nouvelles variations génétiques dans cette population et afin de mieux comprendre la pathophysiologie des TSA. Ce travail a consisté à réaliser une étude épidémiologique et une autre génétique.

La première partie de notre travail a été réalisée dans le but de trouver des actions qui permettraient de réduire autant que possible les risques des TSA dans la population Libanaise. Notre étude a montré que le stress maternel pendant la grossesse, la présence de patients TSA et TDAH dans la famille sont des facteurs de risque fortement associés aux TSA. À l'inverse, plusieurs facteurs de protection contre les TSA ont été observés, notamment l'apport maternel en vitamines particulièrement les vitamines B6 et B12 et les acides gras de la série oméga 3 (acide α-linolénique, acide eicosapentaénoïque et acide docosahexaénoïque), une alimentation riche en céréales et une supplémentation en fer pendant la grossesse. Des études futures avec des échantillons de grande taille et des enquêtes plus détaillées devraient être menées pour identifier les effets des facteurs environnementaux sur les phases critiques du développement. De plus, des enquêtes spécifiques portant sur les facteurs de la nutrition pourront nous aider à mieux analyser les résultats des études sur le microbiote intestinal chez les sujets TSA et à constituer des mesures préventives.

La deuxième partie de notre travail a été effectuée en utilisant la technique WES pour la première fois sur la population Libanaise. Nous avons identifié une nouvelle mutation *de novo* dans le gène *MIS18BP1* et deux autres nouvelles mutations héritées dans les gènes *SLITRK4* et *NHSL2* en tant que gènes candidats potentiels de TSA. Nos résultats permettent de proposer le rôle potentiel de la nouvelle mutation au niveau du gène *MIS18BP1* dans l'étiologie génétique des TSA. De plus, nos résultats ont confirmé la présence d'autres variations génétiques qui ont été décrites précédemment et sont partagées entre les sujets Libanais et d'autres populations atteintes de TSA. En conséquence, nos observations

fournissent un argument supplémentaire pour les modèles polygéniques fréquents dans les TSA composés de plusieurs variants hérités et *de novo*. Cependant, des études supplémentaires seront essentielles pour observer la récurrence de ces variations chez d'autres patients et en utilisant des modelés cellulaires pour prouver l'implication de ces gènes dans le neurodéveloppement.

L'identification de multiples facteurs de risque environnementaux et génétiques et la modélisation des mutations dans des modèles animaux a considérablement amélioré notre compréhension de la physiopathologie des TSA. Cependant, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour recenser l'ensemble des gènes facteurs de risque ou de cause et pour caractériser les mécanismes physiopathologiques résultant de dysfonctionnement de ces gènes. Par ailleurs, d'autres mécanismes devront être encore explorés, comme les variations épigénétiques des TSA ce qui ajouterait des pistes pour développer des thérapies ciblées. Comme dans le cas du nouveau gène candidat identifié dans notre étude, le gène *MIS18BP1*, qui régule le remodelage de la chromatine et la méthylation de l'ADN qui peuvent être ciblés par des médicaments épigénétiques. Ces médicaments ciblent les enzymes de méthylation de l'ADN et de désacétylation des histones et sont capables d'inverser les profils d'expression génique anormaux (Millan, 2013), offrant de nouveaux outils pour contrôler le développement de troubles complexes comme les TSA. Cela pourrait représenter un candidat promoteur pour une stratégie thérapeutique ciblée visant à restaurer le développement et la plasticité synaptique chez les patients TSA.

# REFERENCES

Abdulamir, H. A., Abdul-Rasheed, O. F., & Abdulghani, E. A. (2018). Serotonin and serotonin transporter levels in autistic children. *Saudi Medical Journal*, *39*(5), 487-494. https://doi.org/10.15537/smj.2018.5.21751

Abu-Ouf, N. M., & Jan, M. M. (2015). The impact of maternal iron deficiency and iron deficiency anemia on child's health. *Saudi Medical Journal*, *36*(2), 146-149. https://doi.org/10.15537/smj.2015.2.10289

Agrawal, S., Rao, S. C., Bulsara, M. K., & Patole, S. K. (2018). Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Preterm Infants : A Meta-analysis. *Pediatrics*, *142*(3), e20180134. https://doi.org/10.1542/peds.2018-0134

Al-Beltagi, M. (2021). Autism medical comorbidities. *World Journal of Clinical Pediatrics*, *10*(3), 15-28. https://doi.org/10.5409/wjcp.v10.i3.15

Alonso-Gonzalez, A., Rodriguez-Fontenla, C., & Carracedo, A. (2018). De novo Mutations (DNMs) in Autism Spectrum Disorder (ASD) : Pathway and Network Analysis. *Frontiers in Genetics*, *9*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00406

Al-Otaish, H., Al-Ayadhi, L., Bjørklund, G., Chirumbolo, S., Urbina, M. A., & El-Ansary, A. (2018). Relationship between absolute and relative ratios of glutamate, glutamine and GABA and severity of autism spectrum disorder. *Metabolic Brain Disease*, *33*(3), 843-854. https://doi.org/10.1007/s11011-018-0186-6

Al-Sarraj, Y., Al-Dous, E., Taha, R. Z., Ahram, D., Alshaban, F., Tolfat, M., El-Shanti, H., & Albagha, O. M. E. (2021). Family-Based Genome-Wide Association Study of Autism Spectrum Disorder in Middle Eastern Families. *Genes*, *12*(5), 761. https://doi.org/10.3390/genes12050761

Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in Neurosciences*, *31*(3), 137-145. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.005

American Psychiatric Association, A., VA, USA. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed*. https://dsm.psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596

An, J. Y., & Claudianos, C. (2016). Genetic heterogeneity in autism : From single gene to a pathway perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *68*, 442-453. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.013

Arya, A., & Sindhwani, G. (2016). AUTISM: AN EARLY-ONSET NEURODEVELOPMENTAL DISORDER. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *7*, 9.

Asperger, H. (1944). *Die « Autistischen Psychopathen » im Kindesalter. In : Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten, red. von O. Bumke und H. Spatz, Band 117, S. 76-136 par Asperger, Hans:: (1944) | Dr. Karl Böker*. https://www.abebooks.fr/edition-originale/Autistischen-Psychopathen-Kindesalter-Archiv-Psychiatrie-Nervenkrankheiten/30946671177/bd

Avino, T. A., Barger, N., Vargas, M. V., Carlson, E. L., Amaral, D. G., Bauman, M. D., & Schumann, C. M. (2018). Neuron numbers increase in the human amygdala from birth to adulthood, but not in autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(14), 3710-3715. https://doi.org/10.1073/pnas.1801912115

Ayub, R., Sun, K. L., Flores, R. E., Lam, V. T., Jo, B., Saggar, M., & Fung, L. K. (2021). Thalamocortical connectivity is associated with autism symptoms in high-functioning adults with autism and typically developing adults. *Translational Psychiatry*, *11*(1), 1-9. https://doi.org/10.1038/s41398-021-01221-0

Bacchelli, E., Cameli, C., Viggiano, M., Igliozzi, R., Mancini, A., Tancredi, R., Battaglia, A., & Maestrini, E. (2020). An integrated analysis of rare CNV and exome variation in Autism Spectrum Disorder using the Infinium PsychArray. *Scientific Reports*, *10*(1), 3198. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59922-3

Baizer, J. S. (2021). Functional and Neuropathological Evidence for a Role of the Brainstem in Autism. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *15*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnint.2021.748977

Bariselli, S., Tzanoulinou, S., Glangetas, C., Prévost-Solié, C., Pucci, L., Viguié, J., Bezzi, P., O'Connor, E. C., Georges, F., Lüscher, C., & Bellone, C. (2016). SHANK3 controls maturation of social reward circuits in the VTA. *Nature neuroscience*, *19*(7), 926-934. https://doi.org/10.1038/nn.4319

Bastaki, K. N., Alwan, S., & Zahir, F. R. (2020). Maternal Prenatal Exposures in Pregnancy and Autism Spectrum Disorder : An Insight into the Epigenetics of Drugs and Diet as Key Environmental Influences. *Advances in Neurobiology*, *24*, 143-162. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_5

Bauman, M., & Kemper, T. L. (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*, *35*(6), 866-874. https://doi.org/10.1212/wnl.35.6.866

Bengoa-Vergniory, N., & Kypta, R. M. (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(21), 4157-4172. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2028-6

Berg, J. M., & Geschwind, D. H. (2012). Autism genetics : Searching for specificity and convergence. *Genome Biology*, *13*(7), 247. https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-7-247

Beversdorf, D. Q., Stevens, H. E., & Jones, K. L. (2018). Prenatal Stress, Maternal Immune Dysregulation, and Their Association With Autism Spectrum Disorders. *Current Psychiatry Reports*, *20*(9), 76. https://doi.org/10.1007/s11920-018-0945-4

Beversdorf, D. Q., Stevens, H. E., Margolis, K. G., & Van de Water, J. (2019). Prenatal Stress and Maternal Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorders : Potential Points for Intervention. *Current Pharmaceutical Design*, *25*(41), 4331-4343. https://doi.org/10.2174/1381612825666191119093335

Bi, C., Wu, J., Jiang, T., Liu, Q., Cai, W., Yu, P., Cai, T., Zhao, M., Jiang, Y., & Sun, Z. S. (2012). Mutations of ANK3 identified by exome sequencing are associated with autism susceptibility. *Human Mutation*, *33*(12), 1635-1638. https://doi.org/10.1002/humu.22174

Bielen, H., & Houart, C. (2014). The Wnt cries many : Wnt regulation of neurogenesis through tissue patterning, proliferation, and asymmetric cell division. *Developmental Neurobiology*, *74*(8), 772-780. https://doi.org/10.1002/dneu.22168

Bishop, S. L., Farmer, C., & Thurm, A. (2015). Measurement of nonverbal IQ in autism spectrum disorder : Scores in young adulthood compared to early childhood. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *45*(4), 966-974. https://doi.org/10.1007/s10803-014-2250-3

Bitar, T., Gerges, P., Kassab, M.-C., Hallit, S., Mattar, H., Soufia, M., Andres, C. R., & Hleihel, W. (2020). *Factors associated with Autism Spectrum Disorder : A case-control study in the Lebanese population*. *17*(1), 9.

Bitar, T., Hleihel, W., Marouillat, S., Vonwill, S., Vuillaume, M., Soufia, M., Vourc'h, P., Laumonnier, F., & Andres, C. R. (2019). Identification of rare copy number variations reveals *PJA2* , *APCS* , *SYNPO* , and *TAC1* as novel candidate genes in Autism Spectrum Disorders. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *7*(8). https://doi.org/10.1002/mgg3.786

Bizzari, S., Nair, P., Deepthi, A., Hana, S., Al-Ali, M. T., Megarbané, A., & El-Hayek, S. (2021). Catalogue for Transmission Genetics in Arabs (CTGA) Database : Analysing Lebanese Data on Genetic Disorders. *Genes*, *12*(10), 1518. https://doi.org/10.3390/genes12101518

Bleuler, E. (1911). Eugen Bleuler : Dementia Praecox oder Gruppe der Schizophrenien. *Psychiatrische Praxis*, *38*(08), 412-413. https://doi.org/10.1055/s-0031-1295586

Bloor, B. K., Tidman, N., Leigh, I. M., Odell, E., Dogan, B., Wollina, U., Ghali, L., & Waseem, A. (2003). Expression of keratin K2e in cutaneous and oral lesions : Association with keratinocyte activation, proliferation, and keratinization. *The American Journal of Pathology*, *162*(3), 963-975. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63891-6

Boccuto, L., Chen, C.-F., Pittman, A. R., Skinner, C. D., McCartney, H. J., Jones, K., Bochner, B. R., Stevenson, R. E., & Schwartz, C. E. (2013). Decreased tryptophan metabolism in patients with autism spectrum disorders. *Molecular Autism*, *4*(1), 16. https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-16

Boccuto, L., Lauri, M., Sarasua, S. M., Skinner, C. D., Buccella, D., Dwivedi, A., Orteschi, D., Collins, J. S., Zollino, M., Visconti, P., DuPont, B., Tiziano, D., Schroer, R. J., Neri, G., Stevenson, R. E., Gurrieri, F., & Schwartz, C. E. (2013). Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *European Journal of Human Genetics*, *21*(3), 310-316. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.175

Bomba, L., Walter, K., & Soranzo, N. (2017). The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease. *Genome Biology*, *18*(1), 77. https://doi.org/10.1186/s13059-017-1212-4

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

Braam, W., Ehrhart, F., Maas, A. P. H. M., Smits, M. G., & Curfs, L. (2018). Low maternal melatonin level increases autism spectrum disorder risk in children. *Research in Developmental Disabilities*, *82*, 79-89. https://doi.org/10.1016/j.ridd.2018.02.017

Brooks, Ebenezer, N., Poopalasundaram, S., Lehmann, O., Moore, A., & Hardcastle, A. (2004). Identification of the gene for Nance-Horan syndrome (NHS). *Journal of Medical Genetics*, *41*(10), 768-771. https://doi.org/10.1136/jmg.2004.022517

Brooks, S. P., Coccia, M., Tang, H. R., Kanuga, N., Machesky, L. M., Bailly, M., Cheetham, M. E., & Hardcastle, A. J. (2010). The Nance-Horan syndrome protein encodes a functional WAVE homology domain (WHD) and is important for co-ordinating actin remodelling and maintaining cell morphology. *Human Molecular Genetics*, *19*(12), 2421-2432. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq125

Bruchhage, M. M. K., Bucci, M.-P., & Becker, E. B. E. (2018). Chapter 4—Cerebellar involvement in autism and ADHD. In M. Manto & T. A. G. M. Huisman (Éds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 155, p. 61-72). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00004-4

Bruel, A.-L., Vitobello, A., Tran Mau-Them, F., Nambot, S., Sorlin, A., Denommé-Pichon, A.-S., Delanne, J., Moutton, S., Callier, P., Duffourd, Y., Philippe, C., Faivre, L., & Thauvin-

Robinet, C. (2020). Next-generation sequencing approaches and challenges in the diagnosis of developmental anomalies and intellectual disability. *Clinical Genetics*, *98*(5), 433-444. https://doi.org/10.1111/cge.13764

Burdick, K. J., Cogan, J. D., Rives, L. C., Robertson, A. K., Koziura, M. E., Brokamp, E., Duncan, L., Hannig, V., Pfotenhauer, J., Vanzo, R., Paul, M. S., Bican, A., Morgan, T., Duis, J., Newman, J. H., Hamid, R., & Phillips, J. A. (2020). Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *American journal of medical genetics. Part A*, *182*(6), 1400-1406. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61558

Cameli, C., Viggiano, M., Rochat, M. J., Maresca, A., Caporali, L., Fiorini, C., Palombo, F., Magini, P., Duardo, R. C., Ceroni, F., Scaduto, M. C., Posar, A., Seri, M., Carelli, V., Visconti, P., Bacchelli, E., & Maestrini, E. (2021). An increased burden of rare exonic variants in NRXN1 microdeletion carriers is likely to enhance the penetrance for autism spectrum disorder. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *25*(5), 2459-2470. https://doi.org/10.1111/jcmm.16161

Carvajal-Oliveros, A., & Campusano, J. M. (2021). Studying the Contribution of Serotonin to Neurodevelopmental Disorders. Can This Fly? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2020.601449

Carvill, G. L., & Mefford, H. C. (2015). Next-Generation Sequencing in Intellectual Disability. *Journal of Pediatric Genetics*, *4*(3), 128-135. https://doi.org/10.1055/s-0035-1564439

CDC. (2022, mars 2). *Data and Statistics on Autism Spectrum Disorder | CDC*. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html

Cellot, G., & Cherubini, E. (2014). GABAergic Signaling as Therapeutic Target for Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Pediatrics*, *2*, 70. https://doi.org/10.3389/fped.2014.00070

Chaaya, M., Saab, D., Maalouf, F. T., & Boustany, R.-M. (2016). Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Nurseries in Lebanon : A Cross Sectional Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *46*(2), 514-522. https://doi.org/10.1007/s10803-015-2590-7

Chaddad, A., Desrosiers, C., Hassan, L., & Tanougast, C. (2017). Hippocampus and amygdala radiomic biomarkers for the study of autism spectrum disorder. *BMC Neuroscience*, *18*(1), 52. https://doi.org/10.1186/s12868-017-0373-0

Chen, V. S., Morrison, J. P., Southwell, M. F., Foley, J. F., Bolon, B., & Elmore, S. A. (2017). Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5. *Toxicologic pathology*, *45*(6), 705-744. https://doi.org/10.1177/0192623317728134

Cheng, N., Rho, J. M., & Masino, S. A. (2017). Metabolic Dysfunction Underlying Autism Spectrum Disorder and Potential Treatment Approaches. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*, 34. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00034

Cheon, K.-A., Kim, Y.-S., Oh, S.-H., Park, S.-Y., Yoon, H.-W., Herrington, J., Nair, A., Koh, Y.-J., Jang, D.-P., Kim, Y.-B., Leventhal, B. L., Cho, Z.-H., Castellanos, F. X., & Schultz, R. T. (2011). Involvement of the anterior thalamic radiation in boys with high functioning autism spectrum disorders : A Diffusion Tensor Imaging study. *Brain Research*, *1417*, 77-86. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.08.020

Cheroni, C., Caporale, N., & Testa, G. (2020). Autism spectrum disorder at the crossroad between genes and environment : Contributions, convergences, and interactions in ASD developmental pathophysiology. *Molecular Autism*, *11*(1), 69. https://doi.org/10.1186/s13229-020-00370-1

Chow, M. L., Pramparo, T., Winn, M. E., Barnes, C. C., Li, H.-R., Weiss, L., Fan, J.-B., Murray, S., April, C., Belinson, H., Fu, X.-D., Wynshaw-Boris, A., Schork, N. J., & Courchesne, E. (2012). Age-dependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. *PLoS Genetics*, *8*(3), e1002592. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002592

Chung, C., Ha, S., Kang, H., Lee, J., Um, S. M., Yan, H., Yoo, Y.-E., Yoo, T., Jung, H., Lee, D., Lee, E., Lee, S., Kim, J., Kim, R., Kwon, Y., Kim, W., Kim, H., Duffney, L., Kim, D., … Kim, E. (2019). Early correction of NMDAR function improves autistic-like social behaviors in adult Shank2−/− mice. *Biological psychiatry*, *85*(7), 534-543. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.025

Chung, Larsen, A. R., Chen, E., & Bunz, F. (2014). A PTCH1 Homolog Transcriptionally Activated by p53 Suppresses Hedgehog Signaling *. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(47), 33020-33031. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597203

Cohen, D. J., & Young, J. G. (1977). Neurochemistry and child psychiatry. *Journal of the American Academy of Child Psychiatry*, *16*(3), 353-411. https://doi.org/10.1016/s0002-7138(09)61596-x

Conboy, K., Henshall, D. C., & Brennan, G. P. (2021). Epigenetic principles underlying epileptogenesis and epilepsy syndromes. *Neurobiology of Disease*, *148*, 105179. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105179

Constantino, J. N., Todorov, A., Hilton, C., Law, P., Zhang, Y., Molloy, E., Fitzgerald, R., & Geschwind, D. (2013). Autism recurrence in half siblings : Strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Molecular Psychiatry*, *18*(2), 137-138. https://doi.org/10.1038/mp.2012.9

Cordero, C., Schieve, L. A., Croen, L. A., Engel, S. M., Maria Siega-Riz, A., Herring, A. H., Vladutiu, C. J., Seashore, C. J., & Daniels, J. L. (2020). Neonatal jaundice in association with autism spectrum disorder and developmental disorder. *Journal of Perinatology*, *40*(2), 219-225. https://doi.org/10.1038/s41372-019-0452-4

Courchesne, E., Campbell, K., & Solso, S. (2011). Brain Growth Across the Life Span in Autism : Age-Specific Changes in Anatomical Pathology. *Brain research*, *1380*, 138-145. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.101

Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., Barnes, C. C., & Pierce, K. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA*, *306*(18), 2001-2010. https://doi.org/10.1001/jama.2011.1638

Courchesne, E., Yeung-Courchesne, R., Press, G. A., Hesselink, J. R., & Jernigan, T. L. (1988). Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *The New England Journal of Medicine*, *318*(21), 1349-1354. https://doi.org/10.1056/NEJM198805263182102

Crosswell, A. D., & Lockwood, K. G. (2020). Best practices for stress measurement : How to measure psychological stress in health research. *Health Psychology Open*, *7*(2), 2055102920933072. https://doi.org/10.1177/2055102920933072

Cruz-Correa, M. R., Sala, A. C., Cintrón, B., Hernández, J., Olivera, M., Cora, A., Moore, C. M., Luciano, C. A., Soto-Salgado, M., Giardiello, F. M., & Hooper, S. R. (2020). Ubiquitous neurocognitive dysfunction in familial adenomatous polyposis : Proof-of-concept of the role of APC protein in neurocognitive function. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, *18*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s13053-020-0135-3

Cuijpers, S. A. G., Willemstein, E., & Vertegaal, A. C. O. (2017). Converging Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) and Ubiquitin Signaling : Improved Methodology Identifies Co-modified Target Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *16*(12), 2281-2295. https://doi.org/10.1074/mcp.TIR117.000152

Daghsni, M., Rima, M., Fajloun, Z., Ronjat, M., Brusés, J. L., M'rad, R., & De Waard, M. (2018). Autism throughout genetics : Perusal of the implication of ion channels. *Brain and Behavior*, *8*(8), e00978. https://doi.org/10.1002/brb3.978

Dahdouh, A., Taleb, M., Blecha, L., & Benyamina, A. (2016). Genetics and psychotic disorders : A fresh look at consanguinity. *European Journal of Medical Genetics*, *59*(2), 104-110. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.12.010

Davis, J. K., & Broadie, K. (2017). Multifarious Functions of the Fragile X Mental Retardation Protein. *Trends in Genetics: TIG*, *33*(10), 703-714. https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.008

De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., 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, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., … Buxbaum, J. D. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, *515*(7526), 209-215. https://doi.org/10.1038/nature13772

Deckelbaum, R. J., Worgall, T. S., & Seo, T. (2006). N-3 fatty acids and gene expression. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(6 Suppl), 1520S-1525S. https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1520S

Degrassi, F., Damizia, M., & Lavia, P. (2019). The Mitotic Apparatus and Kinetochores in Microcephaly and Neurodevelopmental Diseases. *Cells*, *9*(1), 49. https://doi.org/10.3390/cells9010049

Deidda, G., Bozarth, I. F., & Cancedda, L. (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders : Investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 119. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00119

Devitt, N. M., Gallagher, L., & Reilly, R. B. (2015). Autism Spectrum Disorder (ASD) and Fragile X Syndrome (FXS) : Two Overlapping Disorders Reviewed through Electroencephalography-What Can be Interpreted from the Available Information? *Brain Sciences*, *5*(2), 92-117. https://doi.org/10.3390/brainsci5020092

DiCarlo, G. E., Aguilar, J. I., Matthies, H. J. G., Harrison, F. E., Bundschuh, K. E., West, A., Hashemi, P., Herborg, F., Rickhag, M., Chen, H., Gether, U., Wallace, M. T., & Galli, A. (2019). Autism-linked dopamine transporter mutation alters striatal dopamine neurotransmission and dopamine-dependent behaviors. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(8), 3407-3419. https://doi.org/10.1172/JCI127411

Diehl, C. (2019). Autism Spectrum Disorders, is it Under Reported In Third World Countries. *American Journal of Biomedical Science & Research*, *4*(4), 292.

Doan, R. N., Lim, E. T., De Rubeis, S., Betancur, C., Cutler, D. J., Chiocchetti, A. G., Overman, L. M., Soucy, A., Goetze, S., Freitag, C. M., Daly, M. J., Walsh, C. A., Buxbaum, J. D., & Yu, T. W. (2019). Recessive gene disruptions in autism spectrum disorder. *Nature Genetics*, *51*(7), 1092-1098. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0433-8

Donoghue, S. E., Pitt, J. J., Boneh, A., & White, S. M. (2018). Smith-Lemli-Opitz syndrome : Clinical and biochemical correlates. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, *31*(4), 451-459. https://doi.org/10.1515/jpem-2017-0501

Donovan, A. P. A., & Basson, M. A. (2017). The neuroanatomy of autism – a developmental perspective. *Journal of Anatomy*, *230*(1), 4-15. https://doi.org/10.1111/joa.12542

Dorsman, J. C., Levitus, M., Rockx, D., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Haitjema, A., Bakker, S. T., Steltenpool, J., Schuler, D., Mohan, S., Schindler, D., Arwert, F., Pals, G., Mathew, C. G., Waisfisz, Q., de Winter, J. P., & Joenje, H. (2007). Identification of the Fanconi Anemia Complementation Group I Gene, *FANCI*. *Analytical Cellular Pathology*, *29*(3), 211-218. https://doi.org/10.1155/2007/151968

Dube, W. V., Farber, R. S., Mueller, M. R., Grant, E., Lorin, L., & Deutsch, C. K. (2016). Stimulus Overselectivity in Autism, Down Syndrome, and Typical Development. *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, *121*(3), 219-235. https://doi.org/10.1352/1944-7558-121.3.219

Dubruc, E., Putoux, A., Labalme, A., Rougeot, C., Sanlaville, D., & Edery, P. (2014). A new intellectual disability syndrome caused by CTNNB1 haploinsufficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *164*(6), 1571-1575. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36484

Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P., Tourlet, S., Guilloteau, D., Chalon, S., & Andres, C. R. (2011). Fetal exposure to teratogens : Evidence of genes involved in autism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(5), 1254-1265. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.013

Edqvist, P.-H. D., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Danielsson, A., Edlund, K., Uhlén, M., & Pontén, F. (2015). Expression of Human Skin-Specific Genes Defined by Transcriptomics and Antibody-Based Profiling. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *63*(2), 129-141. https://doi.org/10.1369/0022155414562646

Eilam-Stock, T., Wu, T., Spagna, A., Egan, L. J., & Fan, J. (2016). Neuroanatomical Alterations in High-Functioning Adults with Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 237. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00237

Ekblad, M., Korkeila, J., & Lehtonen, L. (2015). Smoking during pregnancy affects foetal brain development. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, *104*(1), 12-18. https://doi.org/10.1111/apa.12791

Farr, C. V., El-Kasaby, A., Freissmuth, M., & Sucic, S. (2020). The Creatine Transporter Unfolded : A Knotty Premise in the Cerebral Creatine Deficiency Syndrome. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *12*, 588954. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.588954

Fatemi, S. H., Halt, A. R., Realmuto, G., Earle, J., Kist, D. A., Thuras, P., & Merz, A. (2002). Purkinje Cell Size Is Reduced in Cerebellum of Patients with Autism. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *22*(2), 171-175. https://doi.org/10.1023/A:1019861721160

Feingold, J. (1998). [Determining the genetic component of common diseases]. *Pathologie-Biologie*, *46*(9), 701-704.

Fen, Y., J, C., Mh, M., W, Y., L, L., H, L., V, E., & J, L. (2017). Risk of autism spectrum disorder in offspring following paternal use of selective serotonin reuptake inhibitors before conception : A population-based cohort study. *BMJ Open*, *7*(12). https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016368

Fletcher, R. H., Fletcher, S. W., & Fletcher, G. S. (2013). *Clinical epidemiology : The essentials: Fifth edition* (p. 255).

Forsberg, S. L., Ilieva, M., & Maria Michel, T. (2018). Epigenetics and cerebral organoids : Promising directions in autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, *8*(1), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41398-017-0062-x

Fountain, M. D., Oleson, D. S., Rech, M. E., Segebrecht, L., Hunter, J. V., McCarthy, J. M., Lupo, P. J., Holtgrewe, M., Moran, R., Rosenfeld, J. A., Isidor, B., Le Caignec, C., Saenz, M. S., Pedersen, R. C., Morgan, T. M., Pfotenhauer, J. P., Xia, F., Bi, W., Kang, S.-H. L., … Schaaf, C. P. (2019). Pathogenic variants in USP7 cause a neurodevelopmental disorder with speech delays, altered behavior, and neurologic anomalies. *Genetics in Medicine*, *21*(8), 1797-1807. https://doi.org/10.1038/s41436-019-0433-1

Fradin, D., Cheslack-Postava, K., Ladd-Acosta, C., Newschaffer, C., Chakravarti, A., Arking, D. E., Feinberg, A., & Fallin, M. D. (2010). Parent-Of-Origin Effects in Autism Identified through Genome-Wide Linkage Analysis of 16,000 SNPs. *PLoS ONE*, *5*(9), e12513. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012513

Garcia-Gil, M., Camici, M., Allegrini, S., Pesi, R., & Tozzi, M. G. (2021). Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 672182. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.672182

Gardener, H., Spiegelman, D., & Buka, S. L. (2011). Perinatal and neonatal risk factors for autism : A comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*, *128*(2), 344-355. https://doi.org/10.1542/peds.2010-1036

Gazestani, V. H., Pramparo, T., Nalabolu, S., Kellman, B. P., Murray, S., Lopez, L., Pierce, K., Courchesne, E., & Lewis, N. E. (2019). A perturbed gene network containing PI3K/AKT, RAS/ERK, WNT/β-catenin pathways in leukocytes is linked to ASD genetics and symptom severity. *Nature neuroscience*, *22*(10), 1624-1634. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0489-x

Gerges, P., Bitar, T., Hawat, M., Alameddine, A., Soufia, M., Andres, C. R., & Hleihel, W. (2020). Risk and Protective Factors in Autism Spectrum Disorders : A Case Control Study in the Lebanese Population. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(17), 6323. https://doi.org/10.3390/ijerph17176323

Gerges, P., Bitar, T., Laumonnier, F., Marouillat, S., Nemer, G., Andres, C. R., & Hleihel, W. (2022). Identification of Novel Gene Variants for Autism Spectrum Disorders in the Lebanese Population Using Whole-Exome Sequencing. *Genes*, *13*(2), 186. https://doi.org/10.3390/genes13020186

Girirajan, S., & Eichler, E. E. (2010). Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Human Molecular Genetics*, *19*(R2), R176-187. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq366

Gładysz, D., Krzywdzińska, A., & Hozyasz, K. K. (2018). Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder-Could They Hold Promise for Causative Treatment? *Molecular Neurobiology*, *55*(8), 6387-6435. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0822-x

Glinton, K. E., & Elsea, S. H. (2019). Untargeted Metabolomics for Autism Spectrum Disorders : Current Status and Future Directions. *Frontiers in Psychiatry*, *10*, 647. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00647

Goh, G., & Choi, M. (2012). Application of Whole Exome Sequencing to Identify Disease-Causing Variants in Inherited Human Diseases. *Genomics & Informatics*, *10*(4), 214-219. https://doi.org/10.5808/GI.2012.10.4.214

Goodman, J., Marsh, R., Peterson, B. S., & Packard, M. G. (2014). Annual Research Review : The neurobehavioral development of multiple memory systems: implications for childhood and adolescent psychiatric disorders. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, *55*(6), 582-610. https://doi.org/10.1111/jcpp.12169

Guang, S., Pang, N., Deng, X., Yang, L., He, F., Wu, L., Chen, C., Yin, F., & Peng, J. (2018). Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 470. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00470

Guisso, D. R., Saadeh, F. S., Saab, D., El Deek, J., Chamseddine, S., Abou-El-Hassan, H., Majari, G., & Boustany, R.-M. (2018). Association of Autism with Maternal Infections, Perinatal and Other Risk Factors : A Case-Control Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *48*(6), 2010-2021. https://doi.org/10.1007/s10803-017-3449-x

Haggarty, P. (2004). Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *European Journal of Clinical Nutrition*, *58*(12), 1559-1570. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602016

Halewa, J., Marouillat, S., Dixneuf, M., Thépault, R., Ung, D. C., Chatron, N., Gérard, B., Ghoumid, J., Lesca, G., Till, M., Smol, T., Couque, N., Ruaud, L., Chune, V., Grotto, S., Verloes, A., Vuillaume, M., Toutain, A., Raynaud, M., & Laumonnier, F. (2021). Novel missense mutations in PTCHD1 alter its plasma membrane subcellular localization and cause intellectual disability and autism spectrum disorder. *Human Mutation*, *42*(7), 848-861. https://doi.org/10.1002/humu.24208

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L. A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J. K., & Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of General Psychiatry*, *68*(11), 1095-1102. https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76

Hammock, E. A. D. (2015). Developmental Perspectives on Oxytocin and Vasopressin. *Neuropsychopharmacology*, *40*(1), 24-42. https://doi.org/10.1038/npp.2014.120

Hao, Y.-H., Fountain, M. D., Fon Tacer, K., Xia, F., Bi, W., Kang, S.-H. L., Patel, A., Rosenfeld, J. A., Le Caignec, C., Isidor, B., Krantz, I. D., Noon, S. E., Pfotenhauer, J. P., Morgan, T. M., Moran, R., Pedersen, R. C., Saenz, M. S., Schaaf, C. P., & Potts, P. R. (2015). USP7 Acts as a Molecular Rheostat to Promote WASH-Dependent Endosomal Protein Recycling and Is Mutated in a Human Neurodevelopmental Disorder. *Molecular Cell*, *59*(6), 956-969. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.033

Haq, S. H., AlAfaleq, N. O., & Johari, R. A. (2019). Vitamin D Treatment Reverses the Induced Oxidative Stress Damage to DNA. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, *22*(1), 8-14. https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.8.14

Hardan, A. Y., Pabalan, M., Gupta, N., Bansal, R., Melhem, N. M., Fedorov, S., Keshavan, M. S., & Minshew, N. J. (2009). Corpus callosum volume in children with autism. *Psychiatry Research*, *174*(1), 57-61. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2009.03.005

Hazlett, H. C., Poe, M., Gerig, G., Smith, R. G., Provenzale, J., Ross, A., Gilmore, J., & Piven, J. (2005). Magnetic resonance imaging and head circumference study of brain size in autism : Birth through age 2 years. *Archives of General Psychiatry*, *62*(12), 1366-1376. https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.12.1366

Henley, J. M., Craig, T. J., & Wilkinson, K. A. (2014). Neuronal SUMOylation : Mechanisms, Physiology, and Roles in Neuronal Dysfunction. *Physiological Reviews*, *94*(4), 1249-1285. https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2014

Herbert, M. R., Ziegler, D. A., Deutsch, C. K., O'Brien, L. M., Lange, N., Bakardjiev, A., Hodgson, J., Adrien, K. T., Steele, S., Makris, N., Kennedy, D., Harris, G. J., & Caviness, V. S. (2003). Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys. *Brain: A Journal of Neurology*, *126*(Pt 5), 1182-1192. https://doi.org/10.1093/brain/awg110

Hoffmann, A., & Spengler, D. (2021). Chromatin Remodeler CHD8 in Autism and Brain Development. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(2), 366. https://doi.org/10.3390/jcm10020366

Hogart, A., Wu, D., LaSalle, J. M., & Schanen, N. C. (2010). The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiology of Disease*, *38*(2), 181-191. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.011

Hollis, F., Kanellopoulos, A. K., & Bagni, C. (2017). Mitochondrial dysfunction in Autism Spectrum Disorder : Clinical features and perspectives. *Current Opinion in Neurobiology*, *45*, 178-187. https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.018

Hoxha, B., Hoxha, M., Domi, E., Gervasoni, J., Persichilli, S., Malaj, V., & Zappacosta, B. (2021). Folic Acid and Autism : A Systematic Review of the Current State of Knowledge. *Cells*, *10*(8), 1976. https://doi.org/10.3390/cells10081976

Hu, V. W., 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*(4), e19067. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019067

Huguet, G., Ey, E., & Bourgeron, T. (2013). The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *14*, 191-213. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153431

Huo, Y., Khatri, N., Hou, Q., Gilbert, J., Wang, G., & Man, H.-Y. (2015). The deubiquitinating enzyme USP46 regulates AMPA receptor ubiquitination and trafficking. *Journal of neurochemistry*, *134*(6), 1067-1080. https://doi.org/10.1111/jnc.13194

Husson, T., Lecoquierre, F., Cassinari, K., Charbonnier, C., Quenez, O., Goldenberg, A., Guerrot, A.-M., Richard, A.-C., Drouin-Garraud, V., Brehin, A.-C., Soleimani, M., Taton, R., Rotharmel, M., Rosier, A., Chambon, P., Le Meur, N., Joly-Helas, G., Saugier-Veber, P., Boland, A., … Campion, D. (2020). Rare genetic susceptibility variants assessment in autism spectrum disorder : Detection rate and practical use. *Translational Psychiatry*, *10*, 77. https://doi.org/10.1038/s41398-020-0760-7

Inestrosa, N. C., & Varela-Nallar, L. (2015). Wnt signalling in neuronal differentiation and development. *Cell and Tissue Research*, *359*(1), 215-223. https://doi.org/10.1007/s00441-014-1996-4

International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. (1998). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Human Molecular Genetics*, *7*(3), 571-578. https://doi.org/10.1093/hmg/7.3.571

Jaiswal, P., Guhathakurta, S., Singh, A. S., Verma, D., Pandey, M., Varghese, M., Sinha, S., Ghosh, S., Mohanakumar, K. P., & Rajamma, U. (2015). SLC6A4 markers modulate platelet 5-HT level and specific behaviors of autism : A study from an Indian population. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *56*, 196-206. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.09.004

Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., & Bourgeron, T. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, *34*(1), 27-29. https://doi.org/10.1038/ng1136

Janecka, M., Mill, J., Basson, M. A., Goriely, A., Spiers, H., Reichenberg, A., Schalkwyk, L., & Fernandes, C. (2017). Advanced paternal age effects in neurodevelopmental disorders—Review of potential underlying mechanisms. *Translational Psychiatry*, *7*(1), e1019-e1019. https://doi.org/10.1038/tp.2016.294

Jarick, I., Volckmar, A.-L., Pütter, C., Pechlivanis, S., Nguyen, T. T., Dauvermann, M. R., Beck, S., Albayrak, Ö., Scherag, S., Gilsbach, S., Cichon, S., Hoffmann, P., Degenhardt, F., Nöthen, M. M., Schreiber, S., Wichmann, H.-E., Jöckel, K.-H., Heinrich, J., Tiesler, C. M. T., … Hinney, A. (2014). Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals PARK2 as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry*, *19*(1), 115-121. https://doi.org/10.1038/mp.2012.161

Jenkins, T. A., Nguyen, J. C. D., Polglaze, K. E., & Bertrand, P. P. (2016). Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*, *8*(1), 56. https://doi.org/10.3390/nu8010056

Jesus-Ribeiro, J., Pires, L. M., Melo, J. D., Ribeiro, I. P., Rebelo, O., Sales, F., Freire, A., & Melo, J. B. (2020). Genomic and Epigenetic Advances in Focal Cortical Dysplasia Types I

and II : A Scoping Review. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 580357. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.580357

Jin, Y., Choi, J., Won, J., & Hong, Y. (2018). The Relationship between Autism Spectrum Disorder and Melatonin during Fetal Development. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, *23*(1), 198. https://doi.org/10.3390/molecules23010198

Jung, Y., Lee, A. M., McKee, S. A., & Picciotto, M. R. (2017). Maternal smoking and autism spectrum disorder : Meta-analysis with population smoking metrics as moderators. *Scientific Reports*, *7*(1), 4315. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04413-1

Kang, H., Han, K. A., Won, S. Y., Kim, H. M., Lee, Y.-H., Ko, J., & Um, J. W. (2016). Slitrk Missense Mutations Associated with Neuropsychiatric Disorders Distinctively Impair Slitrk Trafficking and Synapse Formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *9*, 104. https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00104

Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, *2*, 217-250.

Karimi, P., Kamali, E., Mousavi, S. M., & Karahmadi, M. (2017). Environmental factors influencing the risk of autism. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, *22*, 27. https://doi.org/10.4103/1735-1995.200272

Kelly, B., Williams, S., Collins, S., Mushtaq, F., Mon-Williams, M., Wright, B., Mason, D., & Wright, J. (2019). The association between socioeconomic status and autism diagnosis in the United Kingdom for children aged 5-8 years of age : Findings from the Born in Bradford cohort. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, *23*(1), 131-140. https://doi.org/10.1177/1362361317733182

Kemper, T. L., & Bauman, M. L. (1993). The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurologic Clinics*, *11*(1), 175-187.

Khramova, T. V., Kaysheva, A. L., Ivanov, Y. D., Pleshakova, T. O., Iourov, I. Y., Vorsanova, S. G., Yurov, Y. B., Schetkin, A. A., & Archakov, A. I. (2017). Serologic Markers of Autism Spectrum Disorder. *Journal of Molecular Neuroscience*, *62*(3-4), 420-429. https://doi.org/10.1007/s12031-017-0950-9

Khundrakpam, B. S., Lewis, J. D., Kostopoulos, P., Carbonell, F., & Evans, A. C. (2017). Cortical Thickness Abnormalities in Autism Spectrum Disorders Through Late Childhood, Adolescence, and Adulthood : A Large-Scale MRI Study. *Cerebral Cortex*, *27*(3), 1721-1731. https://doi.org/10.1093/cercor/bhx038

King, M., & Bearman, P. (2009). Diagnostic change and the increased prevalence of autism. *International Journal of Epidemiology*, *38*(5), 1224-1234. https://doi.org/10.1093/ije/dyp261

Kiykim, E., Zeybek, C. A., Zubarioglu, T., Cansever, S., Yalcinkaya, C., Soyucen, E., & Aydin, A. (2016). Inherited metabolic disorders in Turkish patients with autism spectrum disorders. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, *9*(2), 217-223. https://doi.org/10.1002/aur.1507

Kleinhans, N. M., Richards, T., Johnson, L. C., Weaver, K. E., Greenson, J., Dawson, G., & Aylward, E. (2011). FMRI evidence of neural abnormalities in the subcortical face processing system in ASD. *NeuroImage*, *54*(1), 697-704. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.07.037

Kobow, K., Kaspi, A., Harikrishnan, K. N., Kiese, K., Ziemann, M., Khurana, I., Fritzsche, I., Hauke, J., Hahnen, E., Coras, R., Mühlebner, A., El-Osta, A., & Blümcke, I. (2013). Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. *Acta Neuropathologica*, *126*(5), 741-756. https://doi.org/10.1007/s00401-013-1168-8

Kourtian, S., Soueid, J., Makhoul, N. J., Guisso, D. R., Chahrour, M., & Boustany, R.-M. N. (2017). Candidate Genes for Inherited Autism Susceptibility in the Lebanese Population. *Scientific Reports*, *7*, 45336. https://doi.org/10.1038/srep45336

Kouser, M., Speed, H. E., Dewey, C. M., Reimers, J. M., Widman, A. J., Gupta, N., Liu, S., Jaramillo, T. C., Bangash, M., Xiao, B., Worley, P. F., & Powell, C. M. (2013). Loss of Predominant Shank3 Isoforms Results in Hippocampus-Dependent Impairments in Behavior and Synaptic Transmission. *The Journal of Neuroscience*, *33*(47), 18448-18468. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3017-13.2013

Krumm, N., O'Roak, B. J., Shendure, J., & Eichler, E. E. (2014). A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends in Neurosciences*, *37*(2), 95-105. https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.11.005

Kuechler, A., Willemsen, M. H., Albrecht, B., Bacino, C. A., Bartholomew, D. W., van Bokhoven, H., van den Boogaard, M. J. H., Bramswig, N., Büttner, C., Cremer, K., Czeschik, J. C., Engels, H., van Gassen, K., Graf, E., van Haelst, M., He, W., Hogue, J. S., Kempers, M., Koolen, D., … Wieczorek, D. (2015). De novo mutations in beta-catenin (CTNNB1) appear to be a frequent cause of intellectual disability : Expanding the mutational and clinical spectrum. *Human Genetics*, *134*(1), 97-109. https://doi.org/10.1007/s00439-014-1498-1

Kumar, S., Reynolds, K., Ji, Y., Gu, R., Rai, S., & Zhou, C. J. (2019). Impaired neurodevelopmental pathways in autism spectrum disorder : A review of signaling mechanisms and crosstalk. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *11*(1), 10. https://doi.org/10.1186/s11689-019-9268-y

Kwan, V., Meka, D. P., White, S. H., Hung, C. L., Holzapfel, N. T., Walker, S., Murtaza, N., Unda, B. K., Schwanke, B., Yuen, R. K. C., Habing, K., Milsom, C., Hope, K. J., Truant, R., Scherer, S. W., Calderon de Anda, F., & Singh, K. K. (2016). DIXDC1 Phosphorylation and Control of Dendritic Morphology Are Impaired by Rare Genetic Variants. *Cell Reports*, *17*(7), 1892-1904. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.047

Kwan, V., Unda, B. K., & Singh, K. K. (2016). Wnt signaling networks in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *8*(1), 45. https://doi.org/10.1186/s11689-016-9176-3

LaSalle, J. M. (2013). Autism genes keep turning up chromatin. *OA autism*, *1*(2), 14.

Lee, M., Yoon, J., Song, H., Lee, B., Lam, D. T., Yoon, J., Baek, K., Clevers, H., & Jeong, Y. (2017). Tcf7l2 plays crucial roles in forebrain development through regulation of thalamic and habenular neuron identity and connectivity. *Developmental Biology*, *424*(1), 62-76. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.02.010

Levine, S. Z., Kodesh, A., Viktorin, A., Smith, L., Uher, R., Reichenberg, A., & Sandin, S. (2018). Association of Maternal Use of Folic Acid and Multivitamin Supplements in the Periods Before and During Pregnancy With the Risk of Autism Spectrum Disorder in Offspring. *JAMA Psychiatry*, *75*(2), 176-184. https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.4050

Li, J., Vestergaard, M., Obel, C., Christensen, J., Precht, D. H., Lu, M., & Olsen, J. (2009). A Nationwide Study on the Risk of Autism After Prenatal Stress Exposure to Maternal Bereavement. *Pediatrics*, *123*(4), 1102-1107. https://doi.org/10.1542/peds.2008-1734

Li, X., Li, Y., Li, S., Li, H., Yang, C., & Lin, J. (2021). The role of Shh signalling pathway in central nervous system development and related diseases. *Cell Biochemistry and Function*, *39*(2), 180-189. https://doi.org/10.1002/cbf.3582

Lim, C.-S., Kim, M. J., Choi, J. E., Islam, M. A., Lee, Y.-K., Xiong, Y., Shim, K.-W., Yang, J., Lee, R. U., Lee, J., Park, P., Kwak, J.-H., Seo, H., Kim, C. H., Lee, J.-H., Lee, Y.-S., Hwang, S.-K., Lee, K., Lee, J.-A., & Kaang, B.-K. (2021). Dysfunction of NMDA receptors in neuronal models of an autism spectrum disorder patient with a DSCAM mutation and in Dscam-knockout mice. *Molecular Psychiatry*, *26*(12), 7538-7549. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01216-9

Liu, A., Zhou, W., Qu, L., He, F., Wang, H., Wang, Y., Cai, C., Li, X., Zhou, W., & Wang, M. (2019). Altered Urinary Amino Acids in Children With Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00007

Liu, Y., Shen, L., Zhang, Y., Zhao, R., Liu, C., Luo, S., Chen, J., Xia, L., Li, T., Peng, Y., & Xia, K. (2021). Rare NRXN1 missense variants identified in autism interfered protein degradation and Drosophila sleeping. *Journal of Psychiatric Research*, *143*, 113-122. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.09.013

Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *56*(6), 466-474. https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013

Lotter, V. (1966). Epidemiology of autistic conditions in young children. *Social Psychiatry*, *1*(3), 124-135. https://doi.org/10.1007/BF00584048

Lyall, K., Munger, K. L., O'Reilly, É. J., Santangelo, S. L., & Ascherio, A. (2013). Maternal dietary fat intake in association with autism spectrum disorders. *American Journal of Epidemiology*, *178*(2), 209-220. https://doi.org/10.1093/aje/kws433

Lyall, K., Song, L., Botteron, K., Croen, L. A., Dager, S. R., Fallin, M. D., Hazlett, H. C., Kauffman, E., Landa, R., Ladd-Acosta, C., Messinger, D. S., Ozonoff, S., Pandey, J., Piven, J., Schmidt, R. J., Schmidt, R. J., Schultz, R. T., Stone, W. L., Newschaffer, C. J., & Volk, H. E. (2020). The Association Between Parental Age and Autism-Related Outcomes in Children at High Familial Risk for Autism. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, *13*(6), 998-1010. https://doi.org/10.1002/aur.2303

Ma, S.-L., Chen, L. H., Lee, C.-C., Lai, K. Y. C., Hung, S.-F., Tang, C.-P., Ho, T.-P., Shea, C., Mo, F., Mak, T. S. H., Sham, P.-C., & Leung, P. W. L. (2021). Genetic Overlap Between Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder in SHANK2 Gene. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2021.649588

Maenner, M. J. (2020). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR. Surveillance Summaries*, *69*. https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6904a1

Magnusson, C., Lundberg, M., Lee, B. K., Rai, D., Karlsson, H., Gardner, R., Kosidou, K., Arver, S., & Dalman, C. (2016). Maternal vitamin D deficiency and the risk of autism spectrum disorders : Population-based study. *BJPsych Open*, *2*(2), 170-172. https://doi.org/10.1192/bjpo.bp.116.002675

Mahdavi, M., Kheirollahi, M., Riahi, R., Khorvash, F., Khorrami, M., & Mirsafaie, M. (2018). Meta-Analysis of the Association between GABA Receptor Polymorphisms and Autism Spectrum Disorder (ASD). *Journal of Molecular Neuroscience*, *65*. https://doi.org/10.1007/s12031-018-1073-7

Marotta, R., Risoleo, M. C., Messina, G., Parisi, L., Carotenuto, M., Vetri, L., & Roccella, M. (2020). The Neurochemistry of Autism. *Brain Sciences*, *10*(3), 163. https://doi.org/10.3390/brainsci10030163

Marshall, C. R., Noor, A., Vincent, J. B., Lionel, A. C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., Thiruvahindrapduram, B., Fiebig, A., Schreiber, S., Friedman, J., Ketelaars, C. E. J., Vos, Y. J., Ficicioglu, C., Kirkpatrick, S., Nicolson, R., … Scherer, S. W. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, *82*(2), 477-488. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.009

Martin, P.-M., Yang, X., Robin, N., Lam, E., Rabinowitz, J. S., Erdman, C. A., Quinn, J., Weiss, L. A., Hamilton, S. P., Kwok, P.-Y., Moon, R. T., & Cheyette, B. N. R. (2013). A rare WNT1 missense variant overrepresented in ASD leads to increased Wnt signal pathway activation. *Translational Psychiatry*, *3*(9), e301. https://doi.org/10.1038/tp.2013.75

Martin-Ruiz, C. M., Lee, M., Perry, R. H., Baumann, M., Court, J. A., & Perry, E. K. (2004). Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Molecular Brain Research*, *123*(1), 81-90. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.01.003

Matsumoto, S., Häberle, J., Kido, J., Mitsubuchi, H., Endo, F., & Nakamura, K. (2019). Urea cycle disorders-update. *Journal of Human Genetics*, *64*(9), 833-847. https://doi.org/10.1038/s10038-019-0614-4

Maxeiner, S., Benseler, F., Krasteva-Christ, G., Brose, N., & Südhof, T. C. (2020). Evolution of the Autism-Associated Neuroligin-4 Gene Reveals Broad Erosion of Pseudoautosomal Regions in Rodents. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1243-1258. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa014

Mayer, E. A., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(3), 926-938. https://doi.org/10.1172/JCI76304

McNeill, J. K., Walton, J. C., & Albers, H. E. (2018). Functional Significance of the Excitatory Effects of GABA in the Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of biological rhythms*, *33*(4), 376-387. https://doi.org/10.1177/0748730418782820

Millan, M. J. (2013). An epigenetic framework for neurodevelopmental disorders : From pathogenesis to potential therapy. *Neuropharmacology*, *68*, 2-82. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.015

Ming, F., Tan, J., Qin, L., Zhang, H., Tang, J., Tan, X., & Wang, C. (2020). The PARK2 Mutation Associated with Parkinson's Disease Enhances the Vulnerability of Peripheral Blood Lymphocytes to Paraquat. *BioMed Research International*, *2020*, e4658109. https://doi.org/10.1155/2020/4658109

Mizuno, A., Villalobos, M. E., Davies, M. M., Dahl, B. C., & Müller, R.-A. (2006). Partially enhanced thalamocortical functional connectivity in autism. *Brain Research*, *1104*(1), 160-174. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.064

Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism : An evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, *8*, 13. https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4

Moerkerke, M., Bonte, M.-L., Daniels, N., Chubar, V., Alaerts, K., Steyaert, J., & Boets, B. (2021). Oxytocin receptor gene (OXTR) DNA methylation is associated with autism and related social traits – A systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, *85*, 101785. https://doi.org/10.1016/j.rasd.2021.101785

Mohammad-Rezazadeh, I., Frohlich, J., Loo, S. K., & Jeste, S. S. (2016). Brain connectivity in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Neurology*, *29*(2), 137-147. https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000301

Mohn, J. L., Alexander, J., Pirone, A., Palka, C. D., Lee, S.-Y., Mebane, L., Haydon, P. G., & Jacob, M. H. (2014). Adenomatous polyposis coli protein deletion leads to cognitive and autism-like disabilities. *Molecular Psychiatry*, *19*(10), 1133-1142. https://doi.org/10.1038/mp.2014.61

Montanari, M., Martella, G., Bonsi, P., & Meringolo, M. (2022). Autism Spectrum Disorder : Focus on Glutamatergic Neurotransmission. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(7), 3861. https://doi.org/10.3390/ijms23073861

Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins : Roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, *18*(3), 147-157. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183

Morales, D. R., Slattery, J., Evans, S., & Kurz, X. (2018). Antidepressant use during pregnancy and risk of autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder : Systematic review of observational studies and methodological considerations. *BMC Medicine*, *16*, 6. https://doi.org/10.1186/s12916-017-0993-3

Mpoulimari, I., & Zintzaras, E. (2022). Identification of Chromosomal Regions Linked to Autism-Spectrum Disorders : A Meta-Analysis of Genome-Wide Linkage Scans. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, *26*(2), 59-69. https://doi.org/10.1089/gtmb.2021.0236

Mucciolo, M., Marco, C., Canitano, R., Buoni, S., Frullanti, E., Mencarelli, M., Bizzarri, V., Amabile, S., Radice, L., Baldassarri, M., Lo Rizzo, C., Meloni, I., Hayek, J., Renieri, A., & Mari, F. (2016). A Genome Wide Copy Number Variations Analysis in Autism Spectrum Disorder (Asd) and Intellectual Disability (Id) in Italian Families. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, *7*. https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000307

Muller, C. L., Anacker, A. M. J., & Veenstra-VanderWeele, J. (2016). The serotonin system in autism spectrum disorder : From biomarker to animal models. *Neuroscience*, *321*, 24. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.010

NCBI. (2022). *LSMEM2 leucine rich single-pass membrane protein 2 [Homo sapiens (human)]—Gene—NCBI*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=132228

Neale, B. M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K. E., Sabo, A., Lin, C.-F., Stevens, C., Wang, L.-S., Makarov, V., Polak, P., Yoon, S., Maguire, J., Crawford, E. L., Campbell, N. G., Geller, E. T., Valladares, O., Shafer, C., Liu, H., … Daly, M. J. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, *485*(7397), 242-245. https://doi.org/10.1038/nature11011

Neggers, Y. H. (2014). Increasing Prevalence, Changes in Diagnostic Criteria, and Nutritional Risk Factors for Autism Spectrum Disorders. *ISRN Nutrition*, *2014*, e514026. https://doi.org/10.1155/2014/514026

Noor, A., Whibley, A., Marshall, C. R., Gianakopoulos, P. J., Piton, A., Carson, A. R., Orlic-Milacic, M., Lionel, A. C., Sato, D., Pinto, D., Drmic, I., Noakes, C., Senman, L., Zhang, X., Mo, R., Gauthier, J., Crosbie, J., Pagnamenta, A. T., Munson, J., … Vincent, J. B. (2010). Disruption at the PTCHD1 Locus on Xp22.11 in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability. *Science Translational Medicine*, *2*(49), 49ra68-49ra68. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001267

Ohta, H., Nordahl, C. W., Iosif, A.-M., Lee, A., Rogers, S., & Amaral, D. G. (2016). Increased Surface Area, but not Cortical Thickness, in a Subset of Young Boys With Autism Spectrum Disorder. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, *9*(2), 232-248. https://doi.org/10.1002/aur.1520

Oikonomakis, V., Kosma, K., Mitrakos, A., Sofocleous, C., Pervanidou, P., Syrmou, A., Pampanos, A., Psoni, S., Fryssira, H., Kanavakis, E., Kitsiou-Tzeli, S., & Tzetis, M. (2016). Recurrent copy number variations as risk factors for autism spectrum disorders : Analysis of the clinical implications. *Clinical Genetics*, *89*(6), 708-718. https://doi.org/10.1111/cge.12740

Ornoy, A., Weinstein-Fudim, L., & Ergaz, Z. (2016). Genetic Syndromes, Maternal Diseases and Antenatal Factors Associated with Autism Spectrum Disorders (ASD). *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 316. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00316

O'Roak, B. J., Stessman, H. A., Boyle, E. A., Witherspoon, K. T., Martin, B., Lee, C., Vives, L., Baker, C., Hiatt, J. B., Nickerson, D. A., Bernier, R., Shendure, J., & Eichler, E. E. (2014). Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nature Communications*, *5*(1), 5595. https://doi.org/10.1038/ncomms6595

O'Roak, B. J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J. D., Stanaway, I. B., Phelps, I. G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., Munson, J., Hiatt, J. B., Turner, E. H., Levy, R., O'Day, D. R., Krumm, N., Coe, B. P., Martin, B. K., Borenstein, E., … Shendure, J. (2012). Multiplex

targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science (New York, N.Y.)*, *338*(6114), 1619-1622. https://doi.org/10.1126/science.1227764

O'Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernot, B., Malig, M., Baker, C., Reilly, B., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., … Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, *485*(7397), 246-250. https://doi.org/10.1038/nature10989

Oron, O., & Elliott, E. (2017). Delineating the Common Biological Pathways Perturbed by ASD's Genetic Etiology : Lessons from Network-Based Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4), 828. https://doi.org/10.3390/ijms18040828

Oxelgren, U. W., Myrelid, Å., Annerén, G., Ekstam, B., Göransson, C., Holmbom, A., Isaksson, A., Åberg, M., Gustafsson, J., & Fernell, E. (2017). Prevalence of autism and attention-deficit-hyperactivity disorder in Down syndrome : A population-based study. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *59*(3), 276-283. https://doi.org/10.1111/dmcn.13217

Pastore, S. F., Ko, S. Y., Frankland, P. W., Hamel, P. A., & Vincent, J. B. (2022). PTCHD1 : Identification and Neurodevelopmental Contributions of an Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability Susceptibility Gene. *Genes*, *13*(3), 527. https://doi.org/10.3390/genes13030527

Peesay, M. (2017). Nuchal cord and its implications. *Maternal Health, Neonatology and Perinatology*, *3*, 28. https://doi.org/10.1186/s40748-017-0068-7

Pizzo, L., Jensen, M., Polyak, A., Rosenfeld, J. A., Mannik, K., Krishnan, A., McCready, E., Pichon, O., Le Caignec, C., Van Dijck, A., Pope, K., Voorhoeve, E., Yoon, J., Stankiewicz, P., Cheung, S. W., Pazuchanics, D., Huber, E., Kumar, V., Kember, R. L., … Girirajan, S. (2019). Rare variants in the genetic background modulate cognitive and developmental phenotypes in individuals carrying disease-associated variants. *Genetics in Medicine*, *21*(4), 816-825. https://doi.org/10.1038/s41436-018-0266-3

Platt, R. J., Zhou, Y., Slaymaker, I. M., Shetty, A. S., Weisbach, N. R., Kim, J.-A., Sharma, J., Desai, M., Sood, S., Kempton, H. R., Crabtree, G. R., Feng, G., & Zhang, F. (2017). Chd8 mutation leads to autistic-like behaviors and impaired striatal circuits. *Cell reports*, *19*(2), 335-350. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.052

Principi, N., & Esposito, S. (2020). Vitamin D Deficiency During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders Development. *Frontiers in Psychiatry*, *10*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyt.2019.00987

Proenca, C. C., Gao, K. P., Shmelkov, S. V., Rafii, S., & Lee, F. S. (2011). Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. *Trends in Neurosciences*, *34*(3), 143-153. https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.01.001

Pugsley, K., Scherer, S. W., Bellgrove, M. A., & Hawi, Z. (2021). Environmental exposures associated with elevated risk for autism spectrum disorder may augment the burden of deleterious de novo mutations among probands. *Molecular Psychiatry*, 1-21. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01142-w

Quaak, I., Brouns, M. R., & Van de Bor, M. (2013). The dynamics of autism spectrum disorders : How neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(8), 3384-3408. https://doi.org/10.3390/ijerph10083384

Quartier, A., Courraud, J., Thi Ha, T., McGillivray, G., Isidor, B., Rose, K., Drouot, N., Savidan, M.-A., Feger, C., Jagline, H., Chelly, J., Shaw, M., Laumonnier, F., Gecz, J., Mandel, J.-L., & Piton, A. (2019). Novel mutations in NLGN3 causing autism spectrum disorder and cognitive impairment. *Human Mutation*, *40*(11), 2021-2032. https://doi.org/10.1002/humu.23836

Rajamani, K. T., Wagner, S., Grinevich, V., & Harony-Nicolas, H. (2018). Oxytocin as a Modulator of Synaptic Plasticity : Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *10*, 17. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00017

Reichow, B., Hume, K., Barton, E. E., & Boyd, B. A. (2018). Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD). *The Cochrane*

*Database of Systematic Reviews*, *2018*(5), CD009260. https://doi.org/10.1002/14651858.CD009260.pub3

Rett, A. (1966). *Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. Wiener medizinische Wochenschrift. 116:*, 723-726 eller 723-738.

Rice, C. E., Rosanoff, M., Dawson, G., Durkin, M. S., Croen, L. A., Singer, A., & Yeargin-Allsopp, M. (2012). Evaluating Changes in the Prevalence of the Autism Spectrum Disorders (ASDs). *Public health reviews*, *34*(2), 1-22.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405-424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Rimland, B. (1964). *Infantile Autism : The Syndrome and Its Implications for a Neural Theory of Behavior (1964), by Bernard Rimland | The Embryo Project Encyclopedia*. https://embryo.asu.edu/pages/infantile-autism-syndrome-and-its-implications-neural-theory-behavior-1964-bernard-rimland

Roberts, J. L., Hovanes, K., Dasouki, M., Manzardo, A. M., & Butler, M. G. (2014). Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene*, *535*(1), 70-78. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.020

Rodenburg, R. J. (2018). The functional genomics laboratory : Functional validation of genetic variants. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *41*(3), 297-307. https://doi.org/10.1007/s10545-018-0146-7

Ronald, A., & Hoekstra, R. (2014). Progress in Understanding the Causes of Autism Spectrum Disorders and Autistic Traits : Twin Studies from 1977 to the Present Day. *Behavior Genetics of Psychopathology*, 33-65. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9509-3_2

Rose, S., Niyazov, D. M., Rossignol, D. A., Goldenthal, M., Kahler, S. G., & Frye, R. E. (2018). Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism

Spectrum Disorder. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *22*(5), 571-593. https://doi.org/10.1007/s40291-018-0352-x

Rosenberg, R., Jk, L., G, Y., J, M., We, K., & Pa, L. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, *163*(10). https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.98

Rosenfeld, J. A., Ballif, B. C., Torchia, B. S., Sahoo, T., Ravnan, J. B., Schultz, R., Lamb, A., Bejjani, B. A., & Shaffer, L. G. (2010). Copy number variations associated with autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *12*(11), 694-702. https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181f0c5f3

Rossignol, D. A., & Frye, R. E. (2011). Melatonin in autism spectrum disorders : A systematic review and meta-analysis. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *53*(9), 783-792. https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2011.03980.x

Rujeedawa, T., & Zaman, S. H. (2022). The Diagnosis and Management of Autism Spectrum Disorder (ASD) in Adult Females in the Presence or Absence of an Intellectual Disability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(3), 1315. https://doi.org/10.3390/ijerph19031315

Rylaarsdam, L., & Guemez-Gamboa, A. (2019). Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00385

Sacco, R., Gabriele, S., & Persico, A. M. (2015). Head circumference and brain size in autism spectrum disorder : A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Research*, *234*(2), 239-251. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2015.08.016

Sadigurschi, N., & Golan, H. M. (2019). Maternal and offspring methylenetetrahydrofolate-reductase genotypes interact in a mouse model to induce autism spectrum disorder-like behavior. *Genes, Brain, and Behavior*, *18*(1), e12547. https://doi.org/10.1111/gbb.12547

Sanders, S. J., Ercan-Sencicek, A. G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M. T., Moreno-De-Luca, D., Chu, S. H., Moreau, M. P., Gupta, A. R., Thomson, S. A., Mason, C. E., Bilguvar, K.,

Celestino-Soper, P. B. S., Choi, M., Crawford, E. L., Davis, L., Wright, N. R. D., Dhodapkar, R. M., DiCola, M., … State, M. W. (2011). Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*, *70*(5), 863-885. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.002

Sanders, S. J., Murtha, M. T., Gupta, A. R., Murdoch, J. D., Raubeson, M. J., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., DiLullo, N. M., Parikshak, N. N., Stein, J. L., Walker, M. F., Ober, G. T., Teran, N. A., Song, Y., El-Fishawy, P., Murtha, R. C., Choi, M., Overton, J. D., Bjornson, R. D., … State, M. W. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, *485*(7397), 237-241. https://doi.org/10.1038/nature10945

Sanderson, M. R., Fahlman, R. P., & Wevrick, R. (2021). The N-terminal domain of the Schaaf–Yang syndrome protein MAGEL2 likely has a role in RNA metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *297*(2), 100959. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100959

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA*, *311*(17), 1770-1777. https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144

Satterstrom, F. K., Walters, R. K., Singh, T., Wigdor, E. M., Lescai, F., Demontis, D., Kosmicki, J. A., Grove, J., Stevens, C., Bybjerg-Grauholm, J., Bækvad-Hansen, M., Palmer, D. S., Maller, J. B., Nordentoft, M., Mors, O., Robinson, E. B., Hougaard, D. M., Werge, T. M., Bo Mortensen, P., … Daly, M. J. (2019). Autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder have a similar burden of rare protein-truncating variants. *Nature Neuroscience*, *22*(12), 1961-1965. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0527-8

Sauer, A. K., Stanton, J. E., Hans, S., & Grabrucker, A. M. (2021). Autism Spectrum Disorders : Etiology and Pathology. In A. M. Grabrucker (Éd.), *Autism Spectrum Disorders*. Exon Publications. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK573613/

Schalbroeck, R., van Velden, F. H. P., de Geus-Oei, L.-F., Yaqub, M., van Amelsvoort, T., Booij, J., & Selten, J.-P. (2021). Striatal dopamine synthesis capacity in autism spectrum disorder and its relation with social defeat : An [18F]-FDOPA PET/CT study. *Translational Psychiatry*, *11*(1), 1-10. https://doi.org/10.1038/s41398-020-01174-w

Schendel, D., & Bhasin, T. K. (2008). Birth weight and gestational age characteristics of children with autism, including a comparison with other developmental disabilities. *Pediatrics*, *121*(6), 1155-1164. https://doi.org/10.1542/peds.2007-1049

Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., & Schachtrup, C. (2013). Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *71*, 50079. https://doi.org/10.3791/50079

Schmidt, R. J., Tancredi, D. J., Ozonoff, S., Hansen, R. L., Hartiala, J., Allayee, H., Schmidt, L. C., Tassone, F., & Hertz-Picciotto, I. (2012). Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *96*(1), 80-89. https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004416

Schulze, A., Bauman, M., Tsai, A. C.-H., Reynolds, A., Roberts, W., Anagnostou, E., Cameron, J., Nozzolillo, A. A., Chen, S., Kyriakopoulou, L., Scherer, S. W., & Loh, A. (2016). Prevalence of Creatine Deficiency Syndromes in Children With Nonsyndromic Autism. *Pediatrics*, *137*(1), e20152672. https://doi.org/10.1542/peds.2015-2672

Schumann, C. M., Carter Barnes, C., Lord, C., & Courchesne, E. (2009). Amygdala Enlargement in Toddlers with Autism Related to Severity of Social and Communication Impairments. *Biological psychiatry*, *66*(10), 942-949. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.07.007

Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., Leotta, A., Pai, D., Zhang, R., Lee, Y.-H., Hicks, J., Spence, S. J., Lee, A. T., Puura, K., Lehtimäki, T., … Wigler, M. (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5823), 445-449. https://doi.org/10.1126/science.1138659

Sgadò, P., Genovesi, S., Kalinovsky, A., Zunino, G., Macchi, F., Allegra, M., Murenu, E., Provenzano, G., Tripathi, P. P., Casarosa, S., Joyner, A. L., & Bozzi, Y. (2013). Loss of GABAergic neurons in the hippocampus and cerebral cortex of Engrailed-2 null mutant mice : Implications for autism spectrum disorders. *Experimental neurology*, *247*, 496-505. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.021

Sharma, S., Datta, P., Sabharwal, J. R., & Datta, S. (2017). Nance–Horan Syndrome : A Rare Case Report. *Contemporary Clinical Dentistry*, *8*(3), 469-472. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_232_17

Shi, L., Zhang, X., Golhar, R., Otieno, F. G., He, M., Hou, C., Kim, C., Keating, B., Lyon, G. J., Wang, K., & Hakonarson, H. (2013). Whole-genome sequencing in an autism multiplex family. *Molecular Autism*, *4*(1), 8. https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-8

Shuid, A. N., Jayusman, P. A., Shuid, N., Ismail, J., Kamal Nor, N., & Mohamed, I. N. (2021). Association between Viral Infections and Risk of Autistic Disorder : An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(6), 2817. https://doi.org/10.3390/ijerph18062817

Sjaarda, C. P., Hecht, P., McNaughton, A. J. M., Zhou, A., Hudson, M. L., Will, M. J., Smith, G., Ayub, M., Liang, P., Chen, N., Beversdorf, D., & Liu, X. (2017). Interplay between maternal Slc6a4 mutation and prenatal stress : A possible mechanism for autistic behavior development. *Scientific Reports*, *7*(1), 8735. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07405-3

Skefos, J., Cummings, C., Enzer, K., Holiday, J., Weed, K., Levy, E., Yuce, T., Kemper, T., & Bauman, M. (2014). Regional alterations in purkinje cell density in patients with autism. *PloS One*, *9*(2), e81255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081255

Sowers, L. P., Loo, L., Wu, Y., Campbell, E., Ulrich, J. D., Wu, S., Paemka, L., Wassink, T., Meyer, K., Bing, X., El-Shanti, H., Usachev, Y. M., Ueno, N., Manak, R. J., Shepherd, A. J., Ferguson, P. J., Darbro, B. W., Richerson, G. B., Mohapatra, D. P., … Bassuk, A. G. (2013). Disruption of the non-canonical Wnt gene PRICKLE2 leads to autism-like behaviors with evidence for hippocampal synaptic dysfunction. *Molecular Psychiatry*, *18*(10), 1077-1089. https://doi.org/10.1038/mp.2013.71

Staal, W. G. (2015). Autism, DRD3 and repetitive and stereotyped behavior, an overview of the current knowledge. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *25*(9), 1421-1426. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.08.011

Stagni, F., Giacomini, A., Guidi, S., Ciani, E., & Bartesaghi, R. (2015). Timing of therapies for Down syndrome : The sooner, the better. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00265

Sui, Y. V., Donaldson, J., Miles, L., Babb, J. S., Castellanos, F. X., & Lazar, M. (2018). Diffusional kurtosis imaging of the corpus callosum in autism. *Molecular Autism*, *9*(1), 62. https://doi.org/10.1186/s13229-018-0245-1

Talmi, Z., Mankuta, D., & Raz, R. (2020). Birth weight and autism spectrum disorder : A population-based nested case–control study. *Autism Research*, *13*(4), 655-665. https://doi.org/10.1002/aur.2260

Tamura, R., Kitamura, H., Endo, T., Hasegawa, N., & Someya, T. (2010). Reduced thalamic volume observed across different subgroups of autism spectrum disorders. *Psychiatry Research*, *184*(3), 186-188. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2010.07.001

Tan, M., Yang, T., Zhu, J., Li, Q., Lai, X., Li, Y., Tang, T., Chen, J., & Li, T. (2020). Maternal folic acid and micronutrient supplementation is associated with vitamin levels and symptoms in children with autism spectrum disorders. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *91*, 109-115. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.11.009

The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2004). Enhancing linkage analysis of complex disorders : An evaluation of high-density genotyping. *Human Molecular Genetics*, *13*(17), 1943-1949. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh202

Thomas, N. S., Sharp, A. J., Browne, C. E., Skuse, D., Hardie, C., & Dennis, N. R. (1999). Xp deletions associated with autism in three females. *Human Genetics*, *104*(1), 43-48. https://doi.org/10.1007/s004390050908

Thomson, M. (2013). The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *69*(3), 559-573. https://doi.org/10.1007/s13105-012-0227-2

Topper, S., Ober, C., & Das, S. (2011). Exome Sequencing and the Genetics of Intellectual Disability. *Clinical genetics*, *80*(2), 117-126. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01720.x

Tora, D., Gomez, A. M., Michaud, J.-F., Yam, P. T., Charron, F., & Scheiffele, P. (2017). Cellular Functions of the Autism Risk Factor PTCHD1 in Mice. *The Journal of Neuroscience*, *37*(49), 11993-12005. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1393-17.2017

Tordjman, S., Najjar, I., Bellissant, E., Anderson, G. M., Barburoth, 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. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 20508-20542. https://doi.org/10.3390/ijms141020508

Torrico, T. J., & Munakomi, S. (2022). Neuroanatomy, Thalamus. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542184/

Tremblay, M. W., & Jiang, Y. (2019). DNA Methylation and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder. *Annual review of medicine*, *70*, 151-166. https://doi.org/10.1146/annurev-med-120417-091431

Tromp, A., Mowry, B., & Giacomotto, J. (2021). Neurexins in autism and schizophrenia-a review of patient mutations, mouse models and potential future directions. *Molecular Psychiatry*, *26*(3), 747-760. https://doi.org/10.1038/s41380-020-00944-8

Tsatsanis, K. D., Rourke, B. P., Klin, A., Volkmar, F. R., Cicchetti, D., & Schultz, R. T. (2003). Reduced thalamic volume in high-functioning individuals with autism. *Biological Psychiatry*, *53*(2), 121-129. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01530-5

Tunç, G., Uzun Çiçek, A., & Kiliçbay, F. (2021). Risk of autism spectrum disorder in children with a history of hospitalization for neonatal jaundice. *Turkish Journal of Medical Sciences*. https://doi.org/10.3906/sag-2103-263

Tzoumis, K. A. (2020). *Toxic Chemicals in America : Controversies in Human and Environmental Health [2 volumes]*. ABC-CLIO.

Ung, D. C., Iacono, G., Méziane, H., Blanchard, E., Papon, M.-A., Selten, M., van Rhijn, J.-R., Montjean, R., Rucci, J., Martin, S., Fleet, A., Birling, M.-C., Marouillat, S., Roepman, R., Selloum, M., Lux, A., Thépault, R.-A., Hamel, P., Mittal, K., … Laumonnier, F. (2018).

Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse. *Molecular Psychiatry*, *23*(5), 1356-1367. https://doi.org/10.1038/mp.2017.39

Vaccarino, F. M., & Smith, K. M. (2009). Increased brain size in autism—What it will take to solve a mystery. *Biological psychiatry*, *66*(4), 313-315. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.06.013

Van den Bergh, B. R. H., van den Heuvel, M. I., Lahti, M., Braeken, M., de Rooij, S. R., Entringer, S., Hoyer, D., Roseboom, T., Räikkönen, K., King, S., & Schwab, M. (2020). Prenatal developmental origins of behavior and mental health : The influence of maternal stress in pregnancy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *117*, 26-64. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.003

Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, *57*(1), 67-81. https://doi.org/10.1002/ana.20315

Verhoeven, J. S., De Cock, P., Lagae, L., & Sunaert, S. (2010). Neuroimaging of autism. *Neuroradiology*, *52*(1), 3-14. https://doi.org/10.1007/s00234-009-0583-y

Vickers, R. R., & Gibson, J. S. (2019). A Review of the Genomic Analysis of Children Presenting with Developmental Delay/Intellectual Disability and Associated Dysmorphic Features. *Cureus*, *11*(1), e3873. https://doi.org/10.7759/cureus.3873

Vidal, C. N., Nicolson, R., DeVito, T. J., Hayashi, K. M., Geaga, J. A., Drost, D. J., Williamson, P. C., Rajakumar, N., Sui, Y., Dutton, R. A., Toga, A. W., & Thompson, P. M. (2006). Mapping corpus callosum deficits in autism : An index of aberrant cortical connectivity. *Biological Psychiatry*, *60*(3), 218-225. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.11.011

Virk, J., Liew, Z., Olsen, J., Nohr, E. A., Catov, J. M., & Ritz, B. (2016). Preconceptional and prenatal supplementary folic acid and multivitamin intake and autism spectrum disorders. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, *20*(6), 710-718. https://doi.org/10.1177/1362361315604076

Vissers, L. E. L. M., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Steehouwer, M., de Vries, P., van Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., del Rosario, M., van Bon, B. W. M., Hoischen, A., de Vries, B. B. A., Brunner, H. G., & Veltman, J. A. (2010). A de novo paradigm for mental retardation. *Nature Genetics*, *42*(12), 1109-1112. https://doi.org/10.1038/ng.712

Volkmar, F. R., Klin, A., Siegel, B., Szatmari, P., Lord, C., Campbell, M., Freeman, B. J., Cicchetti, D. V., Rutter, M., & Kline, W. (1994). Field trial for autistic disorder in DSM-IV. *The American Journal of Psychiatry*, *151*(9), 1361-1367. https://doi.org/10.1176/ajp.151.9.1361

Volkmar, F. R., Paul, R., Klin, A., & Cohen, D. J. (2005). *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders, Diagnosis, Development, Neurobiology, and Behavior*. John Wiley & Sons.

Volkmar, F. R., & Reichow, B. (2013). Autism in DSM-5 : Progress and challenges. *Molecular Autism*, *4*, 13. https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-13

von Ehrenstein, O. S., Cui, X., Yan, Q., Aralis, H., & Ritz, B. (2021). Maternal Prenatal Smoking and Autism Spectrum Disorder in Offspring : A California Statewide Cohort and Sibling Study. *American Journal of Epidemiology*, *190*(5), 728-737. https://doi.org/10.1093/aje/kwaa182

Vyas, Y., Cheyne, J. E., Lee, K., Jung, Y., Cheung, P. Y., & Montgomery, J. M. (2021). Shankopathies in the Developing Brain in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2021.775431

Wang, L., Almeida, L. E. F., Spornick, N. A., Kenyon, N., Kamimura, S., Khaibullina, A., Nouraie, M., & Quezado, Z. M. N. (2015). Modulation of social deficits and repetitive behaviors in a mouse model of autism : The role of the nicotinic cholinergic system. *Psychopharmacology*, *232*(23), 4303-4316. https://doi.org/10.1007/s00213-015-4058-z

Wang, Z., Ding, R., & Wang, J. (2021). The Association between Vitamin D Status and Autism Spectrum Disorder (ASD) : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, *13*(1), 86. https://doi.org/10.3390/nu13010086

Wegiel, J., Flory, M., Kuchna, I., Nowicki, K., Ma, S. Y., Imaki, H., Wegiel, J., Cohen, I. L., London, E., Wisniewski, T., & Brown, W. T. (2014). Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*, 141. https://doi.org/10.1186/s40478-014-0141-7

Werling, D. M., Lowe, J. K., Luo, R., Cantor, R. M., & Geschwind, D. H. (2014). Replication of linkage at chromosome 20p13 and identification of suggestive sex-differential risk loci for autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, *5*(1), 13. https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-13

Whitney, E. R., Kemper, T. L., Bauman, M. L., Rosene, D. L., & Blatt, G. J. (2008). Cerebellar Purkinje cells are reduced in a subpopulation of autistic brains : A stereological experiment using calbindin-D28k. *Cerebellum (London, England)*, *7*(3), 406-416. https://doi.org/10.1007/s12311-008-0043-y

Wiegersma, A. M., Dalman, C., Lee, B. K., Karlsson, H., & Gardner, R. M. (2019). Association of Prenatal Maternal Anemia With Neurodevelopmental Disorders. *JAMA Psychiatry*, *76*(12), 1294-1304. https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.2309

Wing, L. (1981). Asperger's syndrome : A clinical account. *Psychological Medicine*, *11*(1), 115-129. https://doi.org/10.1017/s0033291700053332

Wiśniowiecka-Kowalnik, B., & Nowakowska, B. A. (2019). Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—Current evidence in the field. *Journal of Applied Genetics*, *60*(1), 37-47. https://doi.org/10.1007/s13353-018-00480-w

Wong, C. T., Ussyshkin, N., Ahmad, E., Rai-Bhogal, R., Li, H., & Crawford, D. A. (2016). Prostaglandin E2 promotes neural proliferation and differentiation and regulates Wnt target gene expression. *Journal of Neuroscience Research*, *94*(8), 759-775. https://doi.org/10.1002/jnr.23759

Woodbury-Smith, M., & Scherer, S. W. (2018). Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *60*(5), 445-451. https://doi.org/10.1111/dmcn.13717

Wu, W.-L., Adams, C. E., Stevens, K. E., Chow, K.-H., Freedman, R., & Patterson, P. H. (2015). The interaction between maternal immune activation and alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in regulating behaviors in the offspring. *Brain, behavior, and immunity*, *46*, 192-202. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.005

Wu, Z., Huang, S., Zou, J., Wang, Q., Naveed, M., Bao, H., Wang, W., Fukunaga, K., & Han, F. (2020). Autism spectrum disorder (ASD) : Disturbance of the melatonin system and its implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *130*, 110496. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110496

Xie, S., Karlsson, H., Dalman, C., Widman, L., Rai, D., Gardner, R. M., Magnusson, C., Schendel, D. E., Newschaffer, C. J., & Lee, B. K. (2019). Family History of Mental and Neurological Disorders and Risk of Autism. *JAMA Network Open*, *2*(3), e190154. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.0154

Xu, G., Snetselaar, L. G., Jing, J., Liu, B., Strathearn, L., & Bao, W. (2018). Association of Food Allergy and Other Allergic Conditions With Autism Spectrum Disorder in Children. *JAMA Network Open*, *1*(2), e180279. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.0279

Xu, M., Xu, X., Li, J., & Li, F. (2019). Association Between Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorder : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry*, *10*, 473. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00473

Yao, P. J., Petralia, R. S., Ott, C., Wang, Y.-X., Lippincott-Schwartz, J., & Mattson, M. P. (2015). Dendrosomatic Sonic Hedgehog Signaling in Hippocampal Neurons Regulates Axon Elongation. *Journal of Neuroscience*, *35*(49), 16126-16141. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1360-15.2015

Yasui, D. H., Scoles, H. A., Horike, S., Meguro-Horike, M., Dunaway, K. W., Schroeder, D. I., & LaSalle, J. M. (2011). 15q11.2–13.3 chromatin analysis reveals epigenetic regulation of CHRNA7 with deficiencies in Rett and autism brain. *Human Molecular Genetics*, *20*(22), 4311-4323. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr357

Yennawar, M., White, R. S., & Jensen, F. E. (2019). AMPA Receptor Dysregulation and Therapeutic Interventions in a Mouse Model of CDKL5 Deficiency Disorder. *The Journal of*

*Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *39*(24), 4814-4828. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2041-18.2019

Yi, J. J., Paranjape, S. R., Walker, M. P., Choudhury, R., Wolter, J. M., Fragola, G., Emanuele, M. J., Major, M. B., & Zylka, M. J. (2017). The autism-linked UBE3A T485A mutant E3 ubiquitin ligase activates the Wnt/β-catenin pathway by inhibiting the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(30), 12503-12515. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788448

Yong, Z., Dou, Y., Gao, Y., Xu, X., Xiao, Y., Zhu, H., Li, S., & Yuan, B. (2021). Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism spectrum disorder cases in Xuzhou, China. *Translational Pediatrics*, *10*(3), 63546-63646. https://doi.org/10.21037/tp-21-54

Yoo, H. (2015). Genetics of Autism Spectrum Disorder : Current Status and Possible Clinical Applications. *Experimental Neurobiology*, *24*(4), 257-272. https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.257

Yoo, H. J., Cho, I. H., Park, M., Yang, S. Y., & Kim, S. A. (2012). Family based association of GRIN2A and GRIN2B with Korean autism spectrum disorders. *Neuroscience Letters*, *512*(2), 89-93. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.01.061

Yuan, H., Wang, Q., Liu, Y., Yang, W., He, Y., Gusella, J. F., Song, J., & Shen, Y. (2018). A rare exonic NRXN3 deletion segregating with neurodevelopmental and neuropsychiatric conditions in a three-generation Chinese family. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, *177*(6), 589-595. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32673

Zerbo, O., Qian, Y., Yoshida, C., Grether, J. K., Van de Water, J., & Croen, L. A. (2015). Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *45*(12), 4015-4025. https://doi.org/10.1007/s10803-013-2016-3

Zhang, X., Rui, M., Gan, G., Huang, C., Yi, J., Lv, H., & Xie, W. (2017). Neuroligin 4 regulates synaptic growth via the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway at the Drosophila neuromuscular junction. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(44), 17991-18005. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810242

Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2016). The Evolving Diagnostic and Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Genetics*, *7*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2016.00065

Žigman, T., Petković Ramadža, D., Šimić, G., & Barić, I. (2021). Inborn Errors of Metabolism Associated With Autism Spectrum Disorders : Approaches to Intervention. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2021.673600

Zou, T., Liu, J., Zhang, X., Tang, H., Song, Y., & Kong, X. (2020). Autoantibody and autism spectrum disorder : A systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, *75*, 101568. https://doi.org/10.1016/j.rasd.2020.101568

Zwaigenbaum, L., Young, G. S., Stone, W. L., Dobkins, K., Ozonoff, S., Brian, J., Bryson, S. E., Carver, L. J., Hutman, T., Iverson, J. M., Landa, R. J., & Messinger, D. (2014). Early head growth in infants at risk of autism : A baby siblings research consortium study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *53*(10), 1053-1062. https://doi.org/10.1016/j.jaac.2014.07.007

# ANNEXES

## Article 1: Risk and protective factors in Autism Spectrum Disorders: a case control study in the Lebanese population.

**Annexe 1 :** Informations supplémentaires de l'article 1

Supplementary File S1: Questionnaire du groupe TSA.

## Informed Consent

Holy Spirit University of Kaslik
Faculty of Arts and Sciences

I, the undersigned ....., parent guardian of ....., acknowledge that I am aware and certain that my son/daughter will participate in the Autism Spectrum Disorders (ASD) study carried out by the Holy Spirit University of Kaslik in Lebanon, and divided into three stages.

In the first stage, a detailed survey should be filled out about the participant medical condition and lifestyle. The information provided will remain confidential with the right to agreeing or refusing to answer questions.

In the second stage, which can be done in conjunction with the first stage, urine and fecal samples will be taken to perform the metabolic and microbiological studies.

As for the third and last stage, which can be done in conjunction with the first and second stage, blood samples will be taken from the person with ASD and his parents to conduct a detailed genetic study.

I agree for the participation of my son/daughter in the following stages:

- ☐ Fill in the form
- ☐ Providing urine samples
- ☐ Providing fecal samples
- ☐ Providing blood samples

I have the right to withdraw from the study whenever I want without giving an explanation and without any change in my relationship with the doctor, knowing that the samples, especially the genetic ones, will only be used for this purpose and I reserve the right to request their destruction after use.

Signature:

Signature of principal investigator of the study:

Date:

# Autism in Lebanon

| | |
|---|---|
| Family name<br>---------- | Name of the center/school/NGO<br>---------- |
| Phone number<br>---------- | Date<br>---------- |

## Survey

1- **Mother's age at conception :** _____

2- **Father's age :** _____

3- **Patient's age :** _____

4- **Patient's gender :**

Male _____ female _____

5- **Patient's age at diagnosis:** _____

6- **Diagnostic tool:** _____

**Questions related to the parents:**

7- **Is there any ASD case in the family?**

Yes :_____ No: ____

*If yes, specify the degree of consanguinity:* _____

8- **Is there any immunodeficiency disease case in the family?**

Yes: _____ No: ____

**Questions related to the mother during pregnancy:**

9- **Was the mother subjected to stress during pregnancy (death of a relative, war, family or marital problems, partner's death, loss of work ....)**

Yes :_____ No: ____

*If yes, specify* _____

**10- Was the mother consuming caffeine during pregnancy?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, determine the quantity by day/week/month:* _____

**11- Was the mother consuming tea during pregnancy?**

Yes :_____ No: ____

*If yes, determine the quantity by day/week/month:* _____

**12- Was the mother drinking alcohol during pregnancy?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, determine the quantity by day/week/month:* _____

**13- Did the mother take multivitamins during pregnancy?**

Yes :_____ No: ____

*If yes, specify:* _____

**14- Was the mother supplemented with iron during pregnancy?**

Yes: _____ No: ____

**15- Was the maternal diet during pregnancy rich in cereals?**

Yes: _____ No: ____

**16- Was the mother exposed indirectly to tobacco at home?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify the duration of the exposure:*

*- between 1 and 2 hours*_____

*- between 2 and 4 hours*_____

*- more than 4 hours*_____

## Questions related to the patient:

**17- Does any of the patient's sister/brother suffer from ASD?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify:* _____

**18- Do any of the children in the family suffer from:**

- Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD):

Yes: _____ No: ____

- Dyspraxia:

Yes: _____ No: ____

**19- Does the patient suffer from digestive disorders such as constipation, diarrhea, stomach ache, nausea and gastric reflux?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify:* _____

**20- Does the patient have allergic reaction on food?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify:* _____

**21- Does the patient have any of the symptoms associated with ASD?**

Intellectual disability:

Yes: _____ No: ____

Epilepsy:

Yes: _____ No: ____

Supplementary File S2: Questionnaire du groupe témoin.

## Informed consent

Holy Spirit University of Kaslik
Faculty of Arts and Sciences

I, the undersigned ....., parent guardian of ....., acknowledge that I am aware and certain that my son/daughter will participate in the Autism Spectrum Disorders (ASD) study carried out by the Holy Spirit University of Kaslik in Lebanon, and divided into three stages.

In the first stage, a detailed survey should be filled out about the participant medical condition and lifestyle. The information provided will remain confidential with the right to agreeing or refusing to answer questions.

In the second stage, which can be done in conjunction with the first stage, urine and fecal samples will be taken to perform the metabolic and microbiological studies.

As for the third and last stage, which can be done in conjunction with the first and second stage, blood samples will be taken from the person with ASD and his parents to conduct a detailed genetic study.

I agree for the participation of my son/daughter in the following stages:

- ☐ Fill in the form
- ☐ Providing urine samples
- ☐ Providing fecal samples
- ☐ Providing blood samples

I have the right to withdraw from the study whenever I want without giving an explanation and without any change in my relationship with the doctor, knowing that the samples, especially the genetic ones, will only be used for this purpose and I reserve the right to request their destruction after use.

Signature:

Signature of principal investigator of the study:

Date:

# Autism in Lebanon

| | |
|---|---|
| Family name<br>---------- | Name of the center/school/NGO<br>---------- |
| Phone number<br>---------- | Date<br>---------- |

## Survey

1- **Mother's age at conception :** _____

2- **Father's age :** _____

3- **Participant's age :** _____

4- **Participant's gender :**

Male _____ female _____

**Questions related to the parents:**

5- **Is there any ASD case in the family?**

Yes :_____ No: ____

*If yes, specify the degree of consanguinity:* _____

6- **Is there any immunodeficiency disease case in the family?**

Yes: _____ No: ____

**Questions related to the mother during pregnancy:**

7- **Was the mother subjected to stress during pregnancy (death of a relative, war, family or marital problems, partner's death, loss of work ....)**

Yes :_____ No: ____

*If yes, specify* _____

8- **Was the mother consuming caffeine during pregnancy?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, determine the quantity by day/week/month:* _____

**9- Was the mother consuming tea during pregnancy?**

Yes :_____ No: ____

*If yes, determine the quantity by day/week/month:* _____

**10- Was the mother drinking alcohol during pregnancy?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, determine the quantity by day/week/month:* _____

**11- Did the mother take multivitamins during pregnancy?**

Yes :_____ No: ____

*If yes, specify:* _____

**12- Was the mother supplemented with iron during pregnancy?**

Yes: _____ No: ____

**13- Was the maternal diet during pregnancy rich in cereals?**

Yes: _____ No: ____

**14- Was the mother exposed indirectly to tobacco at home?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify the duration of the exposure:*

*- between 1 and 2 hours*_____

*- between 2 and 4 hours*_____

*- more than 4 hours*_____

## Questions related to the participant:

**15- Does any of the participant's sister/brother suffer from ASD?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify:* _____

**16- Do any of the children in the family suffer from:**

- Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD):

Yes: _____ No: ____

- Dyspraxia:

Yes: _____ No: ____

**17- Does the participant suffer from digestive disorders such as constipation, diarrhea, stomach ache, nausea and gastric reflux?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify:* _____

**18- Does the participant have allergic reaction on food?**

Yes: _____ No: ____

*If yes, specify:* _____

# Article 2: Identification of novel gene variants for Autism Spectrum Disorders in the Lebanese population using whole-exome sequencing.

**Annexe 2 :** Informations supplémentaires de l'article 2

Supplementary Figure S1: Visualisation des variants par Integrated Genome Browser (IGV).

A- G > T variant change in SLITRK4 gene in the heterozygous form for the parents (lower panel) and the hemizygous form for subject number 23 (upper panel).

B- T >AT variant change in *MIS18BP1* gene in the heterozygous form for the subject number 45 (upper panels) as compared to other samples included in the study.

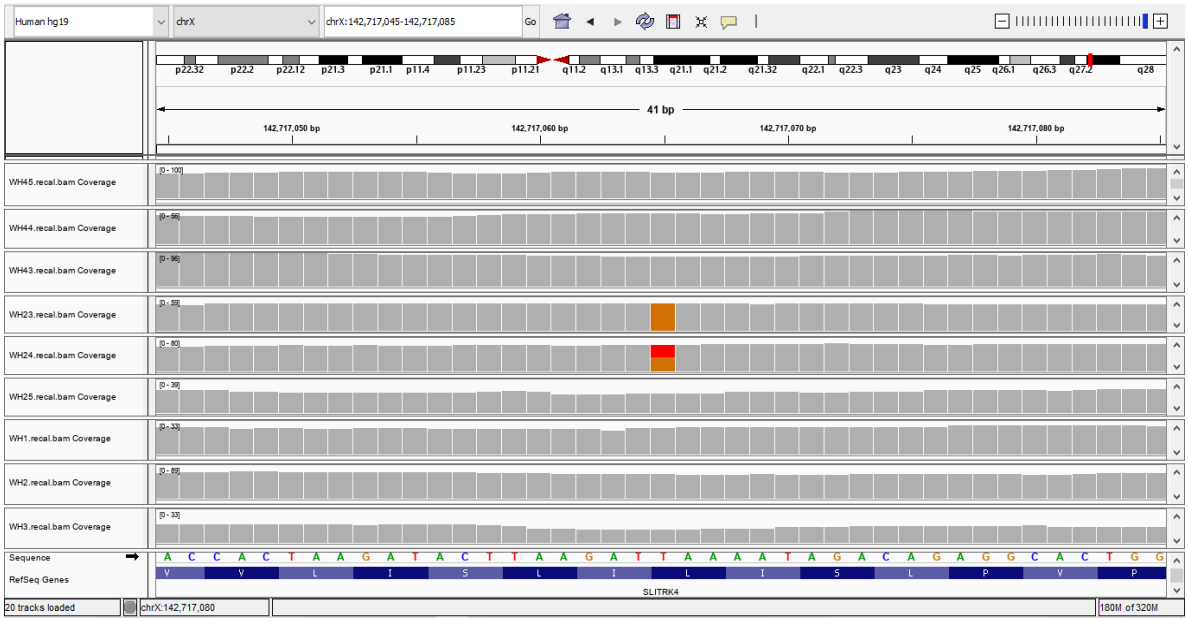
C- G > A variant change in *HAAO* gene in the heterozygous form for the parents (lower panels) and the homozygous form for subject number 45 (upper panel).

D- A>G variant change in *PTCHD1* gene in the hemizygous form for subject number 64 (lower panel) as compared to other samples included in the study.

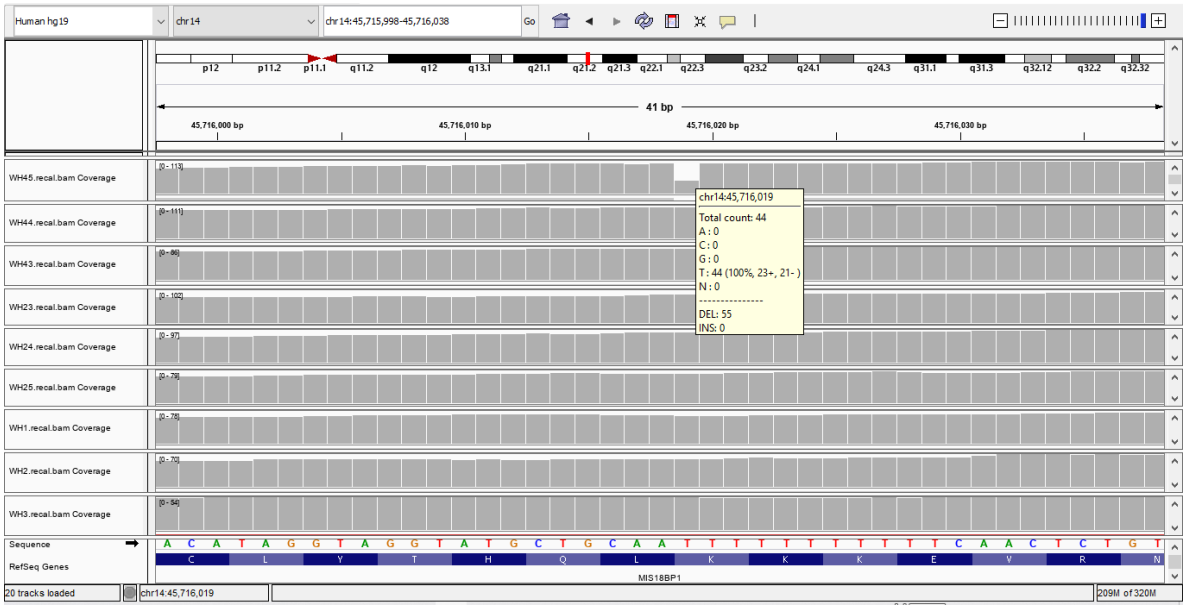
E- G>A variant change in *ASXL3* gene in the homozygous form for subject number 70 (lower panel) as compared to other samples included in the study.

F- T>TGGAG variant change in *KRTAP5-5* gene in the homozygous form for subject number 73 (upper panel), in the homozygous form for the father and in the heterozygous form for the mother (lower panels).

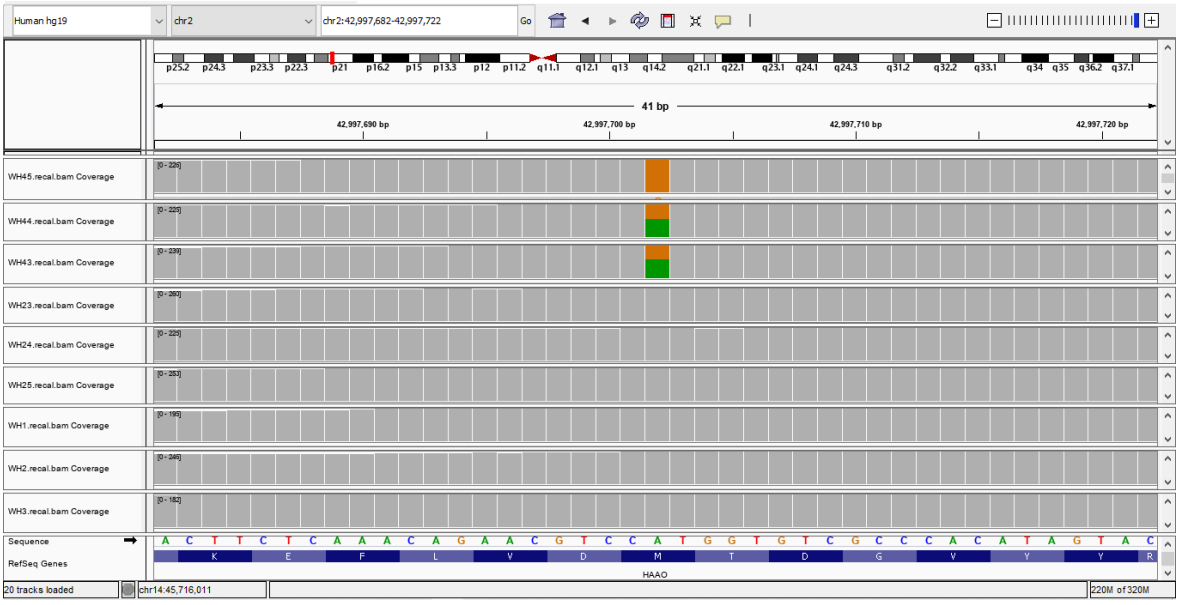
A-



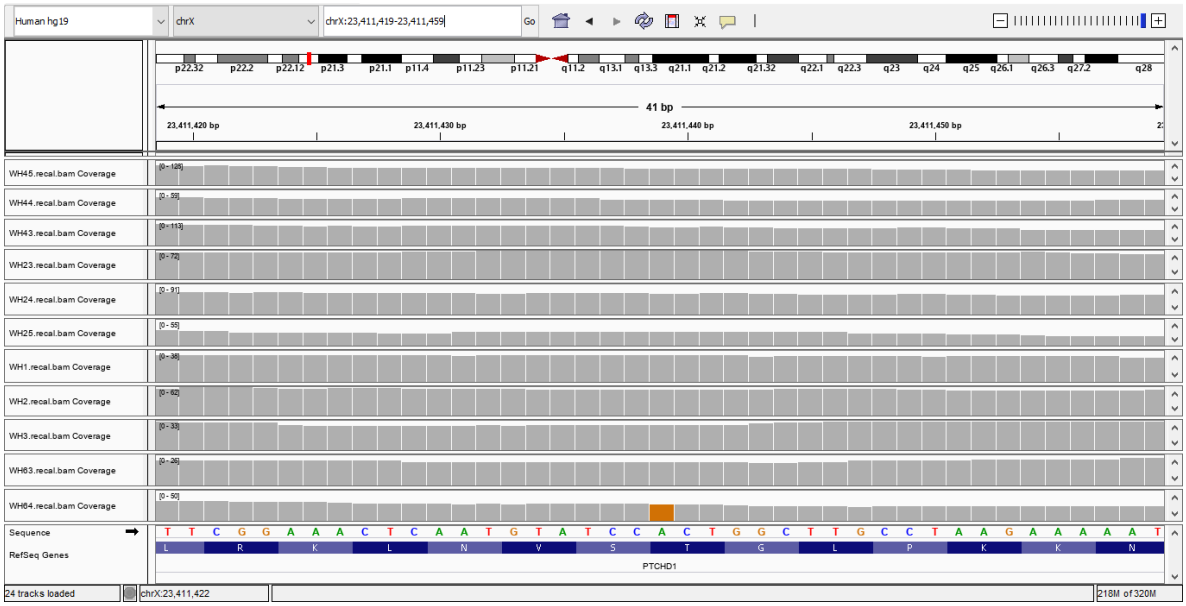
B-


Human hg19
chr14
chr14:45,715,998-45,716,038
Go
41 bp
45,716,000 bp
45,716,010 bp
45,716,020 bp
45,716,030 bp
WH45.recal.bam Coverage
WH44.recal.bam Coverage
WH43.recal.bam Coverage
WH23.recal.bam Coverage
WH24.recal.bam Coverage
WH25.recal.bam Coverage
WH1.recal.bam Coverage
WH2.recal.bam Coverage
WH3.recal.bam Coverage
chr14:45,716,019
Total count: 44
A : 0
C : 0
G : 0
T : 44 (100%, 23+, 21- )
N : 0
DEL: 55
INS: 0
Sequence
RefSeq Genes
MIS18BP1
20 tracks loaded
chr14:45,716,019
209M of 320M

C-


Human hg19
chr2
chr2:42,997,682-42,997,722
Go
41 bp
42,997,690 bp
42,997,700 bp
42,997,710 bp
42,997,720 bp
WH45.recal.bam Coverage
WH44.recal.bam Coverage
WH43.recal.bam Coverage
WH23.recal.bam Coverage
WH24.recal.bam Coverage
WH25.recal.bam Coverage
WH1.recal.bam Coverage
WH2.recal.bam Coverage
WH3.recal.bam Coverage
Sequence
RefSeq Genes
HAAO
20 tracks loaded
chr14:45,716,011
220M of 320M

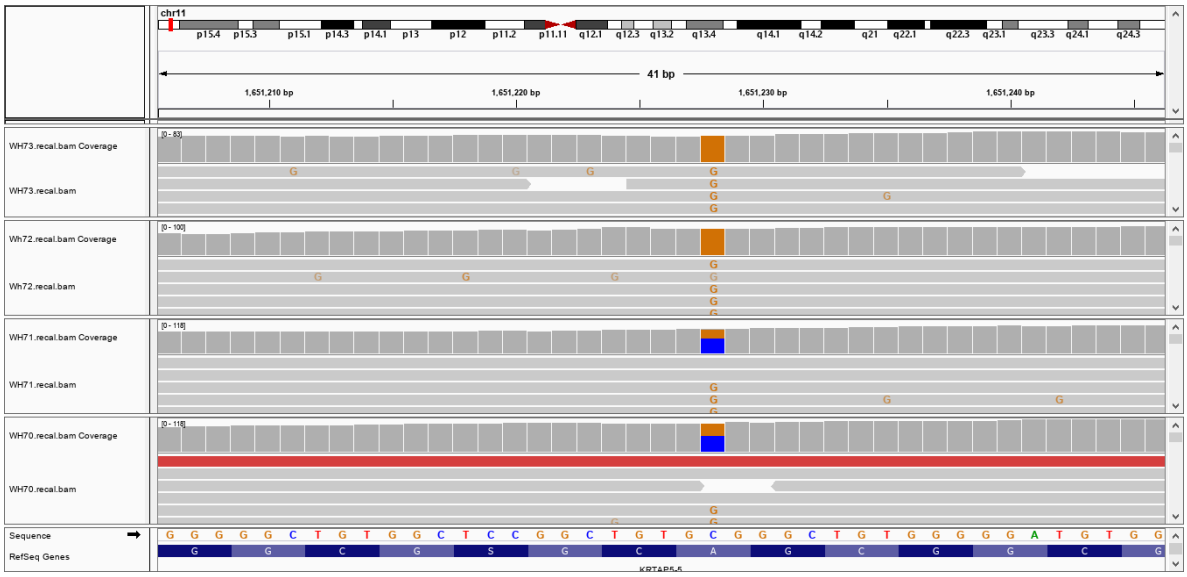
D-


Human hg19
chrX
chrX:23,411,419-23,411,459
Go
41 bp
23,411,420 bp
23,411,430 bp
23,411,440 bp
23,411,450 bp
WH45.recal.bam Coverage
WH44.recal.bam Coverage
WH43.recal.bam Coverage
WH23.recal.bam Coverage
WH24.recal.bam Coverage
WH25.recal.bam Coverage
WH1.recal.bam Coverage
WH2.recal.bam Coverage
WH3.recal.bam Coverage
WH63.recal.bam Coverage
WH64.recal.bam Coverage
Sequence
RefSeq Genes
PTCHD1
24 tracks loaded
chrX:23,411,422
218M of 320M

E-


Human hg19
chr18
chr18:31,325,352-31,325,392
Go
41 bp
31,325,360 bp
31,325,370 bp
31,325,380 bp
31,325,390 bp
WH45.recal.bam Coverage
WH45.recal.bam
WH3.recal.bam Coverage
WH3.recal.bam
WH23.recal.bam Coverage
WH23.recal.bam
WH64.recal.bam Coverage
WH64.recal.bam
WH70.recal.bam Coverage
WH70.recal.bam
WH73.recal.bam Coverage
WH73.recal.bam
Sequence
RefSeq Genes
ASXL3

F-


chr11
41 bp
1,651,210 bp
1,651,220 bp
1,651,230 bp
1,651,240 bp
WH73.recal.bam Coverage
WH73.recal.bam
Wh72.recal.bam Coverage
Wh72.recal.bam
WH71.recal.bam Coverage
WH71.recal.bam
WH70.recal.bam Coverage
WH70.recal.bam
Sequence
RefSeq Genes

Supplementary Figure S2 : Validation des variants candidats par séquençage Sanger.

(A) Sanger sequencing confirmed a *de novo* heterozygous missense c.293C>T SNV in the *USP46* gene in subject 23, resulting in p.Pro98Leu.

(B) Sanger sequencing confirmed a hemizygous missense c.1860A>C SNV in the *SLITRK4* gene in subject 23 inherited from the mother, resulting in p.Leu620Phe.

(C) Sanger sequencing confirmed a hemizygous missense c.1954G>A SNV in the *FLNA* gene in subject 23 inherited from the mother, resulting in p.Glu652Lys.

(D) Sanger sequencing confirmed a *de novo* heterozygous missense c.1022G>A SNV in the *KRT2* gene in subject 45, resulting in p.Arg341His.

(E) Sanger sequencing confirmed a *de novo* heterozygous frameshift c.471delA deletion in the *MIS18BP1* gene in subject 45, resulting in p.Lys157AsnfsTer24.

(F) Sanger sequencing confirmed a homozygous missense c.371T>C SNV in the *HAAO* gene in subject 45 inherited from both parents, resulting in p.Met124Thr.

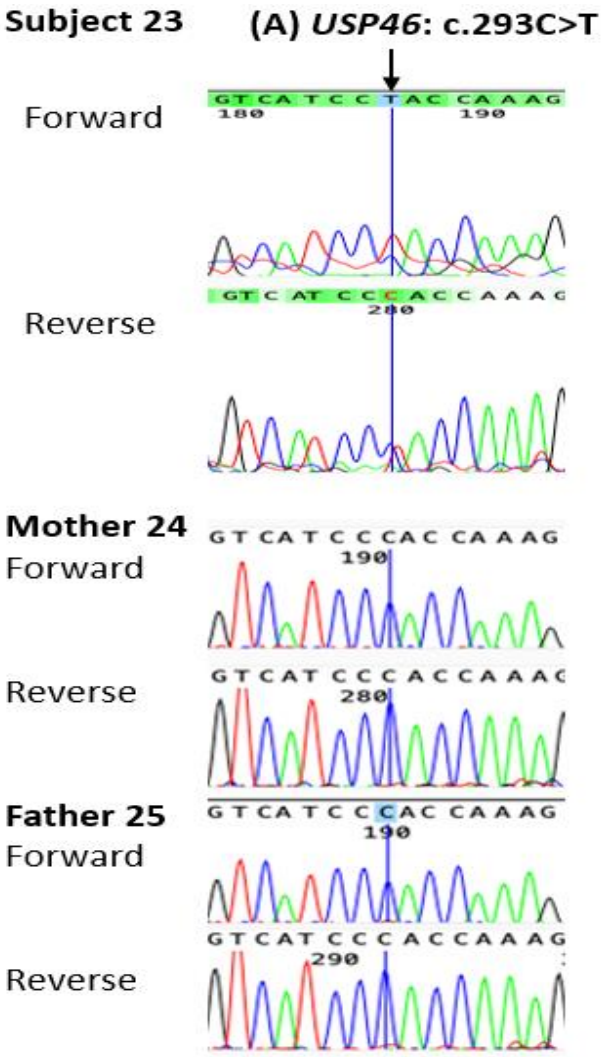
(G) Sanger sequencing confirmed a hemizygous missense c.1804A>G SNV in the *PTCHD1* gene in subject 64, resulting in p.Thr602Ala.

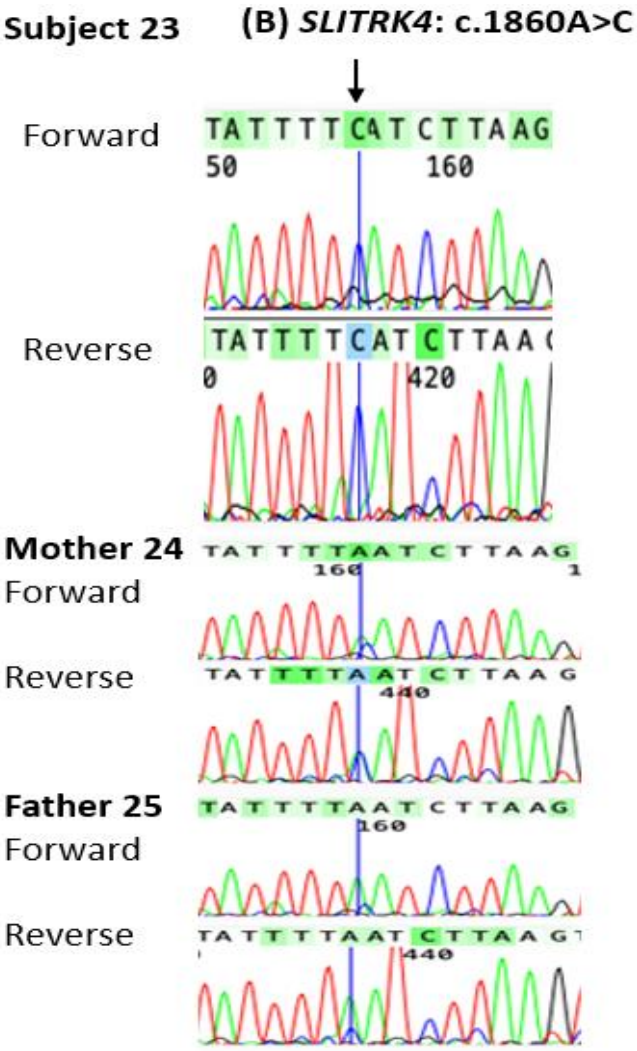
(H) Sanger sequencing confirmed a hemizygous missense c.2590G>T SNV in the *FLNA* gene in subject 64, resulting in p.Val864Phe.

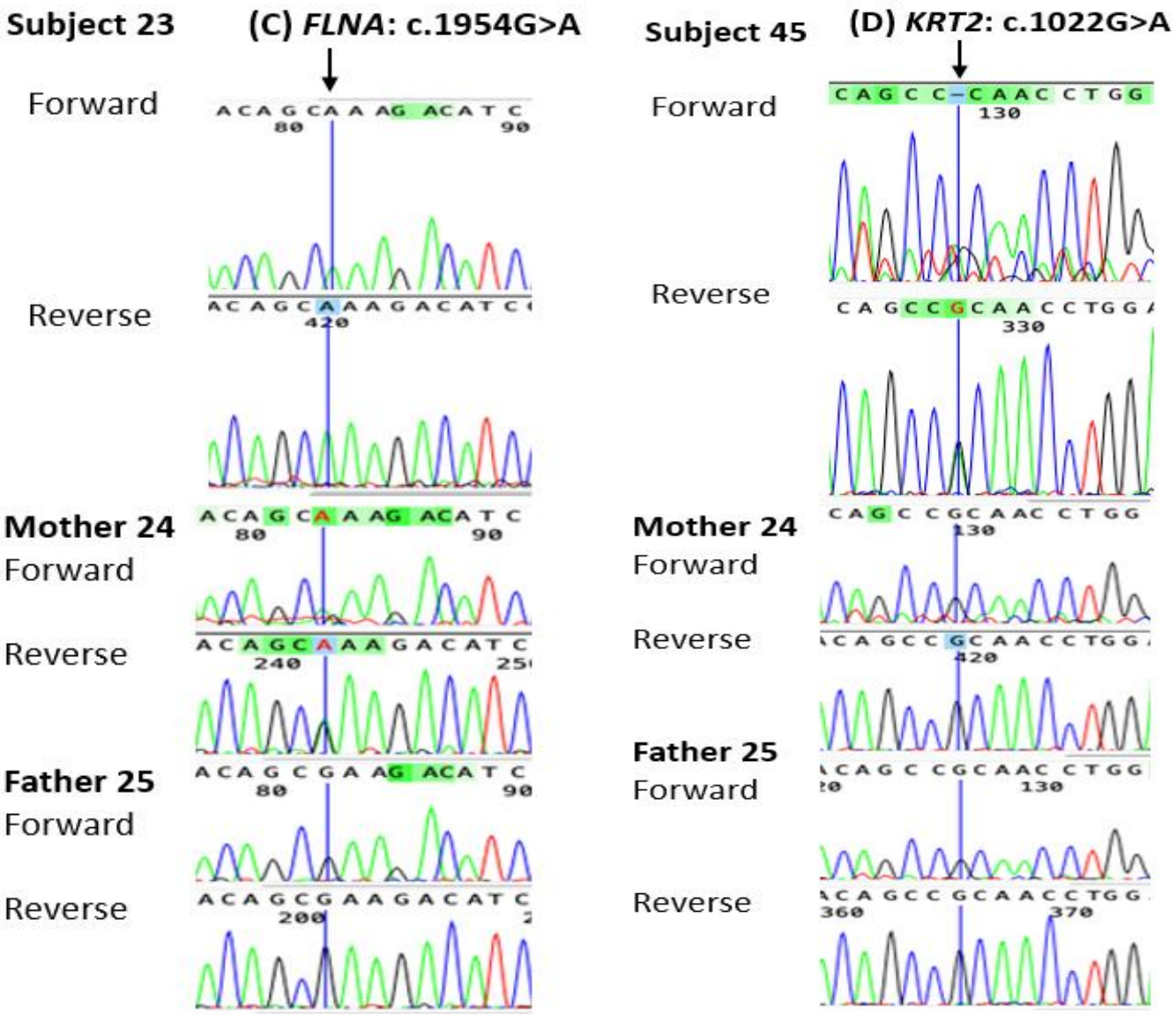
(I) Sanger sequencing confirmed a homozygous missense c.5560G>A SNV in the *ASXL3* gene in subject 70 inherited from both parents, resulting in p.Val1854Ile.

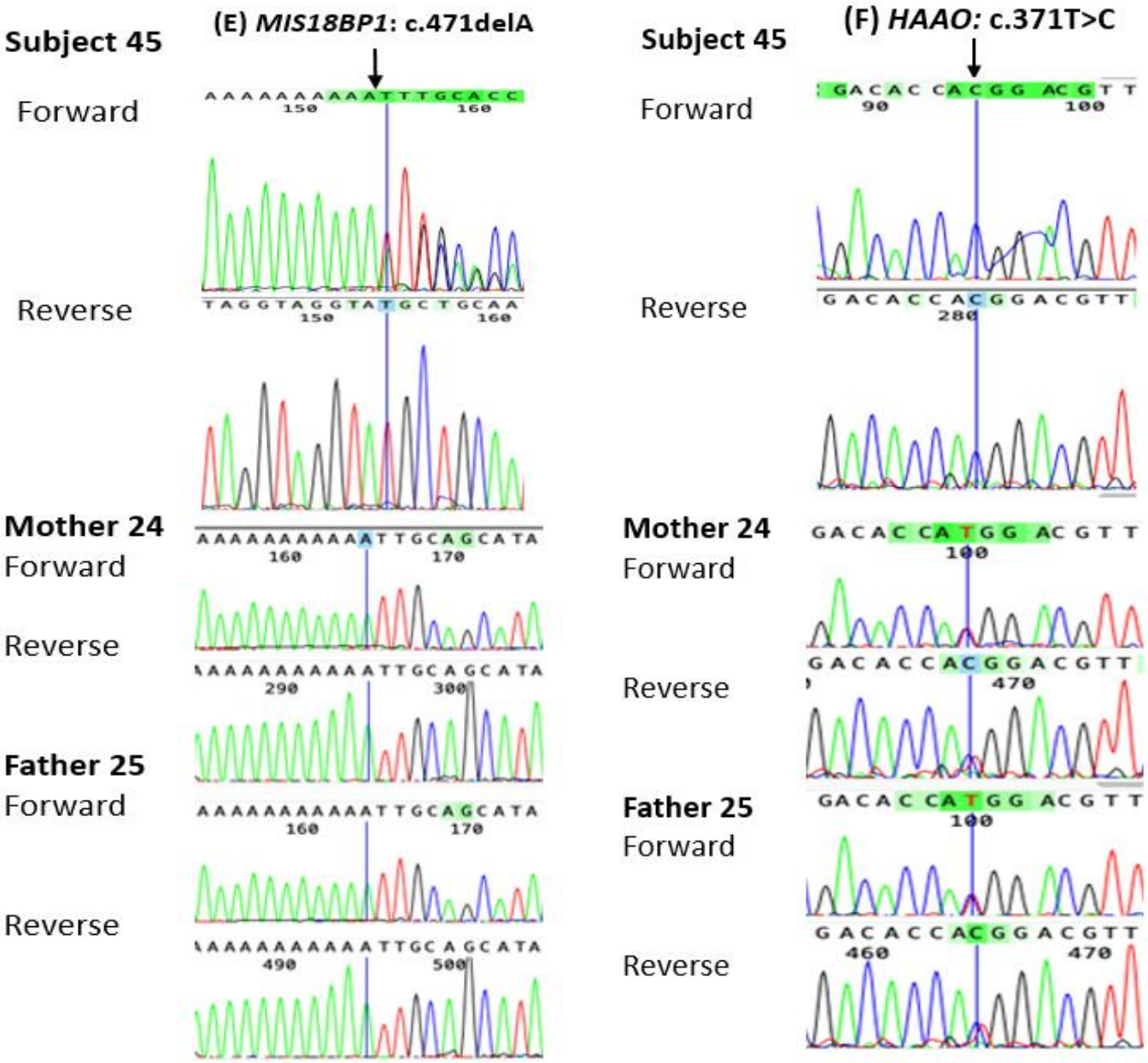
(J) Sanger sequencing confirmed a *de novo* heterozygous missense c.97G>T SNV in the *LSMEM2* gene in subject 73, resulting in p.Gly33Trp.

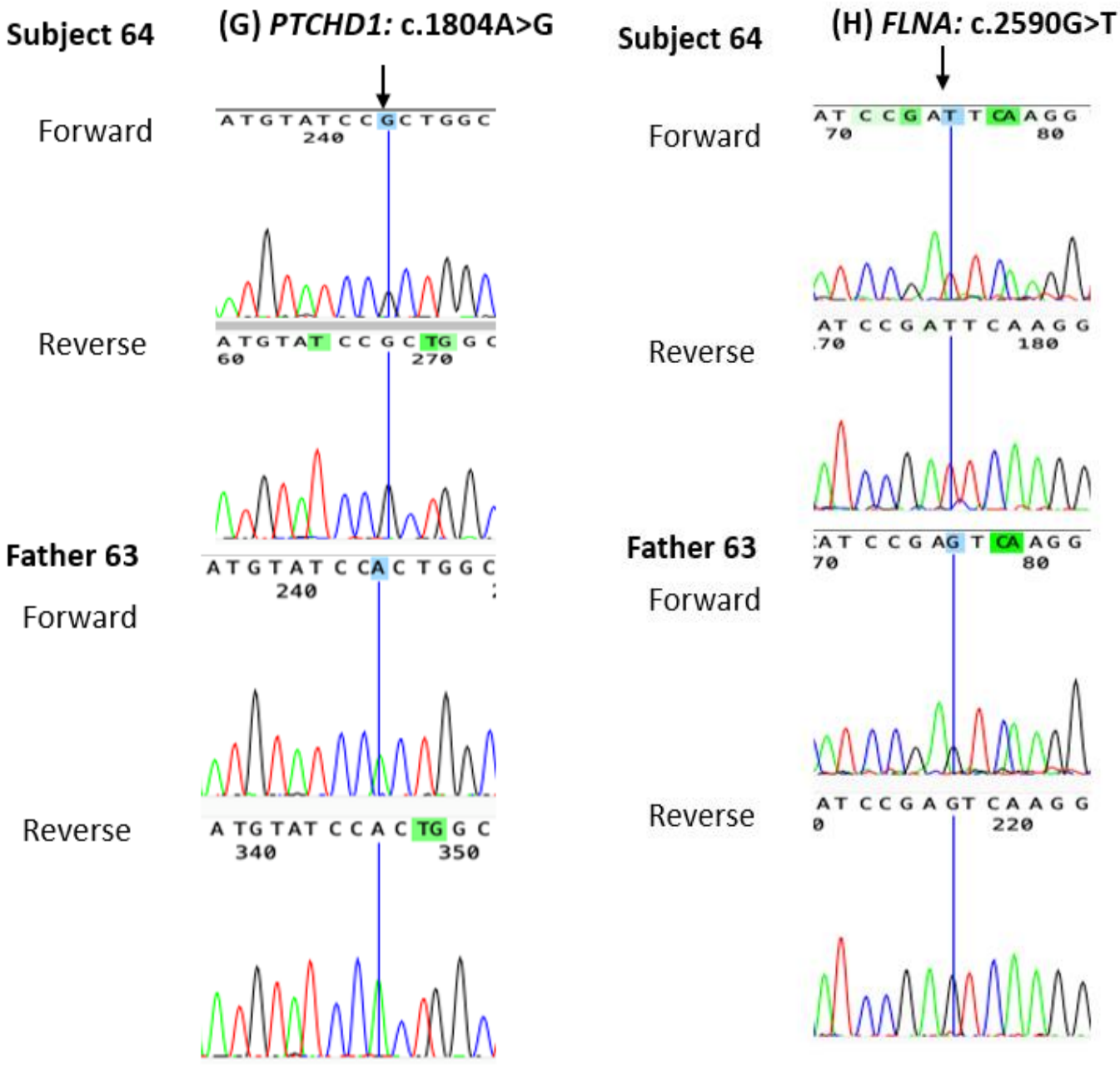
(K) Sanger sequencing confirmed a hemizygous missense c.2773C>T SNV in the *NHSL2* gene in subject 73, resulting in p.Arg925Trp.


Subject 23
(A) USP46: c.293C>T
Forward
Reverse
Mother 24
Forward
Reverse
Father 25
Forward
Reverse


Subject 23
(B) SLITRK4: c.1860A>C
Forward
Reverse
Mother 24
Forward
Reverse
Father 25
Forward
Reverse

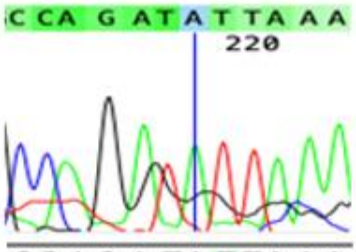

Subject 23
(C) FLNA: c.1954G>A
Forward
Reverse
Mother 24
Forward
Reverse
Father 25
Forward
Reverse
Subject 45
(D) KRT2: c.1022G>A
Forward
Reverse
Mother 24
Forward
Reverse
Father 25
Forward
Reverse


(E) MIS18BP1: c.471delA
Subject 45
Forward
Reverse
Mother 24
Forward
Reverse
Father 25
Forward
Reverse
(F) HAAO: c.371T>C
Subject 45
Forward
Reverse
Mother 24
Forward
Reverse
Father 25
Forward
Reverse

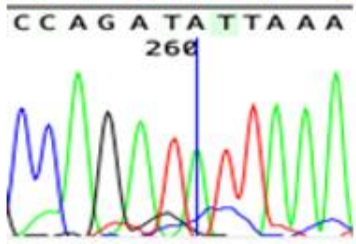

Subject 64
(G) PTCHD1: c.1804A>G
Forward
Reverse
Father 63
Forward
Reverse
Subject 64
(H) FLNA: c.2590G>T
Forward
Reverse
Father 63
Forward
Reverse

**Subject 70** **(I) *ASXL3:* c.5560G>A**

Forward



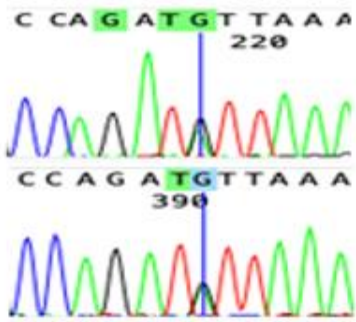

Reverse




**Mother 69**

Forward

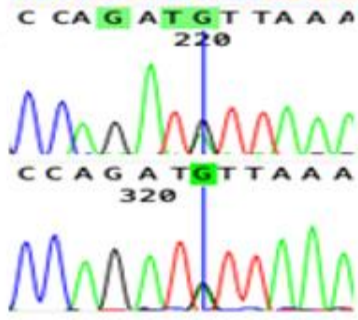
Reverse




**Father 68**

Forward

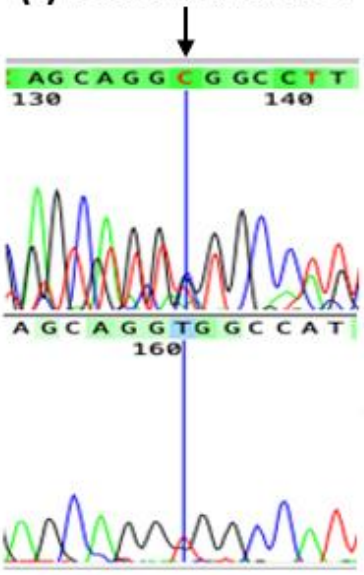
Reverse




**Subject 73** **(J) *LSMEM2:* c.97G>T**

Forward

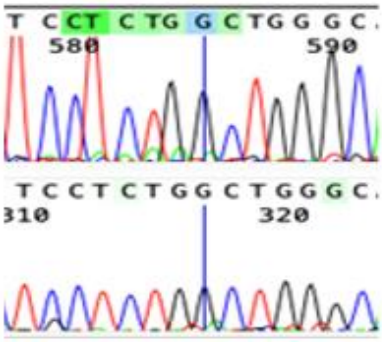
Reverse




**Mother 71**

Forward

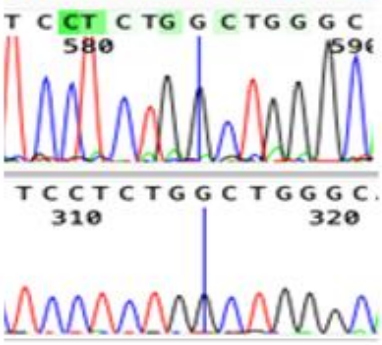
Reverse

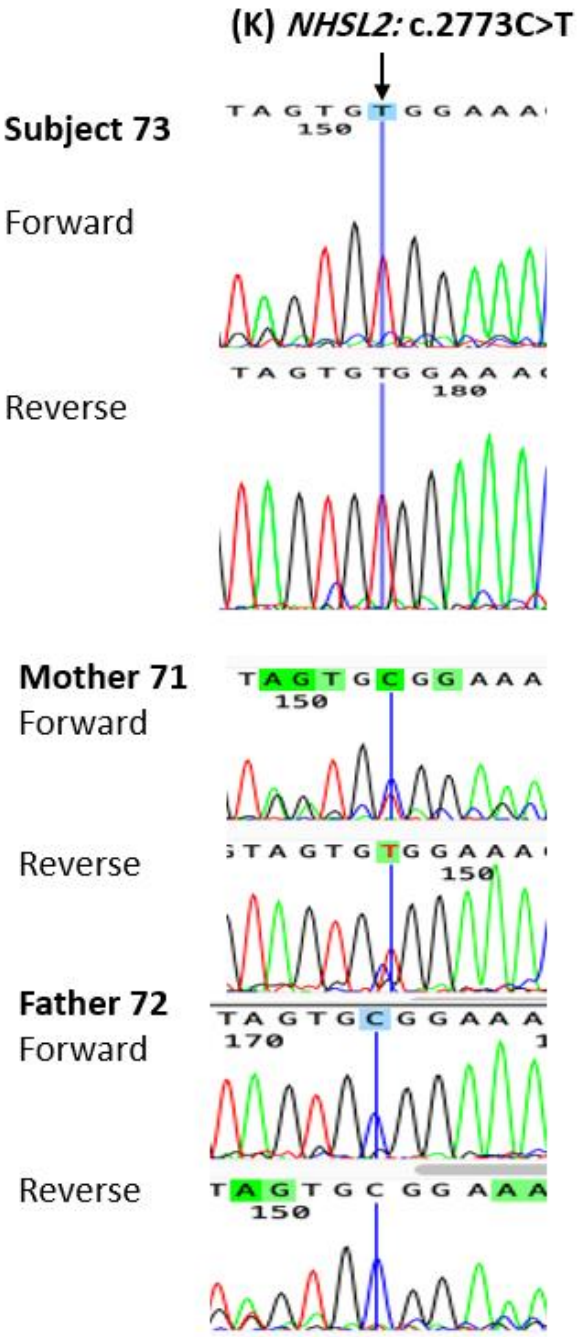



**Father 72**

Forward

Reverse




(K) NHSL2: c.2773C>T
Subject 73
Forward
Reverse
Mother 71
Forward
Reverse
Father 72
Forward
Reverse

Supplementary Table S1 : Les séquences des amorces pour amplification et séquençage des régions des gènes candidats contenant les variants.

| Subject | Gene | Forward primer (5' → 3') | Reverse primer (5' → 3') | Amplicon size (pb) |
|---|---|---|---|---|
| **23** | USP46 | TGACTTGAGCCATCCCTCTT | ATGCCAGCTCTTCCTTTTGA | 333 |
| | SLITRK4 | TGAGACGCCTGTTCAGTTTG | GGTTTTGTGGTCATGCTTCC | 346 |
| | FLNA | CGCAGGCTAAGATCGAATGT | TGAACTCTGCTGGCTTGTTG | 390 |
| **45** | KRT2 | CCCTTATGCTGGGAGACAGA | GGTGCCATTCTCAACATCCT | 394 |
| | MIS18BP1 | TAAAGCCCAACAAGGATGGA | GAGCTACACAAGGGCAAGGA | 386 |
| | HAAO | TGCAGGGACTTCTACAAGCA | ACAGCTGTGTGTCTGCCATC | 369 |
| **64** | PTCHD1 | TGCCTTAATGGGCTATCTGC | GGCCACTACATCGACCTCAT | 391 |
| | FLNA | CTGGCCGCTAAGATGTCATT | CCCTTGGTGAGTCCTGAGAA | 348 |
| **70** | ASXL3 | AATCAACAGGCTTCCATTGC | CTGTTTGACCTCAGGGCTGT | 367 |
| **73** | LSMEM2 | TTGGAACCAAATGTCCCACT | CACTAGGCAAGTGAGCACCA | 482 |

**PERLA GERGES**

# LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE AU LIBAN : UNE ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE ET GENETIQUE


## Résumé

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux complexes et multifactoriels impliquant des facteurs génétiques ainsi que des facteurs environnementaux. Il a été montré que des événements prénatals, périnatals et postnatals peuvent soit augmenter soit diminuer le risque des TSA. Les facteurs environnementaux sont susceptibles de moduler le risque des TSA lorsqu'ils sont associés avec des facteurs génétiques. En fait, des anomalies chromosomiques, des variations du nombre de copies (CNV) et des variants mononucléotidiques (SNV) ont été associés aux TSA. A ce jour, les facteurs environnementaux et génétiques ne sont pas encore complètement élucidés et la plupart des études sur les TSA sont menées sur les populations Américaines et Ouest-Européennes. Par conséquent, les objectifs de ma thèse s'articulent autour de l'identification des facteurs de risque et de protection qui peuvent aider à la compréhension de la physiopathologie des TSA et en fin à aboutir à l'atténuation des risques, ainsi que sur l'identification des variations mononucléotidiques (SNV) et des petites insertions/délétions (indels) par le séquençage de l'exome entier (WES) chez cinq sujets qui n'avaient pas révélé de CNV liées aux TSA dans notre étude précédente.

Pour le premier objectif, nos résultats ont montré que le stress pendant la grossesse, la présence de patients atteints de TSA et de patients atteints du trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention (TDAH) dans la famille étaient significativement associés aux TSA. D'autre part, un apport en multivitamines en particulier les vitamines B et en oméga 3, un régime riche en céréales et une supplémentation en fer pendant la grossesse ont été identifiés comme des facteurs de protection contre les TSA. Pour le second objectif, notre étude a permis d'identifier un variant de novo dans le gène MIS18BP1 et deux autres variants hérités dans les gènes SLITRK4 et NHSL2. En outre, nos résultats ont confirmé la présence d'autres variations génétiques précédemment décrites et partagées entre les patients Libanais et d'autres populations atteintes de TSA. L'expression du gène MIS18BP1 a été analysée par PCR quantitative en temps réel (RT qPCR) dans le cortex de souris à différents stades de développement et les résultats ont montré qu'il est fortement exprimé au stade embryonnaire.

Ces études ont permis d'établir des nouvelles hypothèses, de confirmer les données précédentes et de contribuer à la compréhension des TSA. Cependant, des investigations supplémentaires doivent encore être réalisées pour aboutir à une validation des facteurs de risque et des gènes candidats, afin de donner une compréhension cohérente de l'interaction entre les différents facteurs associés aux TSA.


**Mots clés :** TSA, facteurs de risque, facteurs de protection, WES, SNV, insertions/délétions.


## Abstract

Autism Spectrum Disorders (ASD) are complex and multifactorial neurodevelopmental disorders involving genetic factors and environmental factors. Investigations have been carried out in order to understand and determine the impact of environmental factors on the onset of ASD. Prenatal, perinatal, and postnatal events have been shown to increase or decrease the risk of ASD. Environmental factors are likely to modulate the risk of ASD when combined with genetic factors. In fact, chromosomal abnormalities, copy number variations (CNVs), and single nucleotide variants (SNVs) have been associated with ASD. To date, the environmental and genetic factors have not yet been fully elucidated and most studies on ASD are carried out on American and Western European populations. Therefore, the objectives of my thesis revolve around the identification of risk and protective factors that can help in understanding the pathophysiology of ASDs and in risk attenuation, as well as the identification of single nucleotide variants (SNV) as well as small insertions/deletions (indels) by whole exome sequencing (WES) in five subjects who did not reveal ASD-related copy number variations (CNV) in our previous study.

For the first objective, the results showed that stress during pregnancy, the presence of patients with ASD and patients with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the family were significantly associated with ASD. On the other hand, a multivitamin intake in particular B vitamins and omega 3, a diet rich in cereals and iron supplementation during pregnancy have been identified as protective factors against ASD. For the second objective, our study allowed the identification of a de novo variant in the MIS18BP1 gene and two other inherited variants in the SLITRK4 and NHSL2 genes. Furthermore, our results confirmed the presence of other genetic variations previously described and shared between Lebanese patients and other populations with ASD. Then, the expression of the MIS18BP1 gene was measured by quantitative real-time PCR (RT qPCR) in the cortex of mice at different stages of development and the results showed that it is more expressed at the embryonic stage.

These studies allowed to establish new hypotheses, to confirm previous data and to contribute to a better understanding of ASD. However, further investigations are needed to achieve validation of risk factors and candidate genes, in order to provide a consistent understanding of the interaction between the various factors associated with ASD.


**Keywords**: ASD, risk factors, protective factors, WES, SNV, insertions/deletions.