

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Identification de mutations dans les gènes de la famille des synapsines chez des
individus avec épilepsie, dyslexie ou autisme

par

Lysanne Patry B.Sc

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention d'une Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Décembre, 2007

© Lysanne Patry, 2007



Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Identification de mutations dans les gènes de la famille des synapsines chez des
individus avec épilepsie, dyslexie ou autisme

présenté par :

Lysanne Patry

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Bernard Brais
président-rapporteur

Patrick Cossette
directeur de recherche

Jacques Michaud
membre du jury

RÉSUMÉ

Jusqu'à présent quelques gènes prédisposant aux épilepsies familiales ont été identifiés, mais ceux-ci n'expliquent qu'une faible proportion des cas d'épilepsies. Même si les épilepsies partielles ont un mode de transmission dit complexe, la découverte des gènes prédisposant aux formes mendéliennes constitue une étape clé dans la recherche des gènes prédisposant à la majorité des épilepsies dites idiopathiques. En étudiant une grande famille canadienne-française avec épilepsie du lobe temporal (ELT), nous avons identifié une mutation non-sens dans le gène codant pour la synapsine I, (*SYN1*), une protéine impliquée dans la relâche des vésicules synaptiques (VS). Une évaluation neuropsychologique a également révélé des troubles spécifiques du langage ainsi que des traits autistiques chez plusieurs membres atteints de cette famille. Le séquençage de ce même gène chez des cas non apparentés d'épilepsie temporale, de dyslexie et d'autisme nous a permis d'identifier trois mutations faux-sens (2 épileptiques, 4 autistes), une mutation synonyme (1 dyslexique) et aussi deux variants dans la région non traduite en 5' de ce gène (2 autistes). Nous avons également séquencés les deux autres gènes codant pour des synapsines (*SYN2* et *SYN3*) pour ces mêmes cohortes de patients et nous avons identifié un total de six mutations faux-sens et une délétion d'une paire de base (pb) chez sept individus autistes et un individu avec ELT. Une perturbation de la transmission synaptique ou du développement du système nerveux central (SNC) causé par des mutations dans les synapsines pourrait constituer un mécanisme moléculaire commun menant à des phénotypes variés tels que l'autisme, l'épilepsie et la dyslexie.

Mots clés

Génétique, épilepsie, dyslexie, autisme, synapse, synapsines

ABSTRACT

Several genes predisposing to epilepsy have been so far identified, although these explain a small proportion of individuals with epilepsy. Even if epilepsies overall exhibit complex inheritance patterns, unravelling the genes predisposing to Mendelian forms of the epilepsies constitute a key step in the search for genes predisposing to the majority of idiopathic epilepsies. By studying a large French-Canadian family with temporal lobe epilepsy (TLE) we have identified a nonsense mutation in a gene encoding synapsin I, (*SYN1*), a presynaptic protein implicated in the release of synaptic vesicles. Details neurological examinations revealed language disorder and autistic features in many members of this family. Screening of additional cases of TLE, ASD and dyslexia allow the identification of three missense mutations (2 epileptic, 4 autistic), one synonymous mutation (1 dyslexic) and two variants in the 5' untranslated region of *SYN1* (2 autistic). We also screened the two other genes encoding for synapsins (*SYN2*, *SYN3*), in the same cohorts of patients and we found six additional missense mutations and one base pair deletion in seven individuals with autism and one individual with TLE . A defect in synaptic transmission or in the central nervous system development caused by mutations in synapsins may be a common molecular mechanism leading to various phenotypes such as autism, epilepsy and dyslexia.

Key words

Genetic, epilepsy, autism, dyslexia, synapse, synapsins

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des figures.....	X
Liste des sigles et abréviations.....	XII
Dédicace.....	XIV
Remerciements.....	XV

CHAPITRE 1 : Identification d'une mutation dans la synapsine I chez une famille avec épilepsie réflexe du lobe temporal

1. Introduction.....	1
1.1 Historique de l'épilepsie.....	1
1.2 Phénotype épileptique.....	2
1.2.1 Épilepsie du lobe temporal.....	4
1.2.2 Épilepsie réflexe à l'eau.....	4
1.2.3 Épilepsie temporale et co-morbidités.....	5
1.3 Génétique des épilepsies.....	6
1.4 Mutation dans <i>SYNI</i> chez une famille avec épilepsie et troubles d'apprentissage.....	10
2. Projet de recherche.....	11
2.1 Problématique.....	11
2.2 Hypothèse et objectifs.....	11
2.3 Pertinence et retombées.....	12
3. Matériel et méthodes.....	13
3.1 Localisation du gène causant l'épilepsie temporale réflexe.....	13
3.1.1 Criblage du chromosome X.....	13
3.1.2 Analyse de liaison.....	15
3.2 Criblage des gènes candidats.....	16
4. Synapsin I truncation is associated with developmental dyslexia, language impairment and epilepsy.....	18
4.1 Apport des coauteurs.....	19

4.2 Acknowledgments.....	20
4.3 Abstract.....	20
4.4 Introduction.....	21
4.5 Methods.....	22
4.6 Results.....	26
4.7 Discussion.....	29
4.8 Conclusion.....	30
4.9 Figures and tables.....	31

CHAPITRE 2 : Identification de mutations dans les gènes de la famille des synapsines chez des individus avec autisme ou épilepsie

PRÉFACE.....	42
1. Introduction.....	43
1.1 L'autisme.....	43
1.1.1 Historique.....	43
1.1.2 Phénotype et épidémiologie.....	43
1.1.3 Étiologie.....	45
1.2 La dyslexie.....	50
1.2.1 Historique.....	50
1.2.2 Phénotype.....	50
1.2.3 Étiologie.....	51
1.3 Structure et fonctions des synapsines.....	53
1.3.1 La synapsine I et la régulation de la fonction synaptique.....	53
1.3.2 Les synapsines II et III.....	57
2. Projet de recherche.....	58
2.1 Problématique.....	59
2.2 Hypothèse.....	59
2.3 Objectifs.....	59
2.4 Pertinence et retombées.....	59
3. Matériel et méthodes.....	60
3.1 Recrutement des patients.....	60
3.2 Amplification par PCR.....	61
3.3 Interprétation des résultats.....	62
4. Résultats.....	64
4.1 Recherche de mutations dans <i>SYNI</i>	64
4.2 Analyse <i>in silico</i> des mutations identifiées dans <i>SYNI</i>	69

4.3 Recherche de mutations dans <i>SYN2</i>	72
4.4 Analyse <i>in silico</i> des mutations identifiées dans <i>SYN2</i>	75
4.5 Recherche de mutations dans <i>SYN3</i>	78
4.6 Analyse <i>in silico</i> des mutations identifiées dans <i>SYN3</i>	81
5. Annexe	83
5.1 Séquences des amorces.....	83
5.2 Conditions d'amplification.....	84

CHAPITRE 3 : Discussion et conclusion

1. Discussion	86
1.1 L'hétérogénéité du phénotype.....	86
1.2 Rôle potentiel d'un dysfonctionnement synaptique dans les maladies neurodéveloppementales.....	89
1.2.1 Le développement cérébral.....	89
1.2.2 Le dysfonctionnement synaptique et ses conséquences.....	91
1.2.3 Rôle potentiel de la mutation Q555X.....	92
1.2.4 Rôles potentiels des mutations faux-sens dans les synapsines dans l'épilepsie et l'autisme.....	94
2. Conclusion	99
BIBLIOGRAPHIE	100

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I : Classification des épilepsies et des syndromes épileptiques.....	3
Tableau II : Taux de concordance du phénotype épilepsie dans les études de jumeaux.....	7
Table III : Gènes mutés associés à l'épilepsie.....	9
Table IV : Evaluation of language abilities in family AB.....	34
Table V : Neuropsychological and language abilities assessment.....	38
Table VI : Summary of neuropsychological and language ability profiles found in individuals carrying the <i>SYN1</i> _{Q555X} mutation.....	40
Table VII: Summary of epilepsy phenotype found in individuals carrying <i>SYN1</i> _{Q555X} mutation	42

Chapitre 2

Tableau VIII : Gènes dans lesquels une mutation a été identifiée chez un patient autiste.....	49
Tableau IX : Haplotypes retrouvés chez les familles avec des mutations dans <i>SYN1</i>	66
Tableau X : Mutations identifiées dans <i>SYN1</i> chez des patients épileptiques, autistes ou dyslexiques.....	68
Tableau XI : Mutations identifiées dans <i>SYN2</i> chez des patients épileptiques ou autistes.....	74
Tableau XII : Mutations identifiées dans <i>SYN3</i> chez des patients autistes.....	80

Tableau XIII : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des exons de <i>SYN1</i>	83
Tableau XIV : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des exons de <i>SYN2</i>	83
Tableau XV : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des exons de <i>SYN3</i>	84
Tableau XVI : Conditions d'amplification pour <i>SYN1</i>	84
Tableau XVII : Conditions d'amplification pour <i>SYN2</i>	85
Tableau XVIII : Conditions d'amplification pour <i>SYN3</i>	85

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1 : Spectre neurobiologique des types d'épilepsies et héritabilité proposée.....	8
Figure 2 : Arbre généalogique de la famille avec épilepsie temporale réflexe liée au chromosome X.....	14
Figure 3: A large French-Canadian family with X-linked dyslexia.....	31
Figure 4: The Q555X mutation in <i>SYN1</i>	32
Figure 5: Disruption of <i>SYN1</i> induces motor phenotypes in <i>Danio rerio</i>	33
Figure 6 : Sequence alignment of Human and chimpanzee <i>SYN1</i>	35

CHAPITRE 2

Figure 7 : Continuum des troubles du spectre de l'autisme.....	44
Figure 8 : Représentation schématique des neurones pyramidaux de différents cerveaux.....	47
Figure 9 : Domaines fonctionnels retrouvés dans les protéines possiblement impliquées dans l'apparition de la dyslexie.....	52
Figure 10 : Domaines fonctionnels des isoformes de la famille des synapsines.....	53
Figure 11 : Sites de phosphorylation de la synapsine I.....	54
Figure 12 : Mécanisme de phosphorylation de <i>SYN1</i>	55
Figure 13 : Modèle schématique du processus d'exocytose/endocytose des VS...	55
Figure 14 : Pedigree des familles portant la mutation <i>SYN1</i> _{A550T}	64

Figure 15 : Pedigree des deux familles porteuses de la mutation <i>SYN1</i> _{T567A}	65
Figure 16 : Mutation synonyme c.1569G>A retrouvée chez une famille avec dyslexie.....	67
Figure 17 : Mutations identifiées dans <i>SYN1</i>	69
Figure 18 : Pedigree de la famille avec la mutation <i>SYN2</i> _{P253A}	72
Figure 19 : Pedigree des familles porteuses des mutations <i>SYN2</i> _{Y236S} (A) et <i>SYN2</i> _{G464R} (B).....	73
Figure 20 : Mutations identifiées dans <i>SYN2</i>	75
Figure 21 : Pedigree des familles porteuses des mutations <i>SYN3</i> _{A15V} (A) et <i>SYN3</i> _{A277T} (B).....	78
Figure 22 : Pedigree des familles porteuses de la mutation <i>SYN3</i> _{R554P}	79
Figure 23 : Mutations identifiées dans <i>SYN3</i>	81

CHAPITRE 3

Figure 24 : Étapes de développement du cerveau.....	89
Figure 25 : Aspect général de la synapse.....	90
Figure 26 : Complexe multimérique des protéines synaptiques retrouvées dans le SNC.....	98

Figure 15 : Pedigree des deux familles porteuses de la mutation <i>SYN1</i> _{T567A}	65
Figure 16 : Mutation synonyme c.1569G>A retrouvée chez une famille avec dyslexie.....	67
Figure 17 : Mutations identifiées dans <i>SYN1</i>	69
Figure 18 : Pedigree de la famille avec la mutation <i>SYN2</i> _{P253A}	72
Figure 19 : Pedigree des familles porteuses des mutations <i>SYN2</i> _{Y236S} (A) et <i>SYN2</i> _{G464R} (B).....	73
Figure 20 : Mutations identifiées dans <i>SYN2</i>	75
Figure 21 : Pedigree des familles porteuses des mutations <i>SYN3</i> _{A15V} (A) et <i>SYN3</i> _{A277T} (B).....	78
Figure 22 : Pedigree des familles porteuses de la mutation <i>SYN3</i> _{R554P}	79
Figure 23 : Mutations identifiées dans <i>SYN3</i>	81

CHAPITRE 3

Figure 24 : Étapes de développement du cerveau.....	89
Figure 25 : Aspect général de la synapse.....	90
Figure 26 : Complexe multimérique des protéines synaptiques retrouvées dans le SNC.....	97

LISTE DE SIGLES ET D'ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ADI-R : Autism Diagnostic Interview-Revised
- ADOS : Autism Diagnostic Observation Schedule
- ARN : Acide Ribonucléique
- ARNm : Acide Ribonucléique messenger
- ATP : Adénosine tri-phosphate
- CaMKII : Ca²⁺ Calmodulin-dependent protein kinase II
- Cdk5 : Cyclin dependent kinase 5
- CKI : Casein kinase I
- DZ : Dizygote
- ECL : Electrochemiluminescence
- EEG : Électroencéphalogramme
- ELT : Épilepsie du lobe temporal
- HRP : Horseradish peroxidase
- ILAE : Ligue Internationale contre l'épilepsie
- KO: Knock-out
- LOD-score : Logarithm of the odds
- LTP: Long term potentiation
- MAPK: Mitogen activated protein kinase
- mM: Mili molaire
- MZ : Monozygote
- ng : Nanogramme
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- pb : paires de bases
- PCR : Polymerase chain reaction ou réaction en chaîne de la polymérase
- pM : Pico molaire
- PMSF : Phenyl methyl sulphonyl fluoride
- NCBI : National Center for Biotechnology Information

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SNC : Système nerveux central

TED : Trouble envahissant du développement

TLE : Temporal lobe epilepsy

UCSC : University of California Santa Cruz

VS : Vésicule synaptique

*À tous ceux qui ont cru en moi
et qui continueront de le faire*

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Patrick Cossette pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir transmis sa passion pour la génétique humaine.

Je remercie les assistantes de recherche du laboratoire (Line Lapointe, Caroline Meloche et Josée Poirier) pour leur enseignement et leur patience. Un merci spécial à Caroline qui avait toujours du temps pour moi et qui avait toujours réponse à mes questions.

Je remercie Véronique Bolduc, Stéphanie Côté, Amélie Piton et François Gros-Louis pour leur entraide et leurs conseils.

Je remercie les étudiants des laboratoires des Drs Guy A. Rouleau et Bernard Brais pour les échanges scientifiques.

Je remercie la Fondation Savoy pour son support financier.

Je remercie tous les patients qui ont participé au projet et tous les cliniciens qui les ont recrutés.

Je remercie tous les collaborateurs ayant contribué de près ou de loin à cette belle aventure.

Je remercie le personnel du Centre de Recherche du CHUM-Hôpital Notre-Dame et celui des programmes de Biologie moléculaire de l'Université de Montréal pour leur coopération.

CHAPITRE 1 : Identification d'une mutation dans la synapsine I chez une famille avec épilepsie réflexe du lobe temporal

1. Introduction

1.1 Historique de l'épilepsie

L'épilepsie est une condition neurologique dont l'appellation est dérivée du terme grec «epilêpsia», qui signifie « prendre possession de » ou « s'emparer de ». La description détaillée la plus ancienne remonte à 2000 ans avant Jésus Christ. Cependant, c'est le père de la médecine, Hippocrate (environ 460 - 375 av JC) qui a été le premier à identifier le caractère héréditaire de ce qu'on appelait à l'époque la « maladie sacrée ». Il a de plus été le premier à suspecter le cerveau comme étant le site anatomique de ce désordre.

La conception de l'épilepsie comme trouble du cerveau s'imposa davantage au 19^e siècle lorsque la neurologie a émergé comme discipline distincte de la médecine interne et de la psychiatrie. C'est également au 19^e siècle que les bases du dysfonctionnement menant à l'épilepsie ont été mieux décrites, notamment par Hughlings Jackson qui postula en 1873 que les crises résultaient de brèves décharges électrochimiques d'énergie dans le cerveau¹. Peu après, l'excitabilité électrique du cortex cérébral fut découverte par Ferrier, Theodor Fritsch et Hitzig¹. Grâce à la mise au point de l'électroencéphalogramme (EEG) par Hans Berger en 1920, il fut possible de détecter la présence de ces décharges électriques dans le cerveau¹. L'EEG a également facilité la localisation du foyer des décharges épileptiques et a élargi les possibilités du traitement neurochirurgical. Les progrès réalisés au cours des dernières années dans les domaines de la génétique, ainsi que la neuro-imagerie structurale et fonctionnelle ont grandement favorisé notre compréhension de l'épilepsie. Également, le développement de nouveaux traitements pharmacologiques, qui a connu un bel essor depuis 1960, a permis d'améliorer la qualité de vie des malades épileptiques.

1.2 Phénotype épileptique

L'épilepsie est un désordre neurologique fréquent et hétérogène ayant une prévalence d'environ 1% dans la population générale. La maladie est caractérisée par des crises récurrentes et non provoquées. Les crises épileptiques représentent les manifestations cliniques associées à une dysfonction cérébrale transitoire causée par une décharge excessive, synchronisée et anormale d'un groupe de neurones localisés dans le cortex cérébral.

Il existe beaucoup de diversité quant à l'expression clinique des crises épileptiques. En effet, les manifestations cliniques des crises varient en fonction de la zone d'origine de la crise et de la région du cortex cérébral vers laquelle elle se propage. Par exemple, une crise partielle ayant comme origine le lobe occipital provoquera une perception visuelle anormale et pourra provoquer des phénomènes moteurs ou sensitifs si elle se propage au lobe frontal ou pariétal. En diffusant vers la totalité du cerveau, la crise devient généralisée et provoquera des manifestations plus importantes incluant la perte de conscience et des convulsions. La revue détaillée de toutes les variantes de ces crises et syndromes épileptiques associés va au-delà des objectifs de ce mémoire. Mentionnons toutefois que les éléments permettant de les identifier sont cliniques et para-cliniques et incluent: les antécédents, l'état neurologique et cognitif, l'âge de début, le type de crises, les caractéristiques de l'EEG et l'imagerie cérébrale. Le tableau qui suit répertorie les syndromes épileptiques reconnus dans la classification actuelle de la ILAE².

Tableau I : Classification des épilepsies et des syndromes épileptiques**1. Syndromes épileptiques et épilepsies localisées***1.1. Idiopathiques*

Épilepsie rolandique bénigne de l'enfant
 Épilepsie occipitale bénigne
 Épilepsie à la lecture

1.2. Symptomatiques

Épilepsie partielle continue de l'enfant

*1.3. Cryptogéniques***2. Syndromes épileptiques et épilepsies généralisées***2.1. Idiopathiques*

Convulsions néonatales bénignes familiales
 Convulsions néonatales bénignes
 Épilepsie myoclonique bénigne du nourrisson
 Épilepsie absence de l'enfance
 Épilepsie absence juvénile
 Épilepsie myoclonique juvénile

2.2. Cryptogéniques et/ou symptomatiques

Syndrome de West (spasmes infantiles)
 Syndrome de Lennox-Gastaut
 Épilepsie avec crises myocloniques-astatiques
 Épilepsie avec absences myocloniques

*2.3. Symptomatiques**2.3.1. Étiologie non spécifique*

Encéphalopathie myoclonique précoce
 Encéphalopathie épileptique infantile précoce avec bursts-suppression

*2.3.2. Syndromes spécifiques***3. Syndromes épileptiques et épilepsies où il n'est pas déterminé si partielle ou généralisée***3.1. Avec crises partielles et généralisées*

Crises néonatales
 Épilepsie myoclonique sévère de l'enfance
 Épilepsie avec activité pointe-onde continue durant le sommeil
 Aphasie épileptique acquise (syndrome de Landau-Kleffner)

*3.2. Avec caractéristiques partielles et généralisées équivoques***4. Syndromes spéciaux***4.1. Crises de situation*

Convulsions hyperthermiques
 Convulsions survenant uniquement lors d'événements métaboliques ou toxiques

4.2. Crises ou états de mal isolés

Pour la majorité des individus, les crises épileptiques sont compatibles avec une vie normale, malgré certaines restrictions. Notons toutefois que l'épilepsie est un dysfonctionnement du réseau cortical qui peut aussi mener à des problèmes au niveau de la cognition, des apprentissages, du comportement et des habiletés sociales (voir section 1.2.2, page 4).

1.2.1 Épilepsie du lobe temporal

L'épilepsie du lobe temporal est un syndrome épileptique fréquent caractérisé par des crises partielles complexes. Ces crises sont associées à une activité paroxystique qui se manifeste par des décharges localisées au lobe temporal. La majorité de ces crises origine des structures mésiales du lobe temporal, notamment l'hippocampe et le subiculum³. Également, un des principaux changements pathologiques retrouvés dans les structures du lobe temporal des patients souffrant d'ELT est la sclérose hippocampique. Cette pathologie est caractérisée par une perte sélective de neurones ainsi que par une gliose réactionnelle dans la formation hippocampique⁴. L'étiologie de la sclérose hippocampique associée à l'épilepsie du lobe temporal demeure indéterminée.

1.2.2 Épilepsie réflexe à l'eau

Les crises réflexes sont précipitées par un stimulus spécifique tel que la lecture, la nourriture, les patrons de couleurs, une lumière oscillante, une stimulation auditive ou encore par immersion dans l'eau chaude. Les épilepsies réflexes causées par l'eau chaude ont été décrites sous différentes appellations notamment « l'épilepsie à l'eau » dans la littérature francophone ou encore « hot water », « bathing », ou « water immersion epilepsy » dans la littérature anglophone. Le premier cas fut rapporté en 1945 par Allen chez un garçon de 10 ans chez qui des convulsions sont survenues durant son bain^{5;6}. D'autres cas isolés ont ensuite été rapportés en Australie, au Japon,

au Canada et aux Etats-Unis ⁶⁻⁹. Cependant un grand nombre de cas a été observé en Inde et en Turquie ¹⁰⁻¹². La raison de la grande incidence dans ces régions a été attribuée à des facteurs génétiques, ainsi qu'aux habitudes de bain, comme par exemple le fait de verser de l'eau très chaude sur la tête. Dans tous les cas rapportés, l'atteinte semble être plus fréquente chez les hommes avec un ratio d'environ 3 :1 ¹²⁻¹⁶. Habituellement, les crises sont provoquées par l'immersion du corps ou de la tête dans l'eau chaude. Dans la plupart des cas, la crise peut être contrôlée par une réduction de la température de l'eau ¹²⁻¹⁶.

La pathogenèse exacte de l'épilepsie à l'eau n'est pas connue. Cependant, dans environ 70% des cas, les crises sont de type partiel complexe, avec ou sans généralisation secondaire. Les symptômes secondaires incluent la perte de conscience, l'hypotonie ou l'hypertonie, la fixité du regard, la crise tonico-clonique et la cyanose. L'EEG ictal montre habituellement une activité rythmique lente unilatérale de haute amplitude dans le lobe temporal suivie d'une généralisation secondaire quelques secondes plus tard ^{9, 14-16}. De plus, certaines études ont rapporté la présence de sclérose hippocampique chez des patients avec épilepsie à l'eau ¹⁷.

1.2.3 Épilepsie temporale et co-morbidités

En plus de l'épilepsie, le dysfonctionnement d'un réseau cortical peut mener à des déficits cognitifs et ainsi affecter les apprentissages, les comportements et la socialisation. Chez les individus atteints d'épilepsie partielle, le déficit cognitif reflète souvent la localisation du foyer épileptique (ex. syndromes du lobe frontal, temporal et pariétal). L'épilepsie peut aussi être associée avec une dysfonction cérébrale plus étendue comme le retard mental ¹⁸. De plus, au moins deux autres groupes de troubles neurodéveloppementaux ont été associés à l'épilepsie soit: **(1) les troubles du spectre de l'autisme**, lesquels peuvent survenir en association avec les syndromes de West (spasmes infantiles) ou de Lennox-Gastaut, deux formes malignes d'épilepsie et **(2) les troubles du langage** incluant la dyslexie développementale, lesquels sont plus souvent vus chez les patients épileptiques ¹⁹. Aussi le syndrome de Landau-Kleffner est un

syndrome épileptique rare caractérisé par une épilepsie temporale sévère, ainsi que par une aphasie progressive et des traits autistiques ²⁰. Concernant la prévalence de l'épilepsie chez les autistes, il semble qu'elle soit d'environ 30% et que tous les types de crises sont rencontrés ^{21; 22}. Bien qu'il y ait consensus à l'effet d'une prédisposition génétique pour les troubles du langage et l'autisme ^{21; 23}, les principaux gènes menant à ces désordres ne sont pas encore identifiés. Plus encore, les mécanismes biologiques et les réseaux neuronaux impliqués dans l'autisme et les troubles de langage sont pour la plupart méconnus ^{24; 25}.

1.3 Génétique des épilepsies

Le caractère héréditaire de l'épilepsie a d'abord été suspecté grâce aux études de jumeaux ²⁶⁻²⁸. Bien qu'il existe une variabilité entre ces études quant aux taux de concordance, celles-ci démontrent que la concordance est beaucoup plus élevée chez les jumeaux monozygotes (MZ) que chez les dizygotes (DZ).

Le tableau II (page suivante), tiré de l'étude de Berkovic S.F. *et al.* ²⁹ montre :

- (1) que le caractère héréditaire des épilepsies est plus important pour les épilepsies généralisées que pour les épilepsies partielles
- (2) que des facteurs environnementaux contribuent à l'apparition de la maladie;
- (3) que les crises fébriles, qui ont par définition une composante environnementale, sont également influencées par des facteurs génétiques.

Tableau II : Taux de concordance du phénotype épilepsie dans les études de jumeaux

Concordance des cas	MZ	DZ
Épilepsies généralisées	0.81	0.26
Épilepsies partielles	0.36	0.05
Épilepsie non classifiées	0.53	0.18
Convulsions fébriles	0.58	0.14

Adapté de Berkovic S.F. *et al.* 2006³⁰

Dans la littérature, il est rapporté qu'environ 60% des épilepsies demeurent inexplicées (idiopathiques), notamment, parce que l'imagerie cérébrale par IRM ne montre pas de lésions chez ces patients. Jusqu'à présent, au moins 15 gènes prédisposant à l'épilepsie ont été identifiés chez l'Homme³¹⁻³³ (table III, page 9) et plus de 50 gènes chez la souris³³. Toutefois, malgré ces avancées, les gènes causant l'épilepsie dans la majorité de la population épileptique demeurent indéterminés. En effet, les gènes identifiés jusqu'à présent sont associés à des types d'épilepsies plutôt rares ou ne sont impliqués que dans de rares cas isolés d'épilepsie. Il est vraisemblable que l'épilepsie est une maladie neurologique d'origine complexe causée par l'effet combiné de plusieurs gènes et facteurs environnementaux, chacun d'eux ayant un faible effet sur la susceptibilité (voir figure 1, page suivante). L'identification des gènes impliqués dans les formes fréquentes d'épilepsies représente donc un grand défi.

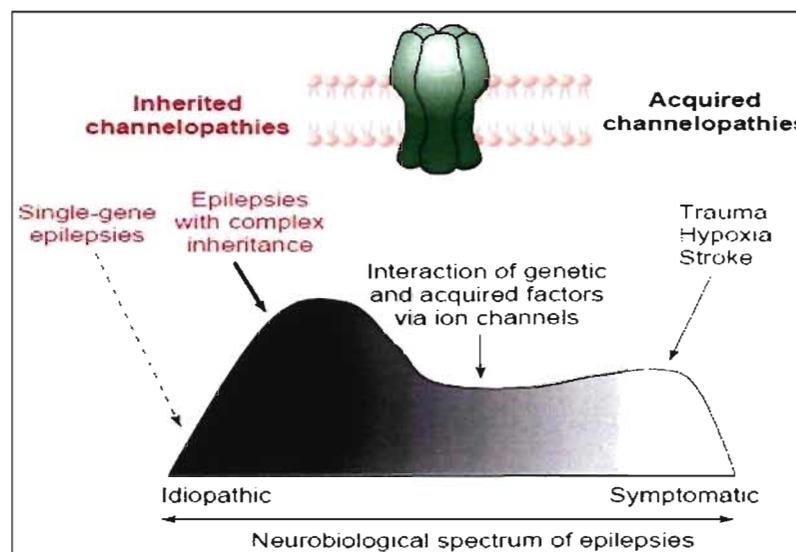


Figure 1 : Spectre neurobiologique des types d'épilepsies et héritabilité proposée.
Tirée de Berkovic SF *et al.* 2006³⁰

La recherche de gènes impliqués dans les formes familiales d'épilepsie et dans des modèles animaux a toutefois permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la maladie et de classer les épilepsies héréditaires en au moins trois catégories fonctionnelles soit : (1) défaut primaire dans l'excitabilité des membranes causé par des mutations dans des gènes codant pour des canaux ioniques (sodium voltage-dépendant, potassium, calcium, chlore); (2) développement anormal des structures cérébrales, aussi appelé dysplasie corticale causé par des défauts dans les signaux de migration, prolifération, différenciation et segmentation³³⁻³⁵; (3) défauts de signalisation synaptique et plasticité synaptique causés par une perturbation des protéines impliquées dans la machinerie de relâche de neurotransmetteurs (ex. mobilisation des neurotransmetteurs, trafic des vésicules synaptiques, exocytose). La table suivante montre la liste de tous les gènes associés à l'épilepsie chez l'Homme.

Table III : Gènes mutés associés à l'épilepsie

Gène	Syndrome épileptique	Année de découverte
Monogéniques, canalopathie		
GluR	JAE	1997
CHRNA4	ADNFLE	1995
KCNQ2	BFNS	1998
KCNQ3	BFNS	1998
SCN1B	GEFS+	1998
SCN1A	GEFS+ (SMEI)	2000/01
CHRN2	ADNFLE	2000
GABRG2	CAE/FS/GEFS+	2001
SCN2A	GEFS+/BFNIS	2001
GABRA1	ADJME	2002
CLCN2	IGE	2003
Monogéniques, autres		
LGI1	ADPEAF	2002
EFHC1	JME	2004
Épilepsies complexes		
CACNA1H	CAE, IGE	2003/04
GABRD	IGE, GEFS+	2004

Données tirées de Gourfinkel AI *et al.* (2004), Meisler MH *et al.* (2001) et Noebels JL (2003)³¹⁻³³

Abréviations:

ADJME:épilepsie juvénile myoclonique de l'enfance autosomale dominante ;
ADNFLE:épilepsie du lobe frontal nocturne autosomale dominante ;
ADPEAF:épilepsie partielle avec symptômes auditifs autosomale dominante ;
BFNS: convulsions néonatales bénignes familiales ;
BFNIS:convulsions infantiles-néonatales bénignes familiales ;
CAE : épilepsie-absence de l'enfance;
FS : convulsions fébriles ;
GEFS+ : épilepsie généralisée avec convulsions fébriles ;
IGE: épilepsie idiopathique généralisée ;
JME: épilepsie juvénile myoclonique;
SMEI: épilepsie myoclonique sévère de l'enfance ;

1.4 Mutation dans *SYN1* chez une famille avec épilepsie et troubles d'apprentissage

En 2004, Garcia et ses collègues ³⁶ ont décrit une famille avec épilepsie, troubles d'apprentissage et problèmes comportementaux. Puisque tous les membres atteints étaient des hommes et qu'il n'y avait pas de transmission homme-homme, une hérédité liée au X fut suspectée. Ces auteurs ont localisé ce gène à la région centromérique du chromosome X et une mutation non-sens dans le gène *SYN1* a été identifiée chez les individus atteints. Il s'agissait du premier exemple d'un désordre causé par un dysfonctionnement d'une protéine associée aux vésicules synaptiques chez l'Homme. Par contre, des mutations dans cette famille de gènes, notamment *SYN1* et *SYN2* ont été associées à l'épilepsie chez la souris ³⁷⁻⁴⁰ (voir chapitre 2, section 1.3, page 53).

2. Projet de recherche

2.1 Problématique

L'épilepsie est une maladie neurologique présente chez 1% de la population. Dans 65% des cas, l'étiologie ne peut être identifiée (idiopathique) et plusieurs évidences suggèrent des facteurs génétiques. L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est la forme la plus fréquente d'épilepsie. Jusqu'à présent quelques gènes prédisposant à l'épilepsie ont été identifiés. Toutefois la majorité de ces gènes n'explique qu'une faible proportion des cas d'épilepsies. Même si les épilepsies partielles ont un mode de transmission dit complexe, la découverte des gènes prédisposant aux formes Mendéliennes constitue une étape clé dans la recherche des gènes prédisposant à la majorité des épilepsies idiopathiques. Nous croyons que ces découvertes nous permettront une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'ELT et nous mèneront à un meilleur diagnostic et traitement de cette maladie.

2.2 Hypothèse et objectifs

Nous avons récemment identifié une grande famille canadienne-française avec épilepsie du lobe temporal réflexe induite par le contact de l'eau (figure 2, page 14). L'analyse généalogique de cette famille est compatible avec un mode de transmission lié au chromosome X. L'objectif général de ce projet est d'identifier les gènes prédisposant à l'ELT et de déterminer comment les mutations dans ces gènes mènent à la maladie. À cette fin les objectifs spécifiques sont :

- (1) localisation et clonage positionnel d'un gène que nous avons localisé sur le chromosome Xp11-q21, dans une grande famille canadienne-française avec épilepsie temporale réflexe;

- (2) tester d'autres familles canadiennes-françaises avec ELT pour des mutations dans le gène identifié en (1);
- (3) caractérisation des propriétés biochimiques et électro-physiologiques de chacune des mutations trouvées en (1) et (2).

2.3 Pertinence et retombées

L'identification et la caractérisation des molécules mutées impliquées dans l'ELT vont améliorer notre compréhension de la maladie. Cela nous permettra notamment de produire des animaux transgéniques qui faciliteront le développement de nouveaux médicaments plus spécifiques à la maladie. Grâce à une meilleure compréhension du mode de transmission et de l'étiologie de la maladie, nous serons en mesure d'offrir des conseils génétiques aux individus atteints ainsi qu'aux membres de leur famille, incluant des tests diagnostiques moléculaires.

3. Matériel et méthodes

3.1 Localisation du gène causant l'épilepsie temporale réflexe

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour tenter d'identifier un gène associé à l'épilepsie. Dans ce projet, comme nous étudions une forme familiale d'épilepsie avec transmission mendélienne, nous avons opté pour une étude de liaison conventionnelle, brièvement expliquée ci-dessous.

3.1.1 Criblage du chromosome X

L'étude de liaison (linkage) permet d'analyser le génotype d'un individu à l'aide d'un ensemble de marqueurs polymorphiques dont la position chromosomique est connue. Le but de cette méthode est d'identifier quelle région du génome (locus) est transmise en même temps que la maladie. Pour ce faire, des marqueurs polymorphiques, souvent des microsatellites sont utilisés. Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN dont le motif est répété plusieurs fois. Le nombre de répétitions est hautement variable d'un individu à un autre, ce qui fait d'eux des marqueurs très informatifs. De plus, leur distribution est quasi-uniforme à la grandeur du génome. Grâce à la technique de PCR (polymerase chain reaction) il est possible d'étudier ces régions polymorphes et d'établir le génotype d'un individu pour un locus donné. Une fois les génotypes établis, l'analyse de liaison génétique permet d'analyser les résultats et de déterminer à quelle partie d'un chromosome est liée la maladie. Dans le cas d'une maladie héréditaire liée au chromosome X, comme la famille étudiée ici, seuls les marqueurs localisés sur ce chromosome sont génotypés. Un tel mode de transmission est suspecté lorsque :

- les femmes hétérozygotes ne sont pas atteintes mais peuvent transmettre la maladie ;
- la maladie ne se manifeste que chez les sujets de sexe masculin ;
- il n'y a aucun sujet atteint dans la lignée paternelle et l'on n'observe pas de transmission père-fils.

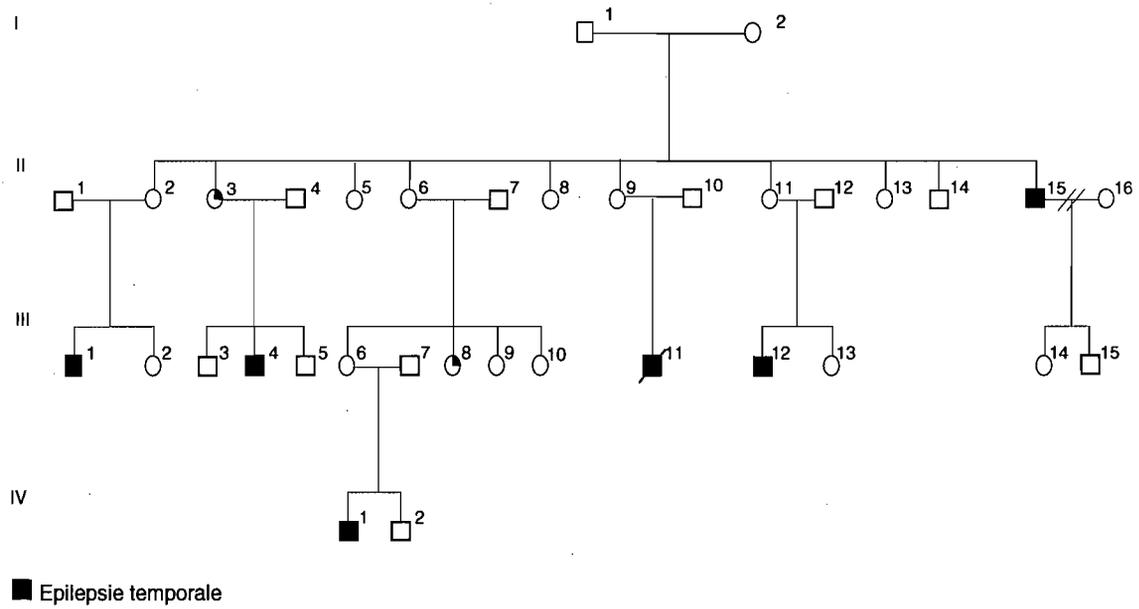


Figure 2 : Arbre généalogique de la famille avec épilepsie temporale réflexe liée au chromosome X.

3.1.2 Analyse de liaison de type paramétrique

L'analyse de liaison de type paramétrique constitue une modélisation de la ségrégation des allèles entre le gène malade et celle de marqueurs polymorphiques, en fonction du taux de recombinaison entre le gène suspecté et chacun de ces marqueurs. Il s'agit d'une méthode d'analyse statistique qui permet d'évaluer la vraisemblance d'une telle liaison. Le résultat est exprimé par le LOD-score (logarithm of the odds). Cette valeur est déterminée par le logarithme du rapport des probabilités entre l'hypothèse proposée de liaison génétique et l'hypothèse inverse de non liaison. Pour les autosomes, une valeur de LOD supérieure ou égale à 3 est nécessaire pour établir une liaison entre une maladie et un locus. Une valeur de 3 signifie qu'il est 1000 fois plus probable qu'il y ait une liaison. Cela correspond au seuil de signification conventionnel de $p=0.05$. Une valeur de LOD égale ou inférieure à -2 permet d'exclure la liaison. Si toutefois la valeur est comprise entre -2 et 3, le résultat est dit non concluant. En appliquant le même seuil de signification de $p=0.05$, on peut conclure qu'une valeur de LOD égale ou supérieure à 2.3 est suffisante pour une liaison au chromosome X ⁴¹.

Une fois la liaison confirmée sur un chromosome donné, la région chromosomique candidate (commune à tous les individus atteints) est déterminée au moyen de l'analyse des recombinaisons survenues chez les individus atteints de la maladie. À cette fin, il est souvent nécessaire d'utiliser une couverture plus dense de marqueurs polymorphiques localisés à l'intérieur de la région liée.

3.2 Criblage des gènes candidats

Grâce au séquençage du génome humain, il est maintenant possible de connaître la localisation et la séquence nucléotidique de tous les gènes composant notre génome. Des bases de données comme UCSC ⁴² et NCBI ⁴³ permettent de déterminer quels gènes sont situés dans la région candidate et aussi de connaître leur niveau d'expression dans un tissu donné ainsi que leur fonction connue ou présumée à partir des domaines fonctionnels du gène. Le séquençage direct des gènes candidats sera effectué, ce qui consiste à comparer la séquence nucléotidique d'un gène obtenue par séquençage d'un individu atteint à celle répertoriée dans les bases de données. La technique s'effectue de la façon suivante : (1) dessin des amorces avec le logiciel Exon primer (<http://genome.ucsc.edu/>) afin d'amplifier des fragments d'ADN génomique dont la longueur varie entre 400 et 600 pb ; (2) amplification des fragments par pcr (voir protocole en annexe, pages 83-85) ; (3) séquençage au moyen de l'appareil 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) du Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill et (4) analyse et comparaison des séquences à l'aide du logiciel SeqMan de la suite DNASTAR. Le progrès technologique des dernières années a considérablement accéléré le processus de séquençage qui se fait maintenant à l'aide d'une plateforme automatisée. Le principe de la réaction reste toutefois semblable alors qu'une version modifiée de la méthode de Sanger est utilisée ⁴⁴. Le principe de base repose sur l'utilisation de di-déshydro-nucléotides (ddNTPs) marqués par fluorescence. Des fichiers informatiques sont créés pour chaque séquence et le résultat final peut être visualisé à l'aide de logiciels spécialisés généralement fournis avec l'appareil tel que le sequencing analysis software d'Applied Biosystems. Une variation de la séquence nucléotidique du gène par rapport à la séquence théorique est considérée comme étant une mutation lorsque cette variation n'est pas répertoriée dans les bases de données, qu'elle n'est pas présente dans les contrôles testés, qu'elle a été confirmée par séquençage du brin inverse et qu'elle perturbe la fonction du gène (étude fonctionnelle). Il est toutefois important de noter que le terme mutation sera employé dans ce mémoire

afin de décrire des modifications génétiques dont le rôle causal reste encore à déterminer.

De façon plus spécifique pour ce projet, les gènes localisés dans la région candidate minimale seront évalués selon différents critères afin de prioriser les meilleurs candidats pour le séquençage. Ces critères sont :

- (1) l'expression du gène dans le cerveau, notamment dans les régions spécifiques aux épilepsies partielles ou généralisées (ex. hippocampe, amygdale, néocortex des lobes frontal et temporal et le thalamus) ;
- (2) un rôle biologique potentiel lié à l'épilepsie, attribué par les mécanismes de base sous-jacent aux épilepsies partielles ou généralisées chez l'Homme ou chez les modèles animaux ;
- (3) une similarité de fonction ou de séquence comparativement aux gènes préalablement identifiés chez l'Homme ou chez la souris.

En se basant sur ces critères, les meilleurs candidats potentiels pour expliquer les épilepsies idiopathiques partielles ou généralisées sont listés ici bas :

- (1) canaux ioniques et récepteurs ioniques voltage-dépendant ;
- (2) récepteurs glutamatergiques, cholinergiques et gabaergiques ;
- (3) enzymes impliquées dans la synthèse ou le métabolisme du glutamate, du GABA ou d'autres neurotransmetteurs;
- (4) protéines impliquées dans les mécanismes de relâche des neurotransmetteurs ;
- (5) protéines impliquées dans le développement neuronal (ex : neurotrophines).

4. Synapsin 1 truncation is associated with developmental dyslexia, language impairment and epilepsy.

Patrick Cossette¹, Lysanne Patry¹, Jonathan R. McDearmid², Ana Ines Ansaldo³, Isabelle Rouleau^{1,4}, Geneviève Sénéchal^{1,4}, Karine Marcotte³, Laurent Mottron⁵, Line Lapointe¹, Judith St-Onge¹, Dominique Verlaan¹, François Gros-Louis¹, Anne Lortie⁶, Lionel Carmant⁶, Wendy H.Raskind⁷, Dang Khoa Nguyen¹, Pierre Drapeau², and Guy A Rouleau¹.

1) Center for the Study of Brain Diseases, CHUM Research Center - Notre Dame Hospital, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; 2) Center for Research in Neuroscience, McGill University Health Center Research Institute, and Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; 3) Geriatric Institute of the Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; 4) Department of Psychology, Université du Québec à Montréal, Canada; 5) Department of Psychiatry, Hôpital Rivière-des-Prairies, Montréal, Québec, Canada; 6) Department of Pediatrics and Research Centre, Hôpital Saint-Justine, Montréal, Québec, Canada; 7) Division of Medical Genetics, Department of Medicine, University of Washington, Seattle.

Corresponding author :

Patrick Cossette, MD, MSc., FRCP(C)

Center for the Study of Brain Diseases- CHUM Research Center Notre-Dame Hospital
1560, Sherbrooke Street East
Montreal, QC, CANADA, H2L 4M1

Phone : [information retirée / information withdrawn]

Fax : [information retirée / information withdrawn]

Email : [information retirée / information withdrawn]

4.1 Apport des coauteurs

Patrick Cossette: écriture du manuscrit, analyse de liaison, recrutement et évaluation neurologique des patients, supervision du travail de laboratoire, titulaire de la subvention des IRSC pour ce projet.

Lysanne Patry: écriture du manuscrit, analyse de liaison, priorisation des gènes candidats, séquençage de l'ADN des patients et découverte de la mutation.

Jonathan R. McDermid: études fonctionnelles chez le poisson zébré, écriture du manuscrit.

Ana Ines Ansaldo : évaluation des capacités de langage de la famille, écriture du manuscrit.

Isabelle Rouleau : évaluation neuropsychologique de la famille.

Geneviève Sénéchal : évaluation neuropsychologique de la famille.

Karine Marcotte : évaluation des capacités de langage de la famille.

Laurent Mottron : évaluation clinique et recrutement des individus autistiques.

Damian Labuda : a fourni l'ADN de primates pour les analyses phylogénétiques.

Line Lapointe : clonage de la synapsine I, mutagenèse et préparation des transcrits d'ARN pour les études fonctionnelles.

Judith St-Onge : génotypage du chromosome X.

Dominique J. Verlaan : analyse de liaison, priorisation des gènes candidats.

François Gros-Louis : participation aux études fonctionnelles chez le poisson zébré.

Anne Lortie : évaluation neurologique de certains individus.

Lionel Carmant : évaluation neurologique de certains individus.

Wendy H Raskind : recrutement et évaluation des individus dyslexiques.

Dang Khoa Nguyen : recrutement et évaluation neurologique des individus, écriture du manuscrit.

Pierre Drapeau : supervision des études fonctionnelles chez le poisson zébré, écriture du manuscrit.

Guy A Rouleau : recrutement de patients, écriture du manuscrit.

4.2 Acknowledgment

The authors wish to thank the families for their participation in this study. We are also grateful to Micheline Gravel for her implication in the collection of blood samples, and clinical informations. We also thank Caroline Meloche and Josée Poirier for technical assistance. P.C., G.A.R., and P.D. are supported by Canadian Institute for Health Research (CIHR). L.P. is supported by the Savoy Foundation.

4.3 Abstract

The identification of genes predisposing to dyslexia, a disorder of reading and spelling, may provide unique insight into the molecular mechanisms underlying oral and written

language, the most distinctive features in Humans⁴⁵. We report here a large French-Canadian kindred, AB, segregating dyslexia as a dominant X-linked trait. Affected individuals from this family carry a Q555X mutation in synapsin 1 (*SYNI*), encoding for a neuron-specific phosphoprotein which interact with synaptic vesicles⁴⁶. Compared to wild-type synapsin, mutant *SYNI* showed impaired synaptic transmission in an *in vivo* assay. These results suggest that truncated *SYNI* predisposes towards developmental dyslexia and language disorder.

4.4 Introduction

Dyslexia, originally described as *word blindness*⁴⁷, is the most common learning disorder, affecting approximately 5% of the general population⁴⁸. The disease is characterized by impaired reading skills in individuals showing otherwise adequate intelligence, motivation, and access to education. Proficient reading requires the integration of both lexical (orthographic) and sub-lexical (phonological) processing routes. Whereas lexical processing allows global and fast decoding of written material, sub-lexical processing route involves phonological decoding, which is the ability to recognize the most elementary units of spoken language, called phonemes. Phonological processing is a core aspect of oral and written language development, since it allows discrimination, manipulation and understanding of speech sounds⁴⁹. Dyslexic individuals are characterized by a deficit in one or both of these processing routes, but impaired phonological processing is the most consistent observation among poor readers^{24; 25}. In addition, dyslexia is frequently associated with spelling difficulties (dysorthographia), particularly for irregular words (e.g. yacht, brooch) and homophones (e.g. see/sea, tail/tale)⁴⁸.

Despite extensive multidisciplinary studies, the specific mechanisms underlying developmental dyslexia remain a matter of debate^{24; 25}. An important genetic contribution has been consistently observed for dyslexia, as indicated by studies of familial aggregation and twins^{49; 50}. So far, up to nine putative loci have been mapped

for dyslexia, mainly by using genome-wide association and linkage disequilibrium strategies²³. Recently, coding and non-coding variants have been found in four genes, respectively mapping to the *DYX1* (*DYX1C1*), *DYX2* (*DCDC2*, *KIAA0319*), and *DYX5* (*ROBO1*) loci^{51; 52}. However, the relationship between these variants and the biological mechanisms underlying the disease is difficult to establish – a problem inherent to association studies. In particular, concerns about the causality of these genetic variations are illustrated by conflicting reports for the *DYX2* locus, for which variants in two distinct genes (*DCDC2*, *KIAA0319*) have been considered to be responsible for the disease^{53; 54}. Therefore, no specific genes clearly predisposing to dyslexia and language disorders have been identified.

4.5 Methods

4.5.1 Characterization of neuropsychological profiles and language abilities

All collected individuals from the AB family had a screening interview in order to detect learning disorder, more specifically reading or spelling impairments. Individuals with suspected deficits, as well as all *SYN1*_{Q555X} mutation carriers, underwent detailed neuropsychological evaluation, and thorough assessment of oral and written language abilities, with a series of standardized tests (Table V, page 38). These evaluations were performed by team of neuropsychologists and speech-language pathologists blinded to the genetic status. Standardized Assessment for diagnosis of Autism (ADI-R & AGOS-G module 3) was performed in individuals IV-01 and IV-02. The assessment of pragmatic aspects of language processing was accomplished with the Pragmatic Profile of the Clinical Evaluation Language Fundamentals (CELF-IV). Collection of additional dyslexic families has been described elsewhere⁵⁵.

4.5.2 Genotyping and linkage analysis

The microsatellite markers used for scanning of the X chromosome, as well as for fine mapping of the linked region were genotyped manually, by PCR incorporating [³⁵S]-dATP. PCR products were analyzed by electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gels, then revealed by autoradiography. Allele sizes for each marker were obtained from the Fondation Jean Dausset CEPH database, and determined by comparison to the M13mp18 sequence ladder. The marker map positions were based on the sex-averaged maps from Marshfield Medical Research Foundation and UCSC browser. For TLE phenotype, we calculated two-points LOD scores with MLINK from the FASTLINK 3.0P package by using a penetrance of 0.8, a disease allele frequency of 0.00001, a phenocopy frequency of 0.0001 and equal allele frequencies. For dyslexia phenotype, two-points LOD scores were calculated with a penetrance of 0.9 in males, 0.6 in females, a disease allele frequency of 0.0001, a phenocopy frequency of 0.001.

4.5.3 Screening for mutation

The genomic organization of the human *SYNI* gene was determined by aligning sequences from *SYNI* mRNA (Genbank accession no NM_006950) to the corresponding genomic sequence on chromosome X (Genbank accession no NC_000023). Primers were designed to amplify 400-600 base pair fragments from genomic DNA to screen all coding portions of the gene. Portions of the *SYNI* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and analyzed by direct sequencing on ABI3730 automatic sequencer (Applied Biosystems). Primers 5'-TGCCCTTGGCCGCCAGACCTC-3'; and 5'-CTTGGGGGAAGGGCTTGGCTCAGG-3' were used to amplify exon 12. For the AB family, we have initially sequenced one affected individual and a control from the family. *SYNI*_{Q555X} mutation carrier was assessed by direct sequencing in all affected and non-affected members from the AB family.

4.5.4 Cloning of *SYN1* and mutagenesis

We designed primers (Syn-5'-BamHI-TCAAGGATCCATGAACTACCTGCGG-CGCCGCCT, and Syn-3'-XhoI-GTTACTCGAGTCAGTCGGAGAAGAGGCTGG) to amplify by PCR the complete open reading frame of *SYN1a* from a human brain cDNA library (Marathon-ready, Clontech), using pfu polymerase (Stratagene). We subcloned the PCR products into the pCS2+ vector by using BamH1 and Xho1 restriction sites. In order to introduce the Q555X mutation in *SYN1a*, we used a protocol modified from the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), using primers 5'-CCT-CTCCGTCTCCCTAGCGCC-AGGCGG-3', and 5'-CCGCCTGGCGCTAGGGAG-ACGGAGAGG-3'. All constructs were completely sequenced to confirm the mutation, as well as to exclude any other variants that could have been introduced during the PCR amplification.

4.5.5 Functional analysis of the *SYN1*_{Q555X} mutation in *Danio rerio*

Syntenic *SYN1* in zebrafish (*Danio rerio* ; XM_694178) was suppressed by micro-injection of an antisense morpholino (5'-ACGTCGCAGGTAATTCATTGTGAAG-3'; Gene-Tools) in order to knock-down the function of the gene. Details of this protocol have been provided elsewhere⁵⁶. Briefly, fishes were examined with respect to their reaction to touch of the trunk with a pair of fine forceps. Swimming behaviour was filmed using high-speed (500 Hz) video imaging. To investigate underlying disruptions of the synaptic drive for locomotion, whole cell patch clamp methods were used to record spinal motoneurons following touch evoked swimming. We then assessed whether overexpression of human *SYN1a* mRNA can efficiently rescue the normal phenotype. For this purpose, we co-injected the morpholino together with either wild-type or mutant (Q555X) *SYN1a* clones, and compared their relative effectiveness. Capped mRNA from mutant and wild-type *SYN1a* clones were generated by using the mMessage Machine kit (Ambion).

4.5.6 Immublot analysis

In order to test the integrity of the constructs, COS7 cells were transfected with wild-type and mutant *SYN1a* clones. COS-7 cells were collected 48 hours after transfection, rinsed with phosphate-buffered saline and scraped into a solution containing 8M urea, 2% β -mercaptoethanol, 1% SDS, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatin, 1 μ g/ml leupeptin and 10 μ g/ml aprotinin. Lysates were sonicated on ice and centrifuged. The protein concentration in the supernatant was measured using the Bradford reagent method (BioRad). A total of 25 μ g protein for each transfection was loaded in SDS sample buffer and separated on a 8% SDS-PAGE gel and then transferred to a PVDF membrane. The blot was probed with an anti-Synapsin1 (1:2000) (SYSY, Synaptic Systems) and HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:2000), and then developed using the ECL western blot detection system (Perkin Elmer).

4.5.7 Comparison of Human and chimpanzee *SYN1* sequence

Nucleotide sequence of Human (*Homo sapiens*, Genbank NM_006950) and chimpanzee *SYN1* (*Pan troglodytes*, Ensembl ENST00000263237) were available in public databases for exons 2, 3, 4, 5, 6 and 13. Missing exons of *Pan troglodytes* were amplified by PCR by using the same primers designed for human *SYN1* gene and analysed by direct sequencing. Alignment of the sequences was performed by using ClustalW (EMBL-EBI).

4.6 Results

As part of a large collaborative project on the genetics of epilepsy in the French-Canadian population, we identified a large family segregating temporal lobe epilepsy (TLE) over 4 generations. The family was named AB, the initials of the proband. The mode of inheritance for TLE in this family is compatible with a recessive X-linked transmission (Fig 3, page 32). We scanned the X chromosome by using 10 evenly distributed microsatellite markers, and found evidence for linkage on chromosome Xp11-q21, with a maximum LOD score of 2.53 at $\theta = 0$ for marker *DXS7132*. Fine mapping using 14 additional markers identified key recombinants that allowed us to refine a candidate region of 58 Mbp between markers *DXS8042* and *DXS6799*, with a maximum LOD score of 3.1 for marker *DXS6949*. By sequencing candidate genes mapping to the minimum candidate interval we identified a stop codon (Q555X) in *SYN1*, encoding synapsin 1, in all TLE individuals from the family (figure. 4, page 32). This mutation was not detected in 400 control chromosomes.

Unexpectedly, detailed neuropsychological testing revealed severe impairment of reading and spelling in four TLE males carrying the *SYN1*_{Q555X} mutation. This latter observation prompted us to systematically reassess the AB family with respect to language impairment and mutation carrier status. A total of 17 individuals carrying the *SYN1*_{Q555X} mutation were evaluated, including six males and 11 females (Table IV, page 34). In comparison to age-peers, the vast majority of mutation carriers (n=12) had poor reading performance in irregular, infrequent and polysyllabic words (sublexical processing deficits), together with impaired reading comprehension. In these poor readers, we also observed various degrees of lexical access deficits (e.g. poor naming and fluency abilities), as well as striking dysorthographia. Speech dyspraxia was also present in 11 of the *SYN1*_{Q555X} carriers, ranging from mild articulation deficits to moderate difficulties in combining phonemes, resulting in reduced speech intelligibility. Overall, six males (100%) and seven females (64%) carrying the *SYN1*_{Q555X} mutation

exhibit significant speech or language disorder. Interestingly, language impairment appeared more severe in affected males, who showed deficits across many aspects of language, including impaired oral comprehension, as well as abnormalities in the structure of sentences and discourse. The profile of language performance in these males (n=5), as well as in an affected female (n=1), was compatible with the diagnosis of specific language impairment (Table IV, page 34). In addition, all affected males (n=6) exhibit pragmatic language impairments, and a diagnosis of pervasive developmental disorder was confirmed in two of them (33%). We hypothesized that the *SYNI*_{Q555X} mutation is associated with a variable degree of expression of language impairment: less affected individuals exhibiting dyslexia and speech dyspraxia, while the most severely affected individuals may have specific language impairment and autism-spectrum disorder. Based on this broader definition of the phenotype, we revisited the linkage study, and found a LOD score of 3,84 for the *SYNI*_{Q555X} mutation. We have also screened 96 well characterized males with familial dyslexia for mutation in *SYNI*, but no additional mutation was found.

Synapsins are a family of neuron-specific proteins that associate with both synaptic vesicles and the actin cytoskeleton. These proteins are mainly involved in the regulation of sustained neurotransmitter release ⁴⁶. Synapsins have also been implicated in neuronal development, synaptogenesis, and maintenance of mature synapses ⁵⁷. Among synapsins, *SYNI* is the most abundant, and is highly expressed in the limbic system and neocortex. Two phosphorylation sites for ca⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) reside in domain D of the protein (figure 4e, page 32). Inactivation of these CaMKII sites has been shown to impair the binding of *SYNI* with both actin and synaptic vesicles ⁵⁸. In addition, COOH-terminal regions of *SYNI* bind to Src homology 3 domains (SH3) ⁵⁹, and Rab3 proteins ⁶⁰, which are believed to play an important role in the activity-dependent regulation synaptic vesicle recycling. Truncation of *SYNI* caused by the Q555X mutation is thus predicted to lead to dramatic changes in the binding properties of *SYNI*, which could impair neurotransmission.

We investigated whether the Q555X mutation alters the functional properties of *SYN1* by using zebrafish (*Danio rerio*), a well characterized model for the study of neurophysiological development⁵⁶. In contrast to *SYN1* knock-out in mice, in which mild changes in neurotransmitter release have been reported³⁹, we found that knocking-down of *SYN1* with a targeted antisense morpholino oligonucleotide (AMO) in *Danio rerio* caused a dramatic behavioural phenotype. In 71% (n = 32 of 47) of *SYN1* AMO injected fish, disruption of touch-induced swimming behaviour was observed (figure 5c, page 33). Recordings of spinal motoneurons revealed that *SYN1* AMO injected fish received a transient sensory-evoked response but this failed to generate a sustained, rhythmic synaptic drive seen in wild type motoneurons following touch (n= 8 of 8, figure 5d, page 33). In contrast, fish that were injected with a control mismatch AMO (n = 27 of 27, not shown) had wild type patterns of swimming behaviour. Coinjection of wild-type human *SYN1a* mRNA with the *SYN1* AMO significantly reduced the number of fish that displayed a strong disruption of swimming behaviour to 44% (n = 28 of 63, figure 5e, page 33) and whole cell recording revealed a restoration of sustained synaptically driven activity in these fish (n = 5 of 5, figure 5f, page 33). In contrast, only 20% (n = 14 of 71) of fish coinjected with human *SYN1*_{Q555X} RNA and *SYN1* AMO generated swimming in response to touch (figure 5g, page 33) and the majority of recorded motoneurons of these fish (n = 5 of 6) showed a transient sensory-mediated response but this failed to generate sustained synaptic activity (figure 5h, page 33). These results are compatible with a loss of function of the *SYN1*_{Q555X} mutation, which is predicted to impair synaptic transmission within the central nervous system.

Impaired synaptic transmission, particularly in mice with disrupted *SYN1*, has been previously associated with epilepsy³⁹. The identification and functional characterization of the *SYN1*_{Q555X} mutation found in the AB family confirms that impaired *SYN1* can also lead to epilepsy in Humans³⁶. More importantly, the most robust phenotype found in the AB family was dyslexia in females, and global language impairment in males, suggesting that the proper development of the speech areas may be particularly sensitive to disruption of synaptic transmission. The fact that we did not find mutations in *SYN1* in additional families does not invalidate this finding. This most probably reflects the

fact that a majority of dyslexic families exhibit complex inheritance pattern²³, whereas *SYNI* may predispose toward a rare form of dyslexia, with Mendelian inheritance. Furthermore, we sequenced males with only a language disorder, while males in the AB family have a more severe phenotype.

4.7 Discussion

The identification of the *SYNI*_{Q555X} mutation is reminiscent of the recent identification of mutations in *FOXP2* in individuals with speech dyspraxia, a developmental disorder characterized by severe articulation difficulties⁶¹. As for the AB family described here, mutation in *FOXP2* has been originally described in a unique but large kindred, KE, in which speech dyspraxia was segregating as an autosomal dominant trait²¹. A significant proportion of *SYNI*_{Q555X} carriers from the AB family also present speech dyspraxia. However, in contrast to individuals with mutations in *FOXP2* who exhibit deficits almost exclusively in the motor component of language – a disorder of speech – almost all affected individuals from the AB family show striking deficits in core aspects of language, such as lexical (orthographic) and sub-lexical (phonological) processing routes. The *SYNI*_{Q555X} mutation is therefore the first example of a mutation that segregates with specific language disorders. The absence of non-verbal cognitive impairment or mental retardation in affected individuals highlights the language-specific nature of the *SYNI*_{Q555X} mutation induced phenotype. Finally, the fact that more severely affected individuals from the AB family also exhibit pervasive development disorder suggest a biological continuum between developmental dyslexia, specific language impairment, and autism-spectrum disorder, an observation that is consistent with familial aggregation studies^{62; 63}.

The evolutionary mechanisms by which genes eventually build the neuronal networks involved in high-order cognition, language and socialization are largely unknown. Alteration in the coding sequence of genes, potentially leading to an improvement in

protein function, has been invoked^{45; 64}. By comparing the sequence of Human *SYNI* with chimpanzee ortholog, we identified four nucleotide substitutions. None of these variations predict for an amino acid change (figure 6, page 35). Therefore, changes in the sequence of *SYNI* could not account for the evolution of sophisticated speech in Humans, compared to the primitive language abilities of chimpanzee. Modification in the level and pattern of expression of *SYNI* may be involved⁴⁵. Alternatively, *SYNI* may act in conjunction with other genes in order to allow proper development of speech areas. If reduced activity-dependent development underlies language disorders found in family AB, this might account for the lack of dominant hemispheric growth of the dyslexic brain. Indeed, individuals with either dyslexia or autism lack the normal asymmetry of the planum temporale^{24; 65}, a key component of the receptive language within the left hemisphere. Interestingly, the asymmetries of language-related areas of the human brain, for speech production (Broca's area) and receptive language (planum temporale), are also present in chimpanzee^{66; 67}, suggesting that the neural substrate necessary for the development of language is not unique to hominid evolution.

4.8 Conclusion

In conclusion, we have identified a mutation leading to truncation of the pre-synaptic protein *SYNI* in a large family segregating dyslexia and language disorder. Interestingly, mutations in two isoforms of neuroligin (*NLG3*, *NLG4*), have been recently found in families with autism⁶⁸. These genes encode cell-adhesion proteins present at the post-synaptic side of the synapse. Impaired synaptic transmission may thus be a common mechanism underlying dyslexia and autism, which is a more severe and disabling neurodevelopmental disorder. Elucidating the role of synapsin in dyslexia may provide useful clues toward the understanding of the development of core aspects of language in Humans.

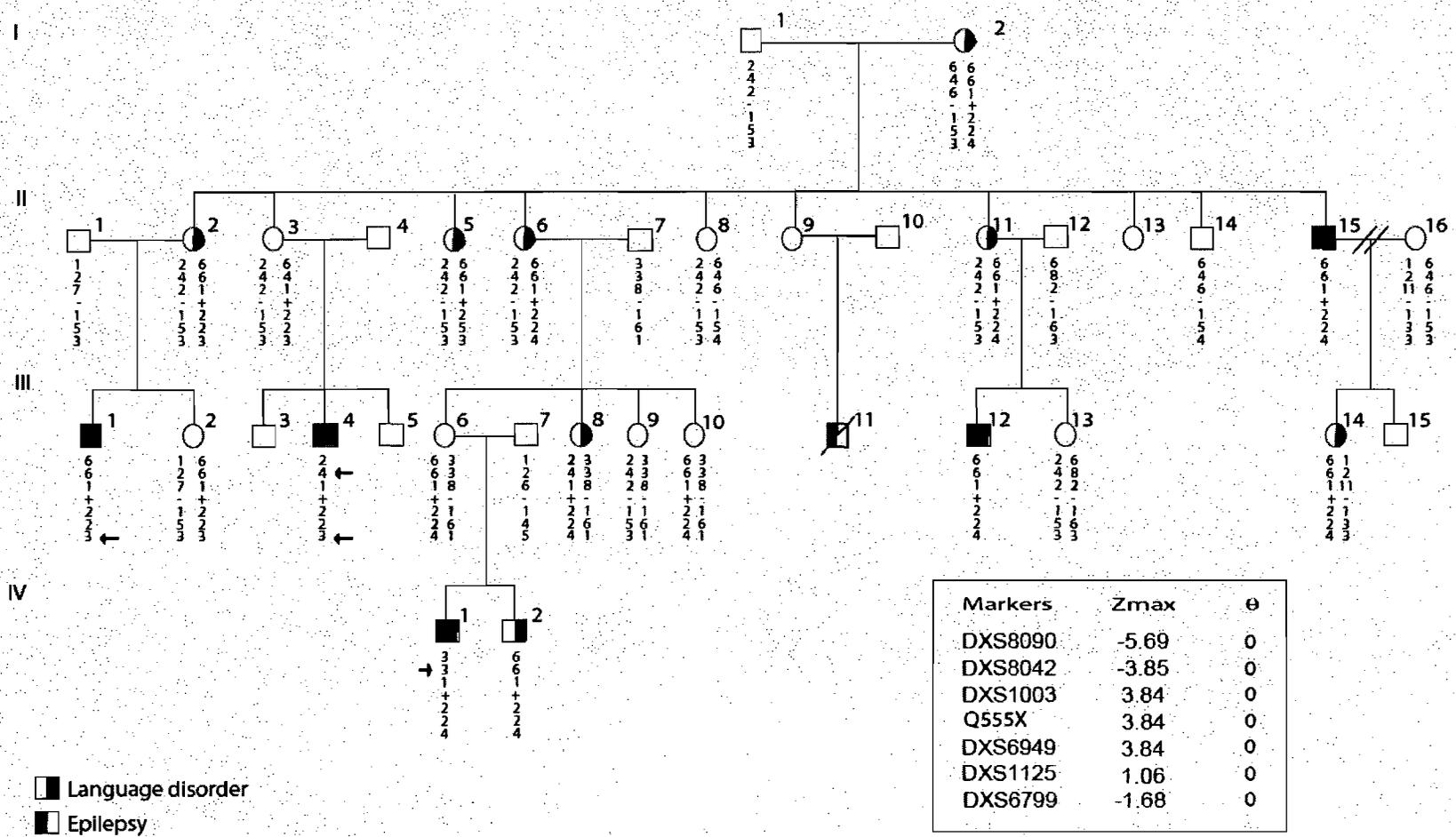


Figure 3: A large French-Canadian family with X-linked dyslexia.

Alleles were numbered according to their respective size corresponding to the CEPH genotyping database. The maximum lod scores obtained with these markers and for the Q555X mutation (+) are shown in the lower right. Key recombinants are indicated by arrows

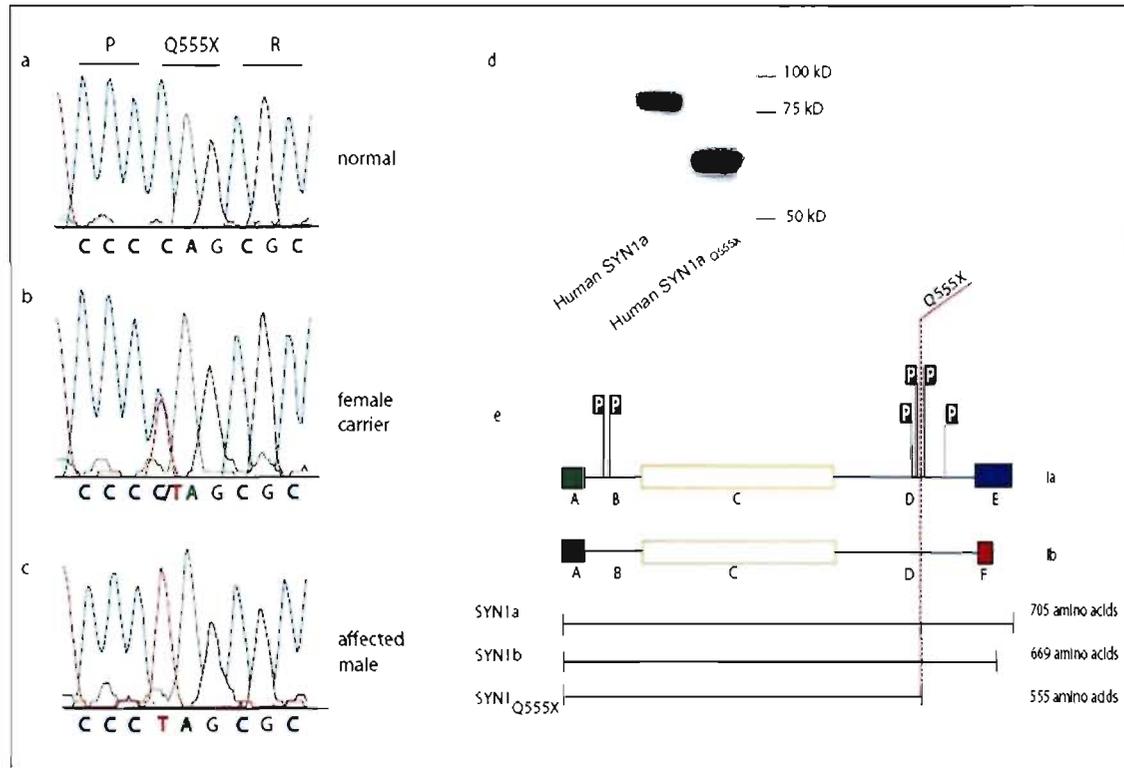


Figure 4: The Q555X mutation in *SYN1*

Sequence analysis from a normal control (a), female carrier (b), and affected male (c). The female and male carriers are respectively heterozygous and hemizygous for a C → T substitution, which results in a stop codon (TAG) in amino acid 555 of the predicted protein (Q555X). d, Immunoblot analysis shows that the Q555X mutation leads to truncated *SYN1*. e, Functional domains and phosphorylation sites of *SYN1*

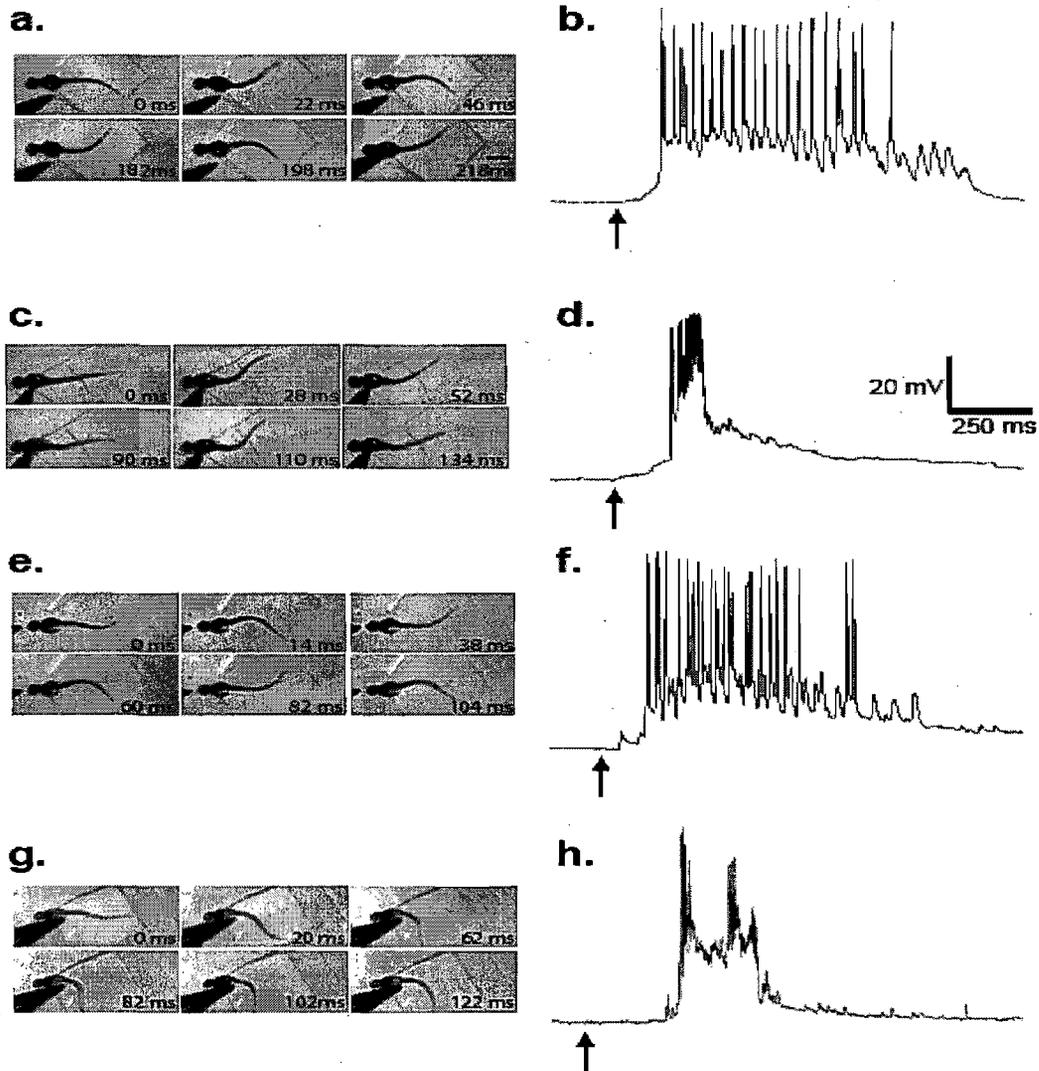


Figure 5: Disruption of *SYN1* induces motor phenotypes in *Danio rerio*

a. Selected frames showing rhythmically alternating flexions of the trunk during touch-evoked swimming in wild type zebrafish at 2 days in development. Swimming was elicited by touching the trunk with a pair of fine forceps (seen in the bottom left corner). b. Rhythmic synaptic drive in a motoneuron of a 2 day wild type fish following touch (arrow). c. Touch does not elicit rhythmic trunk flexions in *SYN1* AMO injected fish at 2 days. d. Absence of touch-evoked (arrowed) sustained, rhythmic synaptic drive in *SYN1* AMO injected fish at 2 days. e. Sustained, rhythmic swimming activity in a 2 day fish coinjected wild type *SYN1* mRNA and *SYN1* AMO. f. Sustained, rhythmic synaptic activity in motoneuron of a 2 day fish coinjected with *SYN1* AMO and *SYN1* mRNA. g. Touch does not elicit rhythmic trunk flexions in 2 day fish coinjected with *SYN1*_{Q555X} mRNA and *SYN1* AMO. h. Absence of sustained, rhythmic synaptic drive in a motoneuron following touch (arrowed) in 2 day fish coinjected with *SYN1*_{Q555X} mRNA and *SYN1* AMO. Scale bar in a,c,e,g = 250 μ m.

Table IV: Evaluation of language abilities in family AB.

All individuals carrying the Q555X mutation in *SYN1* underwent neuropsychological evaluation and detailed assessment of oral and written language. Compared to age-peers, eight individuals with normal IQ and reading performance below the equivalent of two school years were considered to be dyslexic. In four additional individuals, impaired language abilities and reading performance were compatible with developmental dyslexia, but either young age (†) or inadequate educational opportunity (‡) preclude a definite diagnosis. Language impairment was more severe in five males (individuals II-15, III-01, III-11, IV-01 and IV-02) and one female (III-13), who showed receptive and expressive language deficits compatible with a diagnosis of specific language impairment (SLI). By definition, SLI may not be diagnosed in children with pervasive developmental disorder (PDD). However, the pattern of language deficits was qualitatively similar in individuals IV-01 and IV-02 (*), suggesting a biological continuum between dyslexia, SLI, and autism-spectrum disorder. This observation is consistent with previous studies of language impairment in individuals with autism⁶⁹, as well as familial aggregation studies^{62, 63}.

ID	Gender	Reading-Spelling impairments	Oral comprehension and expression impairments	Pragmatic difficulties	Specific developmental disorder
I-02	F	yes	no	no	dyslexia [‡]
II-02	F	yes	no	no	dyslexia
II-03	F	no	no	no	-
II-05	F	yes	no	no	dyslexia
II-06	F	yes	no	yes	dyslexia
II-11	F	yes	no	no	dyslexia
III-02	F	no	no	no	-
III-06	F	no	no	no	-
III-08	F	yes	no	no	dyslexia
III-09	F	no	no	no	-
III-14	F	yes	yes	no	dyslexia
II-15	M	yes	yes	yes	SLI
III-01	M	yes	yes	yes	SLI
III-04	M	no	no	yes	-
III-12	M	yes	yes	yes	SLI
IV-01	M	yes	yes	yes	PDD*
IV-02	M	yes	yes	yes	PDD*

Figure 6: Sequence alignment of Human and chimpanzee *SYN1*.
 Only four nucleotidic changes (*) were found between human and chimpanzee.
 All of these changes are synonymous.

Homo sapiens	ATGAACTACCTGCGGCGCCGCTGTCGGACAGCAACTTTATGGCCAATCTGCCAAATGGG	60
Pan troglodytes	ATGAACTACCTGCGGCGCCGCTGTCGGACAGCAACTTTATGGCCAATCTGCCAAATGGG	60
	Pro	
Homo sapiens	TACATGACAGACCTGCAGCGTCCGCAGCCGCCCCACCGCCGCCCCGGTGCACACAGCCCC	120
Pan troglodytes	TACATGACAGACCTGCAGCGTCCGCAGCCGCCCCGCGCCGCCCCGGTGCACACAGCCCC	120
	*	
Homo sapiens	GGAGCCACGCCCGGTCCCAGGACCGCCACTGCCGAGAGGTCTCCGGGGTCCGCCAGCG	180
Pan troglodytes	GGAGCCACGCCCGGTCCCAGGACCGCCACTGCCGAGAGGTCTCCGGGGTCCGCCAGCG	180
Homo sapiens	GCCTCTCCGGCCGCCCTAGCCCCGGGTCTCGGGGGGCGGTGGCTTCTTCTCGTCGCTG	240
Pan troglodytes	GCCTCTCCGGCCGCCCTAGCCCCGGGTCTCGGGGGGCGGTGGCTTCTTCTCGTCGCTG	240
	Ala	
Homo sapiens	TCCAACGCGGTCAAGCAGAC CACGGCGCGGCAGCTGCCA CCTTCAGCGAGCAGGTGGGC	300
Pan troglodytes	TCCAACGCGGTCAAGCAGAC CACGGCGGCAGCTGCCA CCTTCAGCGAGCAGGTGGGC	300
	*	
Homo sapiens	GGCGGCTCTGGGGGCGCAGG CCGCGGGGGAGCCGCCTCCAGGGTGCTGCTGGTCA TCGAC	360
Pan troglodytes	GGCGGCTCTGGGGGCGCAGG CCGCGGGGGAGCCGCCTCCAGGGTGCTGCTGGTCA TCGAC	360
Homo sapiens	GAGCCGCACACCGACTGGGC AAAATACTTCAAAGGGAAAAAGATC CATGGAGAAA TTGAC	420
Pan troglodytes	GAGCCGCACACCGACTGGGC AAAATACTTCAAAGGGAAAAAGATC CATGGAGAAA TTGAC	420
Homo sapiens	ATTAAAGTAGAACAGGCCGAATTCTCTGATCTCAA CCTTG TGGCC CATGCCAATGGTGA	480
Pan troglodytes	ATTAAAGTAGAACAGGCCGAATTCTCTGATCTCAA CCTTG TGGCC CATGCCAATGGTGA	480
	Asn	
Homo sapiens	TTCTCTGTGGATATGGAAGTCTTCGGAATGGGGTGAAGGTCGTGCGGTCTCTGAAGCCG	540
Pan troglodytes	TTCTCTGTGGATATGGAAGTCTTCGGAATGGGGTGAAGGTCGTGCGGTCTCTGAAGCCG	540
	*	
Homo sapiens	GATTTGTGCTGATCCGCCAGCAGCCTTCAGCATGGCACGCAACGGAGACTACCGCAGT	600
Pan troglodytes	GATTTGTGCTGATCCGCCAGCAGCCTTCAGCATGGCACGCAACGGAGACTACCGCAGT	600
Homo sapiens	TTGGTCATTGGGCTGCAGTA TGCTGGAATCCCAGTGTTAACTCCTTGCAATTCTGTCTAC	660
Pan troglodytes	TTGGTCATTGGGCTGCAGTA TGCTGGAATCCCAGTGTTAACTCCTTGCAATTCTGTCTAC	660
Homo sapiens	AACTTCTGTGACAAGCCCTGGGTGTTTGCC CAGATGGTTCGACTGCATAAGAACTGGGG	720
Pan troglodytes	AACTTCTGTGACAAGCCCTGGGTGTTTGCC CAGATGGTTCGACTGCATAAGAACTGGGG	720
Homo sapiens	ACAGAAGAATCCCTCTAATTGATCAGACCTTCTA CCCAATCAC AAAGAAATGCTCAGC	780
Pan troglodytes	ACAGAAGAATCCCTCTAATTGATCAGACCTTCTA CCCAATCAC AAAGAAATGCTCAGC	780
Homo sapiens	AGTACAACGTA CCCCCTGGTGTGTAAGATGGGGCAGCACACTCTGGGATGGGCAAGGTC	840
Pan troglodytes	AGTACAACGTA CCCCCTGGTGTGTAAGATGGGGCAGCACACTCTGGGATGGGCAAGGTC	840
Homo sapiens	AAGGTTGACAAACAGCATGACTTCCAGGACATCGCAAGTGTGCGTGGCACTGACCAAGACG	900
Pan troglodytes	AAGGTTGACAAACAGCATGACTTCCAGGACATCGCAAGTGTGCGTGGCACTGACCAAGACG	900
Homo sapiens	TATGCCACTGCCGAGCCCTTCATCGATGCCAAATATGACGTGCGTGTCCAGAAGATTGGG	960
Pan troglodytes	TATGCCACTGCCGAGCCCTTCATCGATGCCAAATATGACGTGCGTGTCCAGAAGATTGGG	960

Homo sapiens CAGAACTACAAGGCCTACATGAGGACGTCACTGTGTCAGGGAAGCTGGAAGACCAATACTGGC 1020
Pan troglodytes CAGAACTACAAGGCCTACATGAGGACGTCACTGTGTCAGGGAAGCTGGAAGACCAATACTGGC 1020

Homo sapiens TCTGCGATGCTGGAGCAAATGCGCATGTCTGACAGATACAAGCTGTGGGTGGACACGTGC 1080
Pan troglodytes TCTGCGATGCTGGAGCAAATGCGCATGTCTGACAGATACAAGCTGTGGGTGGACACGTGC 1080

Homo sapiens TCAGAGATTTTGGGGGACTGGACATCTGCGCAGTGAAGCGCTACATGGCAAGGACGGA 1140
Pan troglodytes TCAGAGATTTTGGGGGACTGGACATCTGCGCAGTGAAGCGCTACATGGCAAGGACGGA 1140

Homo sapiens AGGGATCACATCATTGAGGTGGTGGGTTCCATGCCGCTCATTGGTGAACACCAGGAT 1200
Pan troglodytes AGGGATCACATCATTGAGGTGGTGGGTTCCATGCCGCTCATTGGTGAACACCAGGAT 1200

Homo sapiens GAAGACAAACAGCTCATCGTAGAGCTCGTGGTCAA CAAGATGGCTCAGGCCTGCCTCCG 1260
Pan troglodytes GAAGACAAACAGCTCATCGTAGAGCTCGTGGTCAA CAAGATGGCTCAGGCCTGCCTCCG 1260

Homo sapiens CAGCGACAGCGGGATGCTCCCTGGCAGGGGCTCCATGGCCAGACTCCGTCCCAGGG 1320
Pan troglodytes CAGCGACAGCGGGATGCTCCCTGGCAGGGGCTCCATGGCCAGACTCCGTCCCAGGG 1320

Homo sapiens GCCCTGCCCTTGGGCGCCAGACCTCCAGCAGCCCGCAGGGCCCCGGCTCAGCAGCGA 1380
Pan troglodytes GCCCTGCCCTTGGGCGCCAGACCTCCAGCAGCCCGCAGGGCCCCGGCTCAGCAGCGA 1380

Homo sapiens CCCCCACCACAGGGCGGCCCTCCACAGCCGGTCCAGGCCCCAGCGCCAGGGACCCCCA 1440
Pan troglodytes CCCCCACCACAGGGCGGCCCTCCACAGCCGGTCCAGGCCCCAGCGCCAGGGACCCCCA 1440

Pro

Homo sapiens TTGCAGCAGCGCCCGCCCCGCGAGGGCCAGCAGCACCTTT CAGGCCTTGGACCCCAGCT 1500
Pan troglodytes TTGCAGCAGCGCCCGCCCCGCGAGGGCCAGCAGCACCTTT CAGGCCTTGGACCCCAGCT 1500

*

Homo sapiens GGCAGCCCCCTGCCAGCGCCTTCCAAGTCCCACCTCAGCGCCCAGCAGCCCGCTCC 1560
Pan troglodytes GGCAGCCCCCTGCCAGCGCCTTCCAAGTCCCACCTCAGCGCCCAGCAGCCCGCTCC 1560

Homo sapiens CAGGCCGCGCCGCGACCCAGGGTCAAGGCGCCAATCCCGGCCAGTGGCGGGAGGCC 1620
Pan troglodytes CAGGCCGCGCCGCGACCCAGGGTCAAGGCGCCAATCCCGGCCAGTGGCGGGAGGCC 1620

Homo sapiens GGGGCGCTCCAGCAGCCCGCCCGCCGCTCTCCGTCTCCCAGCGCCAGGGGGGCC 1680
Pan troglodytes GGGGCGCTCCAGCAGCCCGCCCGCCGCTCTCCGTCTCCCAGCGCCAGGGGGGCC 1680

Homo sapiens CCACAGGCTACCGTCAGACATCCGTCTCTGGCCGGCTCGCCAAAGGCCTCTGGGGCC 1740
Pan troglodytes CCACAGGCTACCGTCAGACATCCGTCTCTGGCCGGCTCGCCAAAGGCCTCTGGGGCC 1740

Homo sapiens CCACCGGGCGGGCAGCAGCGCCAGGGCCCCCCCCAGAAACCCCCAGGCCAGCCGCCCC 1800
Pan troglodytes CCACCGGGCGGGCAGCAGCGCCAGGGCCCCCCCCAGAAACCCCCAGGCCAGCCGCCCC 1800

Homo sapiens ACACGCAGGCAGCAGGGGGTCCCGTCCCCGCACTGGGCCACCCACACGCAGCAG 1860
Pan troglodytes ACACGCAGGCAGCAGGGGGTCCCGTCCCCGCACTGGGCCACCCACACGCAGCAG 1860

Homo sapiens CCTCGGCCCAGCGCCGGGCCCCGCTGGACGTCCCAAACACAGCTGGCCAGAAACCC 1920
Pan troglodytes CCTCGGCCCAGCGCCGGGCCCCGCTGGACGTCCCAAACACAGCTGGCCAGAAACCC 1920

Homo sapiens AGCCAGGACGTGCCGCCACCGCCACCGCCGCTGCAGGGGGACCTCCGCACCCCAGCTC 1980
Pan troglodytes AGCCAGGACGTGCCGCCACCGCCACCGCCGCTGCAGGGGGACCTCCGCACCCCAGCTC 1980

Homo sapiens AACAAATCCCAGTCTCTGACCAATGCCTTCAACCTTCCAGAGCCAGCCCCGCCAGGCC 2040
Pan troglodytes AACAAATCCCAGTCTCTGACCAATGCCTTCAACCTTCCAGAGCCAGCCCCGCCAGGCC 2040

Homo sapiens AGCCTTAGCCAGGACGAGGTGAAAGCTGAGACCATCCGCAGCCTGAGGAAGTCTTTCGCC 2100
Pan troglodytes AGCCTTAGCCAGGACGAGGTGAAAGCTGAGACCATCCGCAGCCTGAGGAAGTCTTTCGCC 2100

Homo sapiens AGCCTTTCTCCGACTGA 2118
Pan troglodytes AGCCTTTCTCCGACTGA 2118

Table V: Neuropsychological and language abilities assessment.

Domain	Test	Tasks
Neuropsychological assessment	Wechsler Adult Intelligence Scale®-Third Edition (WAIS®-III)	Picture completion, Block design, Similarities, Arithmetic, Information, Substitution, Digit span
	Wechsler Intelligence Scale for Children®-Fourth Edition (WISC®-IV)	Block design, Similarities, Digit Span, Picture concepts, Coding, Matrix reasoning, Letter-Number sequencing, Vocabulary, Comprehension, Symbol search
	Wechsler Memory Scale®-Third Edition (WMS®-III)	Mental control (Alphabet, Numbers, Days of the week)
	Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT)	15 words of Rey
	Letter A cancellation test	Visual selective attention
	Outil de dépistage des dyslexies-ODEDY (test of screening dyslexia)	Letter sequences discrimination, Dictation of regular and irregular words and pseudowords.
	NEuroPSYchological investigation for children®-NEPSY®	Phonological awareness (phonological processing abilities)
	Color-Word interference test from the Delis-Kaplan Executive Function System™ (D-KEFS™)	Color naming and word reading
	Culver form (for adults)	Right-Left discrimination
	Épreuve Verbale d'Aptitudes Cognitives-EVAC (Verbal test of cognitive aptitudes)	Right-Left discrimination
Oral language	Verbal fluency test	Letter fluency (P) and category fluency (animals)
	Test of word finding for adolescents and adults-TWF	Receptive and expressive vocabulary
	Boston Naming Test (30)	Oral denomination and written denomination
Written language	Clinical Evaluation Language Fundamentals-IV-CELF-4	Sentence comprehension, Expressive vocabulary, Sentence production
	LOBROT L3 (norms from BELEC)	Written sentence comprehension
Reading	Bébé d'Edmonton history	Written discourse comprehension
	Batterie d'évaluation du langage écrit et de ses troubles-BELEC: MIM A (Belgian battery of evaluation of the written language and its disorders)	Word and pseudoword reading, according to frequency, length and graphemes complexity
	Batterie d'évaluation du langage écrit et de ses troubles-BELEC: REGUL (Belgian battery of evaluation of the written language and its disorders)	Regular and irregular word reading
	Chapman-Cook Speed of Reading Test	Written comprehension and reading speed
	L'Alouette	Reading fluency

Writing	Batterie d'évaluation du langage écrit et de ses troubles-BELEC: ORTHO3 (Belgian battery of evaluation of the written language and its disorders)	Writing words
	Test de Rendement pour Francophones-TRF (french version of the Wide-Range Achievement Test-WRAT)	Orthography
	No specific protocol	Words and Sentences dictation
Pragmatic language	Clinical Evaluation Language Fundamentals-IV-CELF-4	Pragmatics profile questionnaire

ID	Gender	Age	Years of education	IQ/VIQ/PIQ	READING TESTS				SPELLING TESTS			
					Pseudo-words	Polysyllabic words	Complex graphemes	Comprehension	Contextual and constant spelling	Unfrequent irregular orthography	Morphologically based orthography	Non morphologically based orthography
II-02	F	44	14	97/97/95	**	**	**	**	**	**	**	**
II-03	F	56	12	96/99/93	**	**	**	NA	NA	NA	NA	NA
II-05	F	53	8	87/77/100	**	**	**	**	**	*	**	**
II-06	F	54	12	89/95/83	**	**	**	**	**	0	**	0
II-11	F	46	12	91/91/92	**	**	**	*	**	*	**	**
III-02	F	14	8	105/102/109	**	**	**	**	**	**	**	**
III-06	F	31	12	95/93/97	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA
III-08	F	22	15	100/98/104	**	**	**	**	NA	NA	NA	NA
III-10	F	28	13	98/91/109	**	**	**	NA	NA	NA	NA	NA
III-14	F	7	1	91/73/111	**	**	**	NA	**	**	**	**
II-15	M	41	9	78/79/80	**	**	**	**	**	**	**	**
III-01	M	20	8	78/83/76	**	**	**	**	**	**	**	**
III-04	M	30	15	104/122/84	0	**	**	NA	NA	NA	NA	NA
III-12	M	22	9	78/82/78	**	**	**	**	NA	NA	NA	NA
IV-01	M	8	1	51/45/72	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IV-02	M	6	Preschool	65/71/70	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Table VI. Summary of neuropsychological and language ability profiles found in individuals carrying the *SYN1*_{Q555X} mutation. Scores of reading and spelling tests were obtained from the BELEC battery, except for reading comprehension, which were obtained from Lobrot test. Results from reading and spelling tests are presented using z point comparison to mean control group: '0' $z \geq -1.0$; * $-2.0 \leq z < -1.0$; ** $z < -2.0$. For children, we used control values available from the BELEC battery. For adult, comparison was made by using our own control group of 20 healthy individuals from the Quebec population, matched for age and years of education. Abbreviations used: F, female; M, male; NA, not available

ID	Gender	Age	Age of onset	Febrile seizures	Spontaneous seizures	Reflex seizures	Trigger	ii-EEG	i-EEG	MRI	Ictal SPECT
II-02	F	44	-	no	no	no	-	-	-	-	-
II-03	F	56	3	yes	no	no	-	NA	NA	normal	NA
II-05	F	53	-	no	no	no	-	-	-	-	-
II-06	F	54	-	no	no	no	-	-	-	-	-
II-11	F	46	-	no	no	no	-	-	-	-	-
III-02	F	14	-	no	no	no	-	-	-	-	-
III-06	F	31	-	no	no	no	-	-	-	-	-
III-08	F	22	NA	yes	no	no	-	NA	NA	normal	NA
III-10	F	28	-	no	no	no	-	-	-	-	-
III-14	F	7	-	no	no	no	-	-	-	-	-
II-15	M	41	1	yes	CPS	CPS, GTCS	shower, wet towel	normal	right temporal	right HA	right temporal
III-01	M	20	4	no	CPS	CPS, GTCS	bath, shower	normal	NA	normal	NA
III-04	M	30	13	no	CPS, GTCS	no	-	normal	diffuse	normal	NA
III-12	M	22	14	no	CPS	CPS, GTCS	bath, shower	normal	NA	NA	NA
IV-01	M	8	4	no	CPS	CPS	bath, shower	normal	diffuse	left HA	left temporal
IV-02	M	6	-	no	no	no	-	-	-	-	-

Table VII: Summary of epilepsy phenotype found in individuals carrying the *SYN1*_{Q555X} mutation. Complex partial seizures (CPS) in affected individuals were characterized by chilling aura, alteration of consciousness with either fixed gaze or ocular revulsion, oral and manual automatisms, hypotonia, and cyanosis. These complex partial seizures may infrequently be prolonged by secondary generalized tonic-clonic seizures (GTCS) in affected individuals. Other abbreviations: iiEEG, interictal electroencephalogram; iEEG ictal electroencephalogram; MRI, magnetic resonance imaging of the brain; SPECT, single-photon emission computerized tomography of the brain; HA, hippocampal atrophy; F, female; M, male; NA, not available.

CHAPITRE 2 : Identification de mutations dans les gènes de la famille des synapsines chez des individus autisme ou épilepsie

PRÉFACE

Tel que présenté dans le chapitre précédent, nous avons identifié une mutation non-sens dans *SYN1* (Q555X) dans une grande famille canadienne-française associée à la dyslexie chez les femmes ainsi qu'à l'épilepsie et des anomalies spécifiques du langage ou l'autisme chez les hommes. Garcia et ses collègues ³⁶ ont également identifié une mutation dans *SYN1* (W356X) chez une famille avec phénotypes variés. Les troubles d'apprentissage qui incluent les troubles du langage, la dyslexie et l'autisme sont des co-morbidités connues sur le plan clinique ¹⁹⁻²² et plusieurs études d'agrégation familiale ^{63; 70; 71} suggèrent une étiologie commune à certaines de ces conditions. En particulier, les études d'agrégation familiale révèlent que des problèmes spécifiques de langage sont présents chez les parents proches des individus autistes ^{63; 70-73}. Cette observation a même mené à la création du terme « broader autism phenotype » ⁷⁴. Basés sur cette littérature, ainsi que sur les données présentées dans le chapitre 1 de ce mémoire, nous avons voulu vérifier si des mutations additionnelles dans *SYN1* pouvaient être associées à différentes maladies neurodéveloppementales telles que l'épilepsie, l'autisme et la dyslexie. Également, étant donné la grande homologie de fonction et de structure au sein de la famille des synapsines, nous avons criblé les gènes *SYN2* et *SYN3* dans des cohortes d'individus avec ces mêmes maladies. La confirmation de l'une ou l'autre de ces hypothèses pourrait suggérer qu'il existe une base biologique commune à toutes ces conditions.

1. Introduction

1.1 L'autisme

1.1.1 Historique

Le terme « autisme » a été utilisé pour la première fois en 1911 par le psychiatre suisse Eugen Bleuler⁷⁵ pour désigner la perte de contact avec la réalité observée chez ses patients schizophrènes. En 1943, suite à l'observation comportementale de 11 enfants, Léo Kanner⁷⁶ a introduit le terme « d'autisme infantile précoce » caractérisé selon lui par une incapacité de l'enfant à établir des contacts affectifs avec son environnement. Enfin, Hans Asperger⁷⁷ publia en 1944, une description d'un groupe de quatre enfants présentant ce qu'il appela à l'époque "une psychopathologie autistique". Un certain nombre d'éléments du fonctionnement de ces enfants ressemblaient à ceux du groupe de Kanner. Cependant, deux éléments différaient: alors que les enfants du groupe de Kanner avaient un langage très réduit, tous ceux du groupe d'Asperger s'exprimaient bien tout en étant plus maladroits sur le plan de la motricité globale. Ce n'est que beaucoup plus tard que le terme « syndrome d'Asperger » fut employé par Lorna Wing en 1981⁷⁸. Celle-ci suggéra alors que le trouble décrit par Asperger pourrait constituer une variante du trouble décrit par Kanner. Depuis 1994, le syndrome d'Asperger est reconnu comme une entité à part entière par le *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*¹².

1.1.2 Phénotype et épidémiologie

L'autisme est un désordre neurodéveloppemental qui se manifeste dès les premières années de la vie et qui est caractérisé par des déficits au niveau des interactions sociales, de la communication et des comportements (répétitifs et stéréotypés). La prévalence est de 3/1000⁷⁹ et les garçons sont atteints 4 fois plus fréquemment que les filles.

Selon le DSM-IV, l'autisme ou trouble autistique est classifié sous l'appellation *trouble envahissant du développement* (TED). Les TED constitueraient un continuum regroupant cinq conditions différentes, dont la gravité des symptômes ou des déficiences varie (figure 7) et qui sont :

1. Trouble autistique
2. Syndrome de Rett
3. Syndrome désintégratif de l'enfant
4. Syndrome d'Asperger
5. Trouble envahissant du développement non spécifié

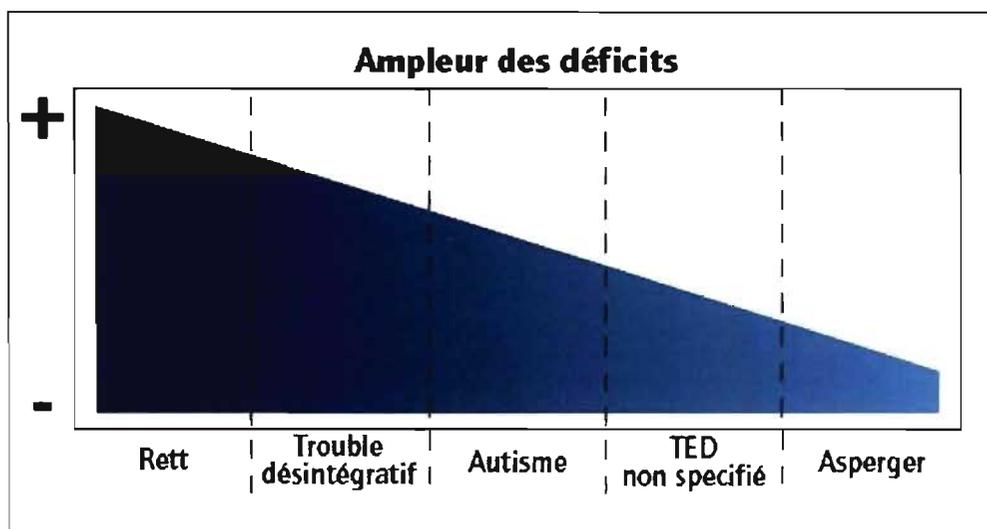


Figure 7 : Continuum des troubles du spectre de l'autisme

Tirée de Tremblay G. 2007⁸⁰.

Habituellement, les personnes vivant avec un TED éprouvent une difficulté globale en ce qui a trait aux interactions sociales. Ils ont notamment de la difficulté à établir des contacts avec les autres, ont tendance à l'isolement et ont un regard fuyant. Au plan de la communication, un délai dans la compréhension et la production du message est perceptible, ainsi que la présence d'anomalies au niveau du langage (écholalie et absence du langage). Des lacunes sont également apparentes au niveau de la communication non verbale (mimique). Quant aux difficultés comportementales, il n'est pas rare d'observer des individus hyperactifs. Les maniérismes moteurs stéréotypés et répétitifs sont également très fréquents. Finalement, des anomalies au niveau des intérêts sont présentes. Ceux-ci sont considérés comme étant restreints et obsessionnels comme par exemple une fascination pour les objets qui tournent ou qui émettent des spectres lumineux. Il semble qu'un dépistage précoce suivi d'une intervention éducative permet à l'enfant atteint d'un TED de progresser et diminue les risques d'aggravation.

Le diagnostic d'un TED doit être posé sur la base des classifications internationales dont les critères descriptifs sont énumérés dans le DSM-IV de l'Association américaine de psychiatrie ¹². À cette fin, plusieurs tests et questionnaires sont utilisés, notamment ADI-R ⁸¹ et ADOS ⁸².

1.1.3 Étiologie

Les causes de l'autisme demeurent largement indéterminées. Parmi les causes possibles, les facteurs génétiques, neurobiologiques, environnementaux, ainsi que les infections virales et les réactions du système immunitaire ont été invoqués. Une revue des données neurobiologiques et génétiques est présentée ici.

1.1.3.1 Facteurs neurobiologiques

Les premières observations faisant état d'une possible cause neurobiologique sont celles de Kanner ⁷⁶ qui remarqua la présence d'une macrocéphalie chez quelques sujets autistes. Cette observation fut répliquée dans plusieurs études si bien que la macrocéphalie est présente chez environ 20% des enfants autistes ⁸³. De plus, en comparaison avec celui des enfants normaux, le cerveau des autistes est généralement plus petit à la naissance. Ces données suggèrent donc une croissance cérébrale exagérée entre l'âge de 6 et 14 mois, qui résulterait en un cerveau plus gros que la normale et ce jusqu'à l'adolescence ⁸⁴. Malgré ces observations, la cause biologique de cette différence n'est toujours pas connue et pourrait être liée à une augmentation de la neurogénèse, à une gliogénèse accrue, à une augmentation de la synaptogénèse, à un problème de migration neuronale, à une diminution de l'apoptose ou à une combinaison de ces processus ⁸³.

D'autres anomalies ont été rapportées à la suite d'études neuro-anatomiques sur des cerveaux de patients autistes, les plus communes étant: une densité cellulaire accrue et une réduction de la taille des neurones du système limbique (hippocampe, amygdale) en plus d'une diminution du nombre de cellules de Purkinje dans le cervelet et d'une arborisation dendritique moins importante ⁸³ (figure 8, page 47). De plus, des dysgénésies corticales et des défauts de migration neuronale ont été observés chez des individus autistes ⁸³. Finalement, le cerveau des autistes tout comme celui des dyslexiques montre une absence d'asymétrie du planum temporale, une région clé impliquée dans le langage ²⁴.

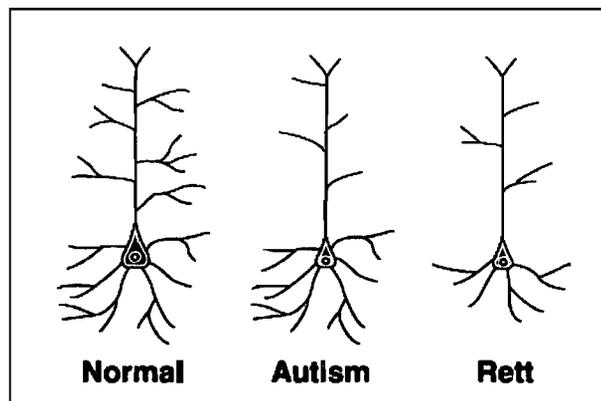


Figure 8 : Représentation schématique des neurones pyramidaux de différents cerveaux

Tirée de Zoghbi HY. 2003 ⁸⁵.

1.1.3.2 Facteurs génétiques

Les études de jumeaux réalisés chez les autistes suggèrent une forte composante génétique ⁸⁶. Ainsi, il est rapporté que l'autisme a une héritabilité de 90% ⁸⁷. Le taux de concordance varie selon les études entre 60 à 92% pour les MZ et de 0 à 10% pour les DZ ⁸⁸. Également, le risque relatif de l'autisme est 45 fois plus élevé chez les individus nés de parents consanguins au premier degré en comparaison avec la population générale ⁸⁹. Il semble que la variance dans les taux de concordance est attribuable au phénotype étudié. En effet, certaines études considèrent les troubles cognitifs ou les troubles sociaux chez les jumeaux d'autistes. Il faut alors parler d'endophénotype ou de «broader autism phenotype» en anglais. Sur le plan clinique, ce phénotype est caractérisé par les mêmes critères que ceux de l'autisme mais avec une sévérité plus faible comme par exemple, la réticence sociale, des difficultés de communication, un retard de langage, une préférence pour la routine et une résistance

au changement. La reconnaissance de cet endophénotype pourrait faciliter les études de liaison, puisqu'on trouve des cas multiples d'autisme dans seulement 5% des familles ⁹⁰. Sommairement, l'autisme présente un patron d'hérédité complexe, vraisemblablement polygénique. Enfin, un des arguments en faveur d'une hétérogénéité est la présence de traits autistiques dans plusieurs autres maladies génétiques, notamment la neurofibromatose ⁹¹, le syndrome du X fragile ⁹², l'épilepsie ⁹³, le retard mental ⁹⁴ et la sclérose tubéreuse ⁹⁵.

Même si plusieurs données suggèrent l'implication de facteurs génétiques dans l'autisme, ce n'est que tout récemment que des gènes de susceptibilité à la maladie ont été identifiés. Tout d'abord, de nombreux loci de susceptibilité ont été rapportés, pratiquement un sur tous les chromosomes ⁸⁸. Les plus répliqués étant localisés en 7q, 2q, 15q, 16p et Xq ⁹⁶. Également, un grand nombre d'études ont rapporté des taux élevés d'anomalies chromosomiques chez les autistes, notamment des duplications, délétions et translocations le plus souvent sur les chromosomes 2q, 7q, 15q et X ^{90; 97-101}. Enfin, des mutations dans au moins huit gènes différents ont été associées à l'autisme (tableau VIII, page suivante).

Bien que ces mutations n'expliquent qu'un faible nombre de cas, elles permettent néanmoins d'identifier un mécanisme moléculaire sous-jacent, ce qui peut faciliter la recherche de gènes candidats. Par exemple, des mutations dans les deux membres de la famille des neuroligines (*NLGN3* et *NLGN4*) ont été associées à l'autisme ⁶⁸, suggérant ainsi qu'un défaut dans la fonction synaptique pouvait prédisposer à la maladie. Cette hypothèse a par la suite été confirmée par la découverte de mutations dans d'autres gènes synaptiques tels *SHANK3* ¹⁰² et *NRXN1* ¹⁰³.

Plus récemment, des mutations dans le gène *RPL10* ont été identifiées chez des individus autistes. Ce gène code pour une protéine ribosomale constituant la sous-unité 60s ¹⁰⁴ et il pourrait avoir un impact sur la cinétique transcriptionnelle des composants de la surface cellulaire. Les mutations dans *RPL10* pourraient donc

mener à une perte d'arborisation des neurones pyramidaux, ce qui contribuerait à des problèmes de connexion entre les neurones^{103 105}.

Tableau VIII: Gènes dans lesquels une mutation a été identifiée chez au moins un patient autiste

Nom du gène	Syndrome	Type de mutation	Nombre de cas	Référence
<i>CACNA1H</i>	TA, CAE	Faux-sens	6	106
<i>NLGN3</i>	TA, SA	Faux-sens	2	68
<i>NLGN4</i>	TA, SA, RM	Faux-sens, del	7	68; 107
<i>NRXN1</i>	TA	Faux-sens, ins	7	103
<i>MECP2</i>	TA, SR	Faux-sens, non-sens, del, ins	12	108; 109
<i>SHANK3</i>	TA, SA	Faux-sens, del, dup	9	102
<i>RPL10</i>	TA + RM	Faux- sens	2	104

Légende

TA : trouble autistique, CAE : épilepsie de l'enfance avec absence, SA : syndrome Asperger, RM : retard mental, SR : syndrome de Rett, ins : insertion, del : délétion, dup : duplication

1.2 La dyslexie

1.2.1 Historique

Le premier cas de dyslexie a été décrit par un médecin Prussien nommé Johannes Schmidt en 1676 ¹¹⁰. Broadbent rapporta en 1872 le cas d'un patient incapable de lire en dépit de ses habiletés à parler et à écrire. Il postula alors que la parole et le langage étaient contrôlés par le lobe frontal gauche ¹¹⁰. En 1877, Kussmaul utilisa les mots cécité verbale « word blindness » et surdité verbale « word deafness » pour caractériser une difficulté acquise de lecture chez des adultes avec capacité de parole, intelligence et acuité visuelle normales ¹¹¹. Ce n'est qu'en 1884 que le terme dyslexie fut proposé par un ophtalmologiste du nom de Rudolf Berlin ¹¹⁰. Il croyait que ce terme était plus approprié pour décrire un problème de lecture lié à des bases neurologiques que le terme cécité des mots. L'intérêt pour la dyslexie devint encore plus marqué suite aux travaux de Morgan et d'Hinshelwood qui rapportèrent les premiers cas congénitaux et familiaux de troubles de lecture. Hinshelwood conclu alors que ces troubles pouvaient être héréditaires ¹¹¹. Plusieurs courants de pensées se succédèrent au fil des années, en ce qui a trait à l'étiologie des troubles de lecture. Encore aujourd'hui, il n'existe pas de consensus sur la définition de la dyslexie et plusieurs termes sont toujours utilisés pour décrire les troubles spécifiques de lecture. Cette pathologie est répertoriée par l'OMS depuis 1991 en tant que trouble du développement psychologique.

1.2.2 Phénotype

La dyslexie est un trouble spécifique de l'apprentissage de la lecture ayant une origine neurologique et qui touche entre 5 à 10% de la population ¹¹². Il s'agit du trouble d'apprentissage le plus fréquent. Bien que plusieurs études démontraient une prévalence égale chez les deux sexes ¹¹³, des études plus récentes indiquent que la dyslexie serait plus fréquente chez les garçons ¹¹⁴. Ce trouble est caractérisé par des difficultés de reconnaissance juste et fluente des mots et par de faibles habiletés d'épellation et de décodage en dépit d'un quotient intellectuel normal et un accès

adéquat à l'éducation ¹¹⁵. Ces difficultés résultent habituellement d'un déficit dans la composante phonologique du langage, ce qui entrave l'habileté de l'individu à segmenter les mots écrits et à faire la correspondance avec les graphèmes (unités graphiques minimales) et les phonèmes (sons d'une langue). D'autres troubles neurologiques peuvent être diagnostiqués chez les dyslexiques. En effet, la dyslexie peut être associée à des problèmes de langage (dysphasie) et de la parole (dyspraxie) ¹¹⁶ ainsi qu'à des troubles cognitifs et comportementaux tels le déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité ¹¹⁷ et l'autisme ¹¹⁸. Une étude récente a d'ailleurs rapporté que 51% des enfants atteints de dyslexie souffraient également d'un trouble spécifique du langage oral ¹¹⁹.

1.2.3 Étiologie

Malgré plusieurs années d'investigation dans différents champs de recherche tel que la neuropsychologie, la neuro-imagerie, l'anatomie cérébrale et la magnéto-encéphalographie, la cause spécifique de la dyslexie demeure indéterminée. Cependant l'arrivée de la génétique moléculaire a permis de démontrer que des facteurs génétiques contribuent à l'apparition de cette maladie. En effet, des études de jumeaux montrent qu'il existe un degré de concordance de 68% chez les jumeaux MZ comparé à 38% chez les jumeaux DZ ⁵⁰. Malgré ce fort argument génétique, les études d'agrégation familiale montrent que la dyslexie ne ségrège habituellement pas selon un mode de transmission mendélien simple. Ce trouble d'apprentissage constitue donc un trait complexe génétique complexe.

Jusqu'à ce jour, plusieurs loci de susceptibilité pour la dyslexie ont été mis à jour, notamment sur les chromosomes 1p, 2p, 2q, 3p, 6p, 6q, 7q, 11p, 15q, 18p et Xq ¹²⁰. Plus récemment, quatre gènes candidats ont été associés à la dyslexie; *KIAA0319* ^{53;} ¹²¹ et *DCDC2* ^{54;} ¹²² en 6p, *DYX1C1* ^{123;} ¹²⁴ en 15q et *ROBO1* ⁵¹ en 3p. Tous ces gènes sont hautement exprimés dans le cerveau et les études chez les animaux ont montré que l'inactivation de ces gènes mène à des anomalies de migration neuronale ^{51-53;} ^{122;} ^{124;} ¹²⁵. Il semble donc que ces gènes soient tous impliqués dans les processus de

guidance axonale et de migration neuronale (figure 9, page 52). Bien qu'aucune mutation ayant un impact fonctionnel sur la fonction de ces gènes n'ait été identifiée, ces résultats suggèrent que des gènes impliqués dans la migration et la maturation neuronale au cours du développement précoce pourraient jouer un rôle important dans l'apparition de la dyslexie ¹²⁶.

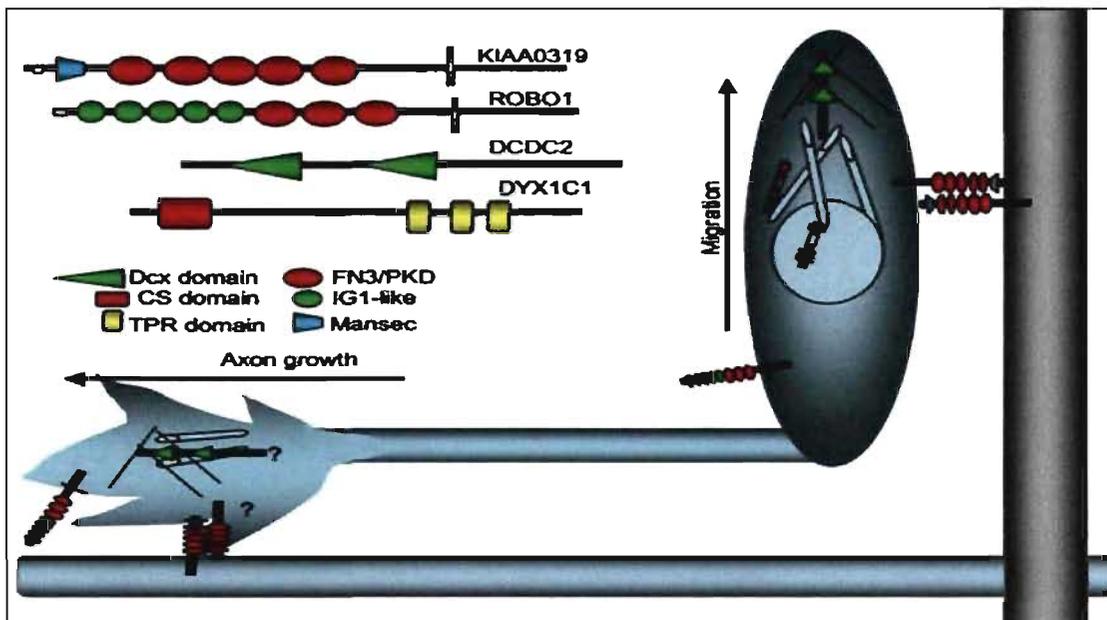


Figure 9 : Domaines fonctionnels retrouvés dans les protéines possiblement impliquées dans l'apparition de la dyslexie

KIAA0319 et ROBO1 sont des récepteurs et des molécules d'adhésion transmembranaires servant de guide lors de la migration axonale. DCDC2 et DYX1C1 modèleraient plutôt des changements au niveau du cytosquelette qui se traduiraient par une plus ou moins grande mobilité des neurones en développement. Tirée de Galaburda AM *et al.* 2006 ¹²⁶.

Ces découvertes tracent un parallèle très intéressant avec les premières observations de Galaburda. Effectivement, à la fin des années 70, Galaburda et ses collègues ont trouvé des anomalies de migration neuronale dans quatre cerveaux de patients dyslexiques ¹²⁷. Plus précisément, ces anomalies ont été retrouvées de manière prédominante en périphérie du sillon latéral de l'hémisphère gauche, traditionnellement associé au langage. Ces premières observations furent par la suite retrouvées dans trois cerveaux additionnels ¹²⁸.

1.3 Structure et fonctions des synapsines

1.3.1 La synapsine I et la régulation de la fonction synaptique

La synapsine I est le membre le plus étudié de la famille des synapsines, une famille de phosphoprotéines neuronales associées aux VS et impliquées dans la formation des synapses ainsi que dans la régulation de la relâche des neurotransmetteurs. Il y a trois gènes qui codent pour les synapsines (*SYN1*, *SYN2*, *SYN3*). Les synapsines existent dans tous les organismes ayant un système nerveux et elles sont hautement exprimées dans le SNC. Leur conservation à travers l'évolution, leur distribution aux boutons terminaux, ainsi que leur association spécifiques aux VS suggèrent qu'elles jouent un rôle central dans la régulation des échanges entre les neurones^{58; 129}.

Au point de vue structural, les synapsines ont plusieurs domaines conservés (figure 10) et possèdent de nombreux sites de phosphorylation pour une variété de kinases (figure 11, page suivante).

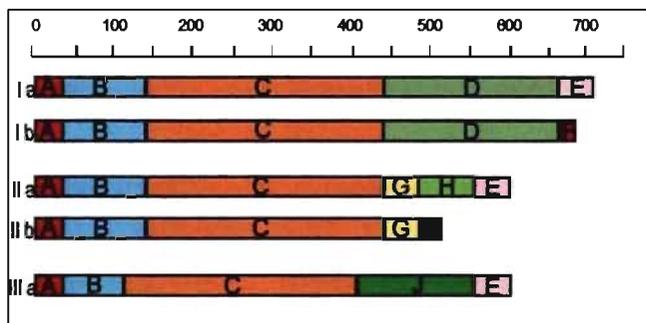


Figure 10 : Domaines fonctionnels des isoformes de la famille des synapsines

Tirée de Kao H.T *et al.* 1999¹³⁰.

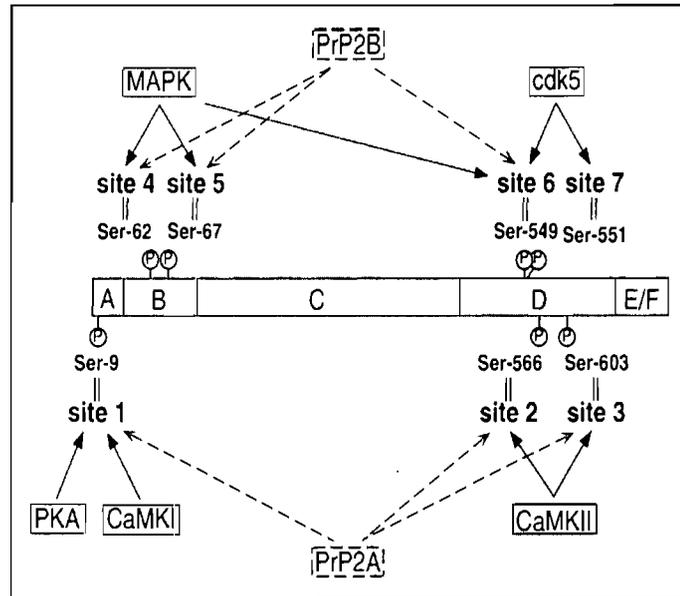


Figure 11 : Sites de phosphorylation de la synapsine I
Tirée de Yamagata Y. 2003 ¹³¹.

Abréviations: MAPK : « mitogen-activated protein kinase »; PKA : protéine kinase A; CaMKI : protéine kinase I Ca^{2+} /calmoduline-dépendante; CaMKII : protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline-dépendante; Cdk5 : protéine kinase cycline-dépendante 5; PrP2A : protéine phosphatase 2 A; PrP2B : protéine phosphatase 2 B

De façon générale, ces nombreux sites de phosphorylation assurent la régulation de la fonction des synapsines par un cycle continu de phosphorylation/déphosphorylation (figures 12 et 13, page suivante).

La synapsine I se lie au cytosquelette d'actine et aux VS de l'élément présynaptique sous sa forme non phosphorylée. Par une entrée massive d'ions Ca^{2+} dans l'élément pré-synaptique, la CaMKI et la PKA phosphorylent la synapsine I qui relâche du même coup les VS préalablement liées ¹³². Les VS sont par la suite transportées à la membrane synaptique où elles se fusionnent à la membrane et procèdent à l'exocytose des neurotransmetteurs.

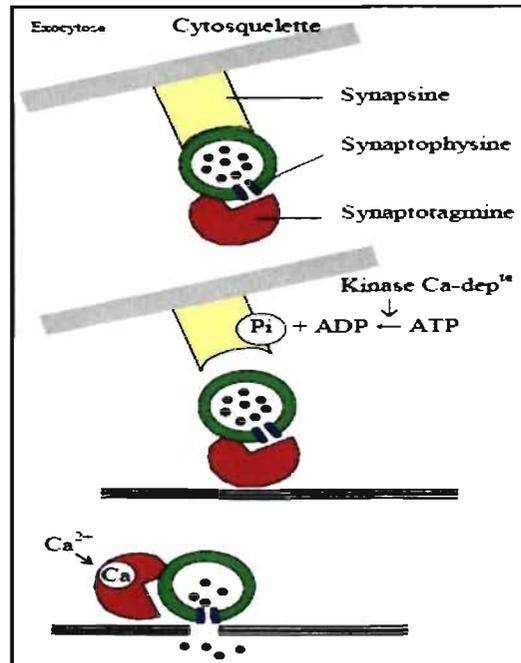


Figure 12 : Mécanisme de phosphorylation de SYN1
Tirée des notes de cours de neurobiologie du professeur Jean-Marc Mienville ¹³³

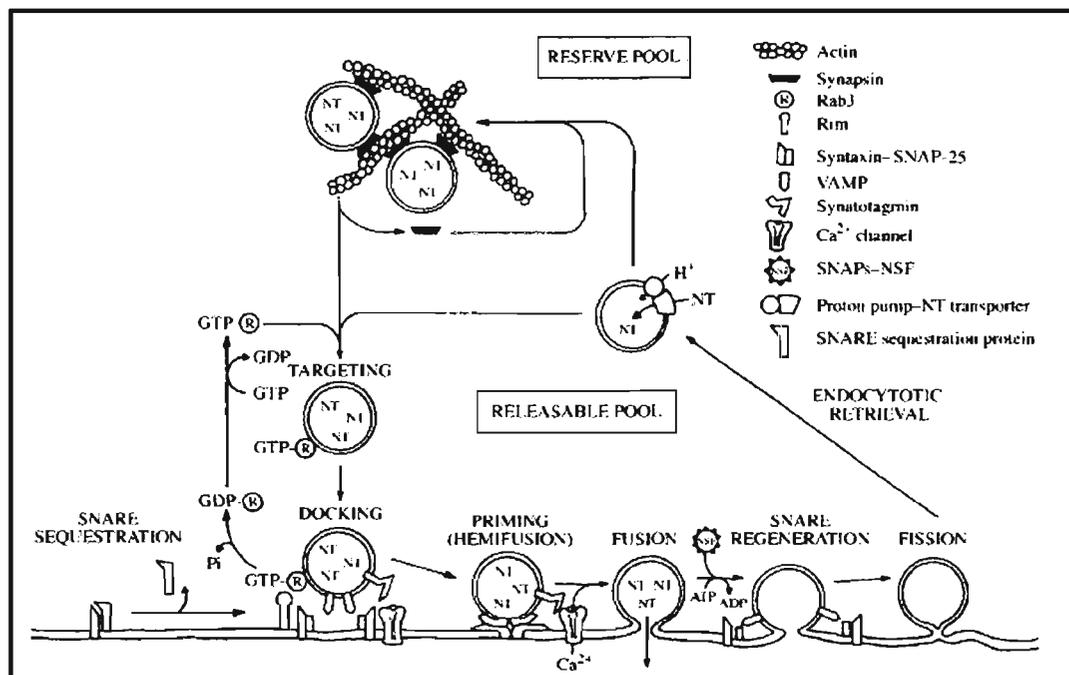


Figure 13 : Modèle schématique du processus d'exocytose/endocytose des VS
Tirée de Benfenati, F., Onofri, F., et Giovedi, S. 1999 ¹³⁴.

Le transport des VS à la membrane est assuré par plusieurs protéines, dont la plus importante la synaptotagmine qui s'associe au Ca^{2+} pour former un pore de fusion avec la membrane synaptique. Ce travail est facilité par l'association de la synaptotagmine avec les protéines du complexe SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor). À la suite du relargage de neurotransmetteurs, le complexe SNARE se détache de la VS pour permettre sa recapture pour une seconde ronde d'exocytose (« ready releasable pool ») ou pour utilisation ultérieure (« reserve pool ») (figure 13, page précédente).

De nombreux travaux ont été réalisés sur les différents rôles des synapsines. De façon générale, les études suggèrent que la synapsine I n'est pas essentielle aux mécanismes fondamentaux d'exocytose, d'endocytose et de recyclage des VS. Toutefois, son absence ou la perturbation de sa fonction crée une réduction du nombre de VS à l'élément présynaptique, abaisse le contenu du pool de réserve des VS et altère la plasticité synaptique à court terme^{37-39; 135-139}. De plus, un phénotype épileptique est observable chez la souris dépourvue de synapsine I^{37-39; 139}. Cette dernière observation est probablement reliée à la démonstration qu'en l'absence de *SYN1*, la transmission synaptique aux synapses inhibitrices est profondément réduite comparativement à celle enregistrée aux synapses excitatrices^{111; 129; 140}. Cela a pour conséquence de créer un dérèglement de la balance inhibition/excitation, à la base de la formation du phénomène épileptique¹⁴¹.

1.3.2 Les synapsines II et III

Il semblerait que la synapsine II partage plusieurs propriétés avec son homologue, la synapsine I. Effectivement, l'absence de *SYN1*, de *SYN2* ou de *SYN1/2* chez la souris résulte en un phénotype épileptique, une diminution du nombre de vésicules synaptiques (VS), une perturbation de la relâche de neurotransmetteurs et une dépression synaptique^{38; 135}. Malgré cette redondance, des études au niveau cellulaire ont montré que les synapsines I et II jouent des rôles différents durant le développement neuronal¹⁴². Ainsi, il semble que la synapsine II soit nécessaire à la formation et au bon maintien des synapses^{142; 143} alors que la synapsine I semble être davantage importante pour la formation des axones^{142; 144}.

En ce qui concerne la synapsine III, elle jouerait un rôle synaptique distinct si l'on se fie à son profil d'expression et à sa distribution cellulaire¹²⁹. En effet, contrairement aux deux autres synapsines, la synapsine III est exprimée très tôt durant le développement neuronal et son expression diminue dans les neurones matures¹⁴⁵. De plus, contrairement aux souris « KO » pour *SYN1*, *SYN2* ou *SYN1/2*, les souris dépourvues de *SYN3* n'ont pas de phénotype épileptique. Également, les souris n'exprimant pas *SYN3* montrent un délai de croissance des neurites en plus d'une augmentation de la taille du pool de recyclage des VS^{39; 135}. Finalement, la phosphorylation de la synapsine III est inhibée par une entrée de Ca^{2+} alors que l'entrée de Ca^{2+} induit la phosphorylation de la synapsine I¹⁴⁶.

2. Projet de recherche

2.1 Problématique

L'autisme et la dyslexie sont des conditions neurologiques hétérogènes avec une hérédité complexe. Plusieurs évidences suggèrent que les troubles du développement du langage dont la dyslexie sont des phénotypes intermédiaires à l'autisme (endophénotypes), ce qui pourrait impliquer une base moléculaire commune pour ces deux maladies du développement cérébral. Jusqu'à présent quelques gènes prédisposant à ces maladies ont été identifiés, mais ils n'expliquent qu'une minorité de cas. Nous croyons que des grandes familles comme celle présentée au chapitre 1, où plusieurs phénotypes sont présents, peuvent contribuer à mieux comprendre les bases génétiques communes à ces différentes maladies neurodéveloppementales.

2.2 Hypothèse

Notre hypothèse est que des mutations additionnelles dans *SYN1* pourraient être associées à l'épilepsie, à l'autisme ou à la dyslexie. De plus, compte tenu de leur grande homologie et de leur rôle présynaptique, il se pourrait que des mutations dans l'un ou l'autre des gènes codant pour les autres membres de la famille des synapsines, c'est-à-dire *SYN2* et *SYN3*, soient également associées avec l'épilepsie, l'autisme ou la dyslexie.

2.3 Objectifs

Les objectifs de ce projet sont de déterminer si des mutations dans les gènes de la famille des synapsines sont associées à l'épilepsie, l'autisme ou la dyslexie.

2.4 Pertinence et retombées

L'identification et la caractérisation des molécules mutées impliquées dans le développement de ces conditions neurologiques vont améliorer notre compréhension de ces maladies. Grâce à une meilleure compréhension des bases génétiques de ces maladies, nous serons en mesure d'offrir des conseils génétiques aux individus atteints ainsi qu'aux membres de leur famille, incluant des tests diagnostics basés sur l'ADN. De plus, un diagnostic précoce pourra être posé et cela facilitera l'insertion sociale des patients grâce à une thérapie éducative appropriée dès le jeune âge et ainsi prévenir certaines conséquences sociales et psychologiques associées aux troubles d'apprentissage.

3. Matériel et méthodes

3.1 Recrutement des patients

Les protocoles de recherche ont été approuvés par le Comité d'éthique du Centre hospitalier de l'Université de Montréal. Les patients épileptiques ont été recrutés à la Clinique d'épilepsie de l'Hôpital Notre-Dame. Les différents syndromes épileptiques ont été déterminés selon les critères de la classification internationale des syndromes épileptiques⁷⁷. Seuls les patients avec sclérose de l'hippocampe confirmée par l'IRM ont été sélectionnés pour la recherche de mutations.

Les patients autistes, ainsi que leurs parents, ont été recrutés à partir de cliniques spécialisées dans le diagnostic des TED, de centres de réadaptation et d'écoles spécialisées des régions de Montréal et de Québec. Le diagnostic a été posé à l'aide des tests ADI-R et ADOS par des pédopsychiatres et neuropsychologues spécialisés dans l'évaluation des troubles du spectre de l'autisme, selon les critères du DSM-IV.

Un prélèvement sanguin a été obtenu chez les individus ayant donné leur consentement et l'ADN fut extrait à l'aide de protocoles standard.

L'ADN des patients dyslexiques nous a été fourni par Wendy H Raskind de l'Université de Washington. La caractérisation clinique de ces individus a déjà été décrite⁵⁵.

3.2 Amplification par PCR

Pour chacun des gènes de la famille des synapsines, la recherche de mutations a été réalisée en dessinant des paires d'amorces en vue d'amplifier des fragments d'environ 500 pb à partir de l'ADN génomique des trois gènes (NM_006950, NM_133625, NM_003490). Les paires d'amorces ont été dessinées de manière à cribler tous les exons, ainsi que les régions non traduites en 3' et 5'. Les séquences ont été déterminées à l'aide du logiciel Exon primer disponible sur la base de données de UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>). La séquence spécifique de chacune des amorces est fournie en annexe (pages 83-84).

Tous les fragments d'ADN génomique ont été amplifiés par PCR dans un volume de réaction de 30 μ L contenant 30 ng d'ADN, 0.25 mM de dNTPs, 1 X de tampon taq contenant 15 mM de $MgCl_2$, 0.375 U de Taq polymérase (Qiagen) et 1 μ mol de chaque amorce. Afin d'améliorer la qualité des produits de PCR, de la bétaine (Qiagen) et du $MgCl_2$ ont parfois dû être ajoutés à raison de 1 X pour la bétaine et de 25 mM pour le $MgCl_2$. L'amplification a été effectuée dans un appareil GeneAmp PCR System9700 (Applied Biosystems) selon des protocoles standard. La majorité des exons ont été amplifiés selon les paramètres suivants : dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 35 cycles d'amplification (dénaturation de 35 sec à 94°C, hybridation de 35 sec à X°C et élongation de 35 sec à 72°C) puis une extension finale de 7 min à 72°C. Les températures d'hybridation et le détail de ces protocoles sont fournis en annexe (pages 83-85). Les amplicons ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.8% puis envoyés pour le séquençage à la plateforme du Centre d'Innovation de Génome Québec à l'Université McGill. Les chromatogrammes ont été analysés et comparés à la séquence théorique disponible sur UCSC en utilisant le logiciel Seqman de la suite DNASTar. Les mutations ont été confirmées par séquençage du brin complémentaire et les parents furent également séquencés afin de déterminer la transmission.

3.3 Interprétation des résultats

Tout d'abord, nous avons considéré comme étant des mutations, les variants non répertoriés dans les bases de données et absents chez les contrôles testés. Un séquençage du brin complémentaire a également été effectué pour s'assurer de la véracité de chaque mutation. Puis, afin d'évaluer l'impact de la mutation, nous avons étudié la ségrégation de la mutation dans la famille de l'individu ainsi que la conservation de l'acide aminé à travers l'évolution. Des outils bioinformatiques ont également été utilisés afin de déterminer l'impact fonctionnel de chaque mutation et aussi pour émettre des hypothèses sur les mécanismes d'action pouvant mener au phénotype rencontré. Ces outils sont le site ELM pour la prédiction des sites fonctionnels à l'intérieur des protéines (<http://elm.eu.org>), les algorithmes SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) et Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/cgibin/pph/polyphen.cgi>), le serveur Mfold3.2 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) et les outils ESE finder version 2.0 (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/index.html>) et Reg RNA (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/html/prediction.html>).

Plus précisément, le site ELM a été utilisé pour déterminer les motifs fonctionnels présents au niveau protéique. Les résultats ont été générés en utilisant les identifiants Swiss-Prot de chacune des synapsines (P17600 pour *SYN1*, Q92777 pour *SYN2* et O14994 pour *SYN3*) et en ne spécifiant aucun compartiment cellulaire. L'effet des substitutions d'acides aminés a été évalué par les algorithmes SIFT et Polyphen selon les instructions fournies via leur site internet. L'impact sur le repliement de l'ARNm a été déterminé par le logiciel Mfold version 3.2. Finalement, la perte ou la création possible de motifs ou d'éléments régulateurs au niveau de l'ARN a été prédite par une combinaison des sites ESE finder et Reg RNA. Malgré toutes ces analyses, il faut préciser que nous ne pouvons éliminer la possibilité que certaines des mutations identifiées dans ce chapitre soient des polymorphismes rares. À cette fin, des études fonctionnelles en vue de vérifier si ces mutations perturbent la fonction des

synapsines ont été initiées. Cependant, sauf pour la mutation *SYN1*_{Q555X} présentée au chapitre 1, ces résultats préliminaires ne seront pas présentés dans ce mémoire.

4. Résultats

4.1 Recherche de mutations dans *SYN1*

4.1.1 Criblage des individus épileptiques

Un total de 63 individus (31 H et 32 F) épileptiques avec sclérose de l'hippocampe ont été testés pour des mutations dans *SYN1*. Une mutation faux-sens (p.A550T) a été découverte dans l'exon 12 de *SYN1* chez deux patients (1 H et 1 F). Cette mutation n'a pas été retrouvée chez les 449 chromosomes contrôles que nous avons séquencés. Cet individu atteint a un autre frère atteint d'épilepsie qui est décédé et dont l'ADN n'a pu être testé. Également, les parents non atteints n'ont pu être testés (figure 14).

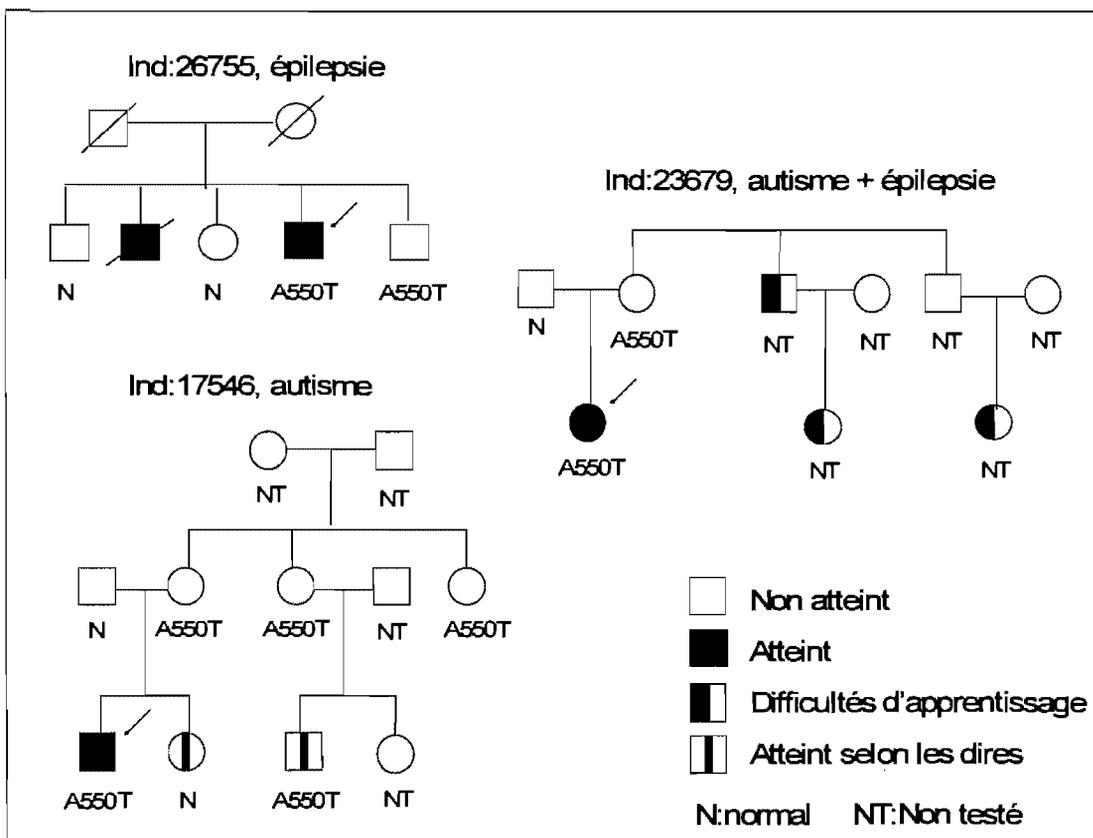


Figure 14 : Pedigree des familles portant la mutation *SYN1*_{A550T}

4.1.2 Criblage des individus autistes

Un total de 191 autistes (189 H et 2 F) ont été testés pour des mutations dans *SYN1*. Au total, nous avons identifié trois mutations faux-sens dans cette cohorte (tableau X, page 68). Toutes les mutations détectées ont été transmises par la mère. Deux de ces mutations (p.A51G et p.T567A) ont été retrouvées chez un même individu atteint. La mutation p.T567A a également été détectée chez un autre autiste. Finalement, nous avons trouvé la mutation p.A550T, préalablement identifiée chez deux patients épileptiques, chez un individu autiste. Puisque les trois mutations identifiées étaient localisées dans les exons 1 (p.A51G) et 12 (p.A550T et p.T567A), nous avons séquencé ces deux exons chez 150 autistes supplémentaires (109 H et 41 F) afin de déterminer la fréquence de ces mutations pour toute la cohorte d'autistes. Cela n'a pas permis de repérer la mutation A51G alors que la mutation A550T a été décelée chez une autiste avec épilepsie nocturne. En ce qui concerne la mutation T567A, elle a été identifiée chez un autiste supplémentaire. Aucune de ces mutations n'a été découverte chez les 449 chromosomes contrôles que nous avons séquencés pour l'exon 12 et chez les 418 pour l'exon 1.

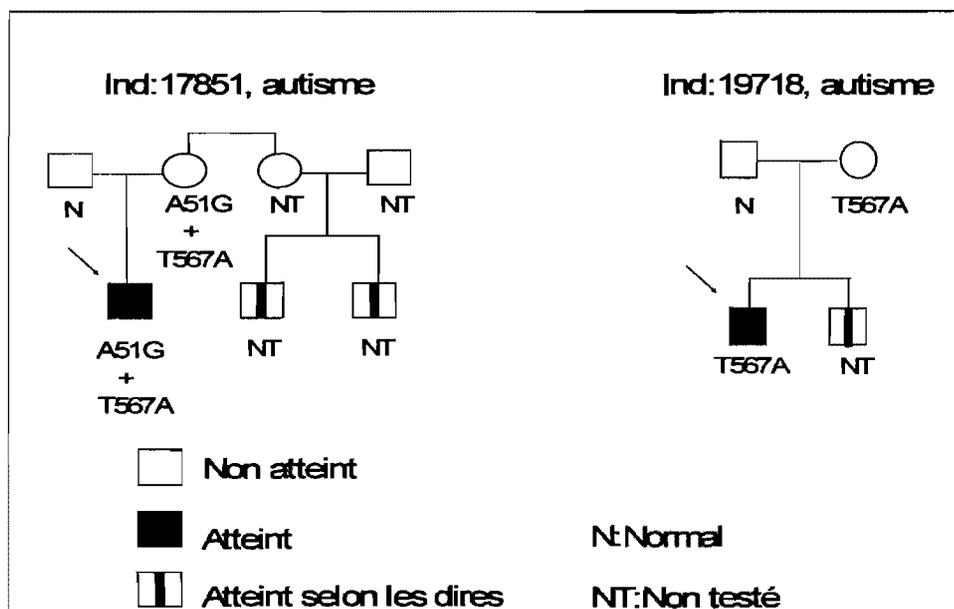


Figure 15 : Pedigree des deux familles porteuses de la mutation *SYN1*_{T567A}

Enfin concernant la mutation A550T retrouvée dans quatre familles avec autisme et/ou épilepsie, nous avons génotypé 10 microsatellites chez les individus porteurs de cette mutation et ces derniers partagent un haplotype commun, suggérant que cette mutation provient d'un ancêtre commun (tableau IX). L'analyse des haplotypes des individus porteurs de la mutation T567A n'a pas montré d'haplotype commun entre les deux familles.

Tableau IX : Haplotypes retrouvés chez les familles avec des mutations dans *SYN1*

Marqueur	Htz	Position(Mbp)	Famille 94		Aut-01		Famille 193		EP-60	Aut-02	
			A51G + T567A		A550T		T567A		A550T	A550T	
			17851	17850	17546	17544	19718	19720	26755	23679	23681
Gata31b12	78.6%	43,11	?	209-213	213	213-213	213	213-213	217	217-217	217-217
DXS8083	67.6%	44,99	191	179-191	182	182-182	187	182-187	189	182-189	?
DXS1146	?	46,5	150	150-154	150	150-150	150	150-152	150	152-152	152-?
Gata160b08	50%	46,73	201	197-201	201	201-205	201	197-201	201	201-205	201-205
DXS426	58.5%	47,3	314	314-308	303	303-322	305	305-305	303	303-322	303-322
DXS1367	?	47,45	139	139-147	131	131-133	133	133-133	131	131-147	131-147
DXS6949	?	48,08	192	192-194	194	194-194	192	192-194	194	192-194	192-194
DXS1208	64.9%	48,85	263	263-269	263	257-263	255	255-263	263	257-263	257-263
DXS1039	75.7%	49,16	108	108-108	108	108-114	108	108-108	108	108-112	108-112
DXS2507	62.5%	52,49	262	262-271	267	267-258	258	258-262	267	262-262	262-?

4.1.3 Criblage des individus dyslexiques

Tel que mentionné au chapitre 1 (page 27), aucune mutation n'a été identifiée dans *SYNI* chez les 96 hommes dyslexiques provenant de la cohorte du Dr Wendy H. Raskind. Puisque la dyslexie était plutôt associée aux femmes de la famille étudiée au chapitre 1, nous avons testé des femmes dyslexiques (n=59) pour des mutations dans *SYNI*. Nous avons identifié une mutation synonyme (c.1569G>A) dans l'exon 12 d'une patiente. Le séquençage de cet exon chez les autres membres de sa famille a permis de détecter la mutation chez son père ainsi que chez ses deux sœurs dyslexiques. La mère et le frère de cette patiente, tous deux non atteints ne sont pas porteurs de cette mutation (figure 16). Cette mutation n'a pas été retrouvée chez les 449 chromosomes contrôles que nous avons séquencés.

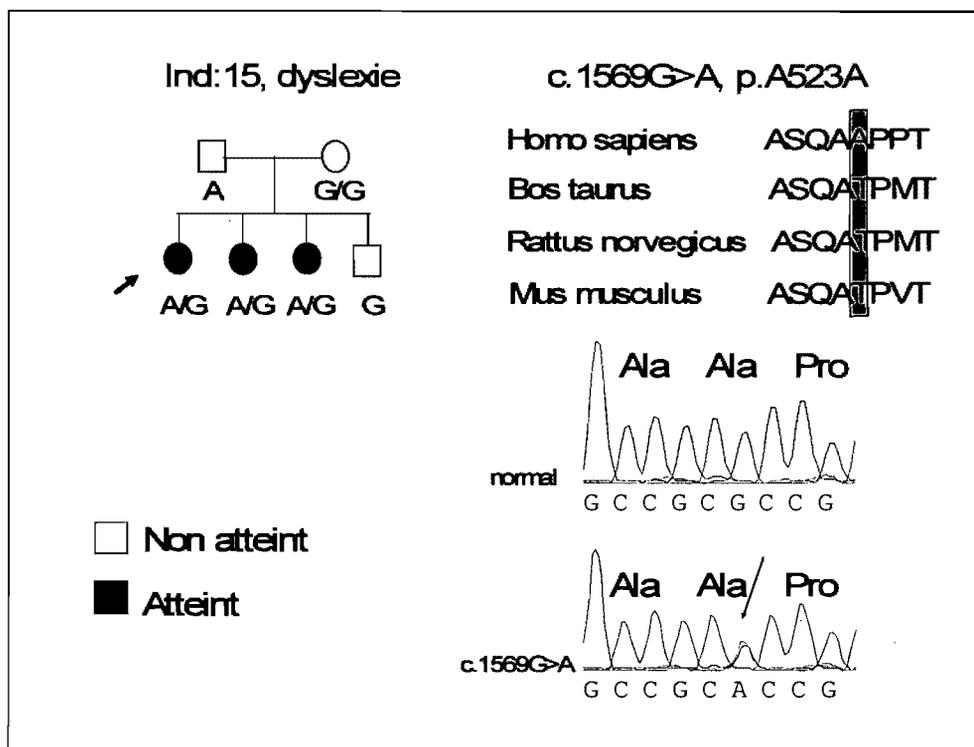


Figure 16 : Mutation synonyme c.1569G>A retrouvée chez une famille avec dyslexie

Plus de détails concernant ces mutations (nomenclature, transmission, nombre de contrôles testés) sont disponibles dans le tableau X.

Tableau X : Mutations identifiées dans *SYNI* chez des patients épileptiques, autistes ou dyslexiques

Ind	Sexe	Exon	ADNc	Protéine	Phénotype	Transmission	# Chrom. contrôles
26755	H	12	c.1648G>A	p.A550T	Épilepsie	Mère	449
14026	F	12	c.1648G>A	p.A550T	Épilepsie	Inconnue	449
23679	F	12	c.1648G>A	p.A550T	Autisme + Épilepsie	Mère	449
17546	H	12	c.1648G>A	p.A550T	Autisme	Mère	449
17851	H	12	c.1699A>C	p.T567A	Autisme	Mère	449
19718	H	12	c.1699A>C	p.T567A	Autisme	Mère	449
14858	M	5'utr	c.-99C>T	NIL	Autisme	Mère	418
18125	M	5'utr	c.-54C>T	NIL	Autisme	Mère	418
17851	H	1	c.152C>G	p.A51G	Autisme	Mère	418
15	F	12	c.1569G>A	NIL	Dyslexie	Père	449

4.2 Analyse *in silico* des mutations identifiées dans *SYN1*

Tout phénotype confondu nous avons identifié un total de trois mutations faux-sens (p.A51G, p.A550T, p.T567A) et une mutation synonyme dans *SYN1* (c.1569G>A). La figure 17 montre les électrophorégrammes des trois mutations faux-sens ainsi que l'alignement des séquences protéiques correspondantes retrouvées chez d'autres espèces. L'analyse *in silico* pour ces mutations est détaillée ci-bas.

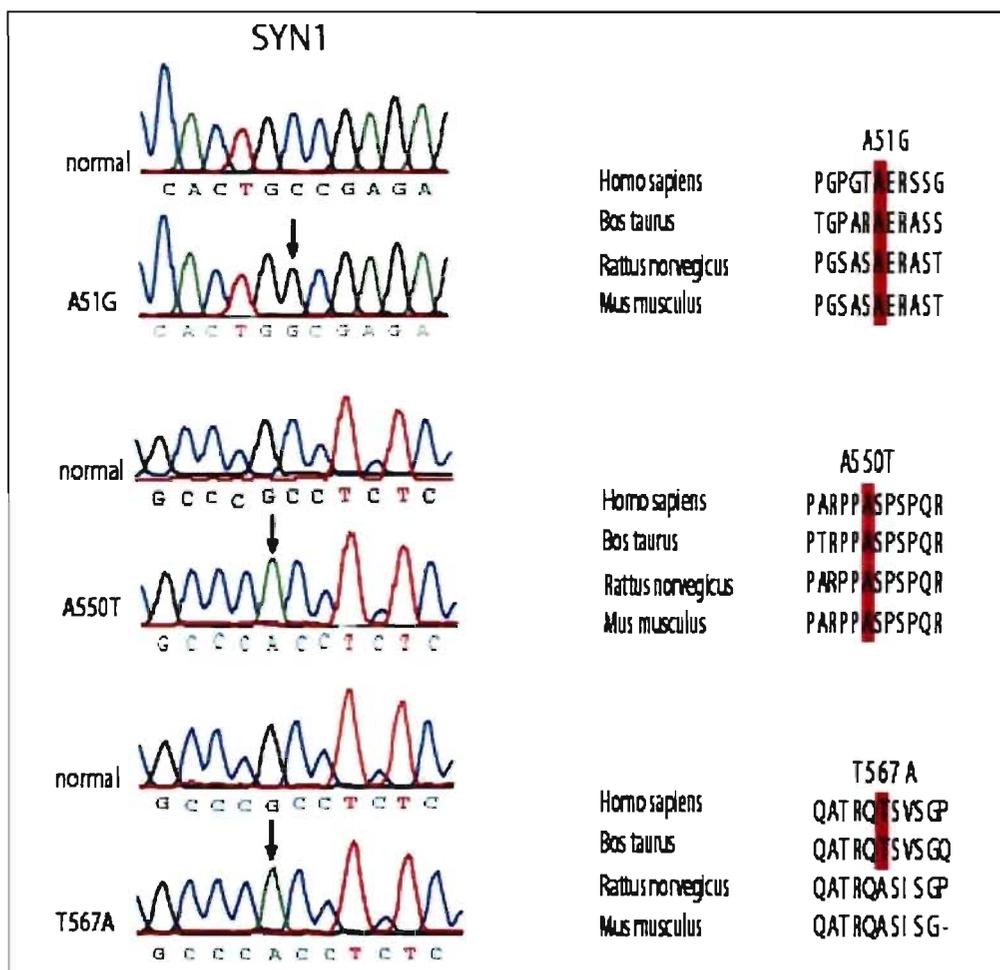


Figure 17 : Mutations identifiées dans *SYN1*

4.2.1 Mutation A550T

En ce qui a trait aux analyses *in silico*, le site ELM et de nombreuses études^{59; 147} suggèrent que l'acide aminé 550 fait partie d'un motif de reconnaissance pour plusieurs phosphorylations, notamment par les kinases CDK et les MAPK. De plus, en raison de la présence de nombreuses prolines, cette région serait aussi impliquée dans la liaison des domaines SH3 de d'autres protéines. Quant aux résultats générés par les outils SIFT et polyphen, le premier a prédit un changement toléré par la protéine avec un résultat de 0.41 tandis que polyphen n'a pas été en mesure de prédire son effet.

4.2.2 Mutation T567A

Contrairement à l'alanine en position 550, la thréonine en position 567 est moins bien conservée entre les espèces (figure 17, page 69), ce qui laisse présumer un rôle moins essentiel au bon fonctionnement de la protéine. Malgré cette faible conservation, il semble que cet acide aminé fait partie d'un motif de reconnaissance (aa 564-570) pour une phosphorylation par la PKA (ELM), en plus d'être à proximité d'un site de phosphorylation pour la CaMKII¹⁴⁸. Il semble aussi que la kinase GSK3 pourrait phosphoryler *SYN1* à cet endroit (aa 561-568). Cette région du domaine D est également riche en proline, motif connu pour ses interactions avec les domaines SH3 de différentes kinases, protéines adaptatrices et protéines associées aux VS. En ce qui a trait aux prédictions de SIFT et polyphen, SIFT prévoit que la mutation sera tolérée par la protéine (0,71) alors que polyphen ne peut prédire son impact.

4.2.3 Mutation A51G

Tel que montré sur la figure 14 (page 64), l'individu autiste 17851 est également porteur d'une autre mutation, soit la A51G. Cet acide aminé est bien conservé à travers les espèces, tel que montré dans la figure 17, page 69. Cette alanine semble faire partie d'un site de reconnaissance (aa 47-54) pour une phosphorylation par la GSK3 (ELM). Néanmoins, SIFT prévoit que cette mutation sera tolérée (0,41) par la protéine alors que polyphen prédit un impact bénin. Cependant, il est possible que l'addition de deux mutations dans *SYNI* (A51G et T567A) chez un même individu puisse causer un dysfonctionnement plus marqué de la fonction de cette protéine.

4.2.4 Mutation c.1569G>A

Cette mutation montre une assez bonne ségrégation avec la dyslexie dans une petite famille (figure 16, page 67). Il a déjà été rapporté que les mutations synonymes pouvaient affecter la cinétique traductionnelle et ainsi contribuer à la maladie ¹⁴⁸. Toutefois, l'alanine en position 523 n'est pas un acide aminé conservé à travers les espèces et ne semble pas résider dans un site régulateur d'épissage (ESE finder, Reg RNA) ni dans un site fonctionnel connu (ELM). La prédiction de la structure secondaire de l'ARNm n'a pas semblée modifiée comparativement à la structure secondaire de l'ARNm de type sauvage (MFold).

4.2.5 Mutations des régions non-traduites

En plus des mutations décrites ci haut, deux variants localisés dans la région non traduite en 5' ont été détectés chez des patients autistes (c.-99C>T et c.-54C>T). Ces variants n'ont pas été retrouvés chez les contrôles (n = 418 chromosomes). Les alignements de séquences réalisés à partir de différents ARNm ont montré que ces nucléotides ne sont pas conservés à travers les espèces. De plus, la structure de

l'ARNm ne semble pas affectée par ces mutations (résultats non montrés). Toutefois, l'outil ESEfinder suggère que le variant c.-99C>T supprime un site de régulation de l'épissage (exonic splicing enhancer). En effet, le motif de reconnaissance CGTGTC est changé pour CGTGTT et ne devrait plus être reconnu par la protéine SRp55, qui fait partie d'une famille conservée de facteurs d'épissage.

4.3 Recherche de mutations dans *SYN2*

4.3.1 Criblage des individus épileptiques et autistes

La recherche de mutations dans *SYN2* s'est déroulée comme pour *SYN1*. Cependant, l'ADN était de moins bonne qualité, ce qui a restreint le nombre de patients testés. De plus, l'exon 1 de *SYN2* n'a pu être analysé en raison de notre incapacité à l'amplifier par PCR.

Une seule mutation a été identifiée chez les patients épileptiques, il s'agit de la mutation P253A. Elle a été découverte chez le patient déjà porteur de la mutation *SYN1*_{A550T}. Cette mutation s'est avérée absente dans les 278 contrôles testés. Le pedigree de cette famille est montré à la figure 18.

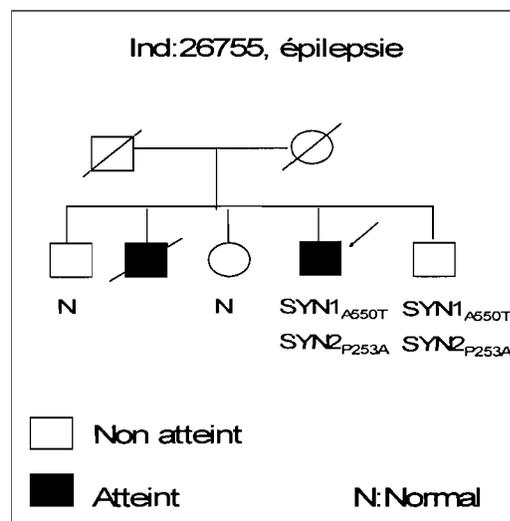


Figure 18 : Pedigree de la famille avec la mutation *SYN2*_{P253A}.

Chez les individus autistes, nous avons détecté une délétion de 7 pb dans l'exon 2 de *SYN2*, qui prédit un décalage du cadre de lecture menant à un codon stop prématuré à l'acide aminé 199. Cette mutation a été trouvée à l'état hétérozygote chez un autiste ainsi que chez sa mère non atteinte. Le séquençage de 161 ADN contrôles n'a pas permis d'identifier cette mutation dans notre population. Le pedigree de cette famille est montré dans la figure 19 C.

Également, nous avons trouvé deux mutations faux-sens soit p.Y236S et p.G464R (figure 19). Ces deux mutations n'ont pas été retrouvées dans les contrôles que nous avons testés (278 pour l'exon 6 et 253 pour l'exon 13).

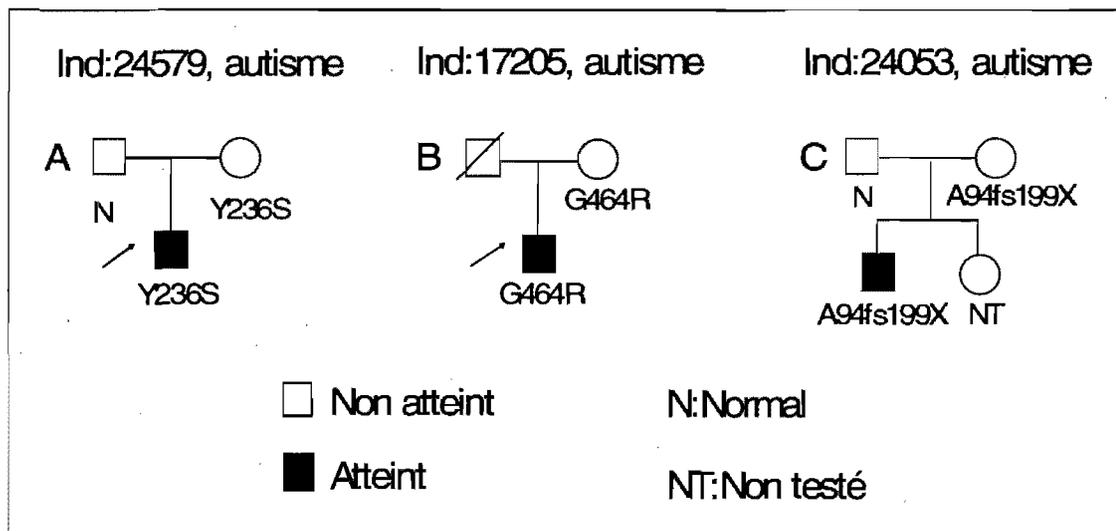


Figure 19 : Pedigree des familles autistes porteuses des mutations *SYN2*_{Y236S} (A), *SYN2*_{G464R} (B) et *SYN2*_{A94fs199X} (C)

4.3.2 Criblage des individus dyslexiques

Étant donné que nous n'avons pas identifié de mutation significative dans *SYN1* chez les dyslexiques, et que les quantités d'ADN étaient plus limitées pour ces individus, nous n'avons pas poursuivi le criblage de *SYN2* dans cette cohorte.

Plus de détails concernant les individus porteurs des mutations dans *SYN2* sont disponibles dans le tableau XI.

Tableau XI : Mutations identifiées dans *SYN2* chez des patients épileptiques ou autistes

Ind	Sexe	Exon	ADNc	Protéine	Phénotype	Transmission	# ADN contrôles
26755	H	6	c.757C>G	p.P253A	Épilepsie	Mère	278
24053	H	2	c.282>del 7pb	p.A94fs 199X	Autisme	Mère	161
24579	H	6	c.707A>C	p.Y236S	Autisme	Mère	278
17205	H	13	c.1390G>C	p.G464R	Autisme	Mère	253

4.4 Analyse *in silico* des mutations identifiées dans *SYN2*

Nous avons identifié un total de quatre mutations dans *SYN2* : une délétion qui prédit un décalage du cadre de lecture menant à une protéine tronquée (p.A94fs199X), ainsi que trois mutations faux-sens (p.Y236S, p.P253A et p.G464R). La figure suivante montre les électrophorégrammes des séquences contenant les mutations, de même que la conservation des acides aminés à travers les espèces.

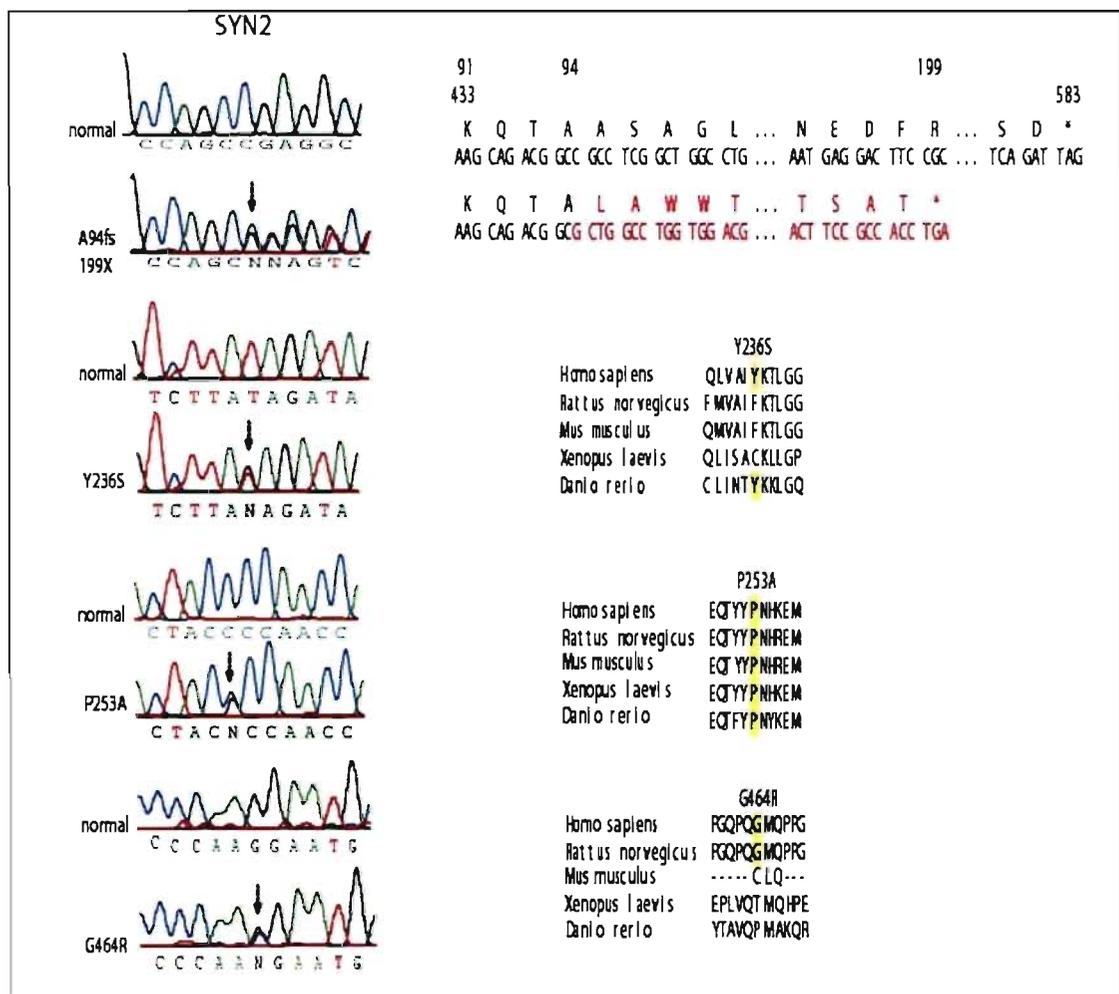


Figure 20 : Mutation identifiées dans *SYN2*

4.4.1 Mutation P253A

Cette proline en position 253 est bien conservée à travers les espèces. Selon les prédictions faites par l'algorithme SIFT, la substitution d'une proline pour une alanine à cette position affecterait la fonction de la protéine (0,02). Par contre, polyphen prétend qu'il s'agit d'un changement bénin (1,13). En ce qui a trait aux possibles domaines fonctionnels présents dans cette région, le site ELM n'en reconnaît aucun.

4.4.2 Mutation A94fs199X

La perte de 384 acides aminés contenus dans les domaines C, G, H et E de la protéine (isoforme a) ainsi que l'altération des 104 derniers acides aminés de la protéine tronquée sont susceptibles d'affecter grandement toutes les fonctions de *SYN2*. En effet, les domaines C et E sont conservés à travers tous les isoformes (a) de la famille des synapsines et de nombreux domaines fonctionnels sont présents dans ces régions dont notamment des sites de phosphorylation pour les kinases CDK1, CK1, CK2, PKA et MAPK ainsi que de nombreux sites de liaison pour les domaines SH3 (ELM). Quant aux domaines G et H, leur fonction demeure largement indéterminée.

4.4.3 Mutation Y236S

La substitution d'une tyrosine non conservée (figure 20, page 75) pour une sérine en position 236 serait possiblement dommageable selon polyphen (1,66). Il est vraisemblable que cette prédiction soit attribuable à la possible création d'un site de phosphorylation pour une Ser/Thr kinase. Cependant, SIFT indique que cette substitution sera tolérée (0,40). Quant à l'analyse des domaines fonctionnels, ELM n'en repère aucun dans cette région. Toutefois, ce domaine (C) est le plus conservé à travers les synapsines, ce qui suggère une fonction commune aux trois synapsines.

4.4.4 Mutation G464R

Tout comme pour la tyrosine en position 236, la glycine en position 464 n'est pas conservée à travers les espèces (figure 20, page 75). Par contre, dans le cas de cette mutation (p.G464R), il s'agit d'un changement non conservateur puisque la glycine est un acide aminé non chargé alors que l'arginine est chargée positivement. Cela pourrait affecter le repliement de la protéine (MFold) et ainsi dissimuler ou libérer des sites d'interactions importants. Toutefois, selon ELM, cette région ne semble pas contenir de domaines fonctionnels importants. D'ailleurs, peu d'informations sont disponibles concernant le domaine G, domaine spécifique à la synapsine II. De plus, SIFT prévoit que ce changement sera toléré alors que polyphen ne peut prédire son impact.

4.5 Recherche de mutations dans *SYN3*

4.5.1 Criblage des individus épileptiques et autistes

La recherche de mutations dans *SYN3* s'est déroulée comme pour *SYN1*. Cependant, comme pour *SYN2*, l'ADN était de moins bonne qualité, ce qui a restreint le nombre de patients testés. Aucune mutation n'a pu être trouvée chez les patients épileptiques (n=48). En revanche, nous avons détecté trois mutations faux-sens chez des patients autistes, dans les exons 1, 7 et 13. La mutation dans l'exon 1 (p.A15V) a été identifiée chez un autiste et chez sa mère non atteinte. L'ADN de la sœur non atteinte n'était pas disponible (figure 21 A). Quant à la mutation dans l'exon 7 (A277T), elle a été identifiée chez une autiste ainsi que chez sa mère qui aurait des problèmes de langage (figure 21 B).

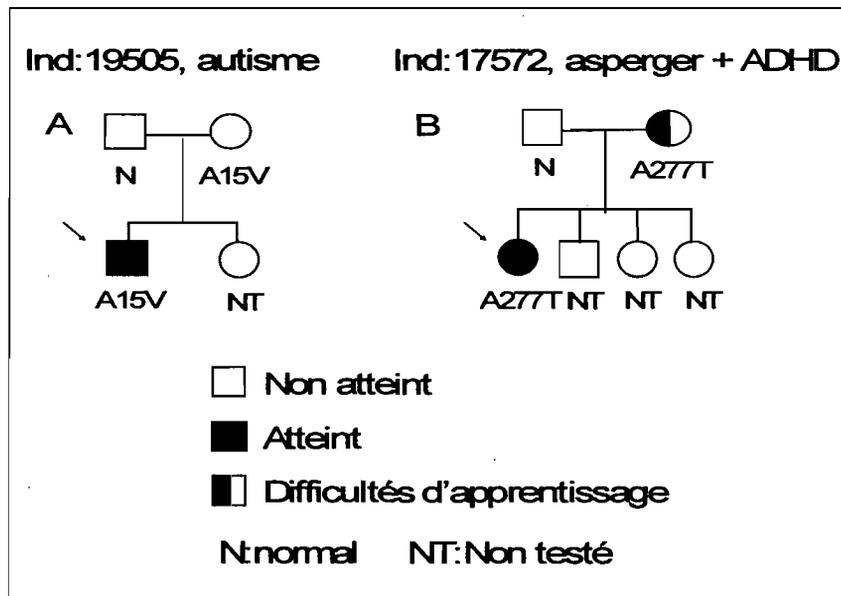


Figure 21 : Pedigree des familles porteuses des mutations *SYN3*_{A15V} (A) et *SYN3*_{A277T} (B)

En ce qui a trait à la mutation dans l'exon 13, il s'agit d'une substitution d'une arginine (résidu polaire chargé) pour une proline (non polaire) en position 554 (p.R554P). Cette substitution a été identifiée chez un autiste du premier groupe testé puis chez un autre autiste lors du séquençage de l'exon 13 chez 144 patients additionnel (figure 22). Cette deuxième ronde de séquençage n'a pas permis de trouver de mutations supplémentaires chez les 115 individus testés pour l'exon 1 et les 130 individus testés pour l'exon 7.

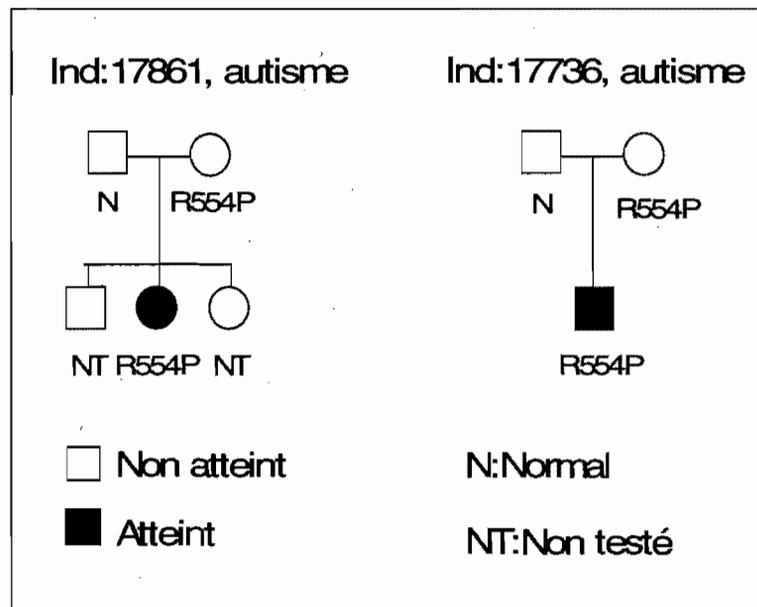


Figure 22 : Pedigree des familles porteuses de la mutation *SYN3*_{R554P}

4.5.2 Criblage des individus dyslexiques

Étant donné que nous n'avons pas identifié de mutation significative dans *SYN1* chez les dyslexiques, et que les stocks d'ADN étaient plus limités pour ces individus, nous n'avons pas poursuivi le criblage de *SYN2* et de *SYN3* dans cette cohorte.

Plus de détails concernant les individus porteurs des mutations dans *SYN3* sont disponibles dans le tableau XII.

Tableau XII : Mutations identifiées dans *SYN3* chez des patients autistes

Ind	Sexe	Exon	ADNc	Protéine	Phénotype	Transmission	# ADN contrôles
19505	H	1	c.44C>T	p.A15V	Autisme	Mère	334
17572	F	7	c.829G>A	p.A277T	Autisme	Mère	376
17736	H	13	c.1661G>C	p.R554P	Autisme	Mère	327
17861	H	13	c.1661G>C	p.R554P	Autisme	Mère	327

4.6 Analyse *in silico* des mutations identifiées dans *SYN3*

Nous avons identifié un total de trois mutations faux-sens dans *SYN3*. La figure suivante montre les électrophorégrammes des séquences contenant les mutations ainsi que la conservation des acides aminés à travers les espèces.

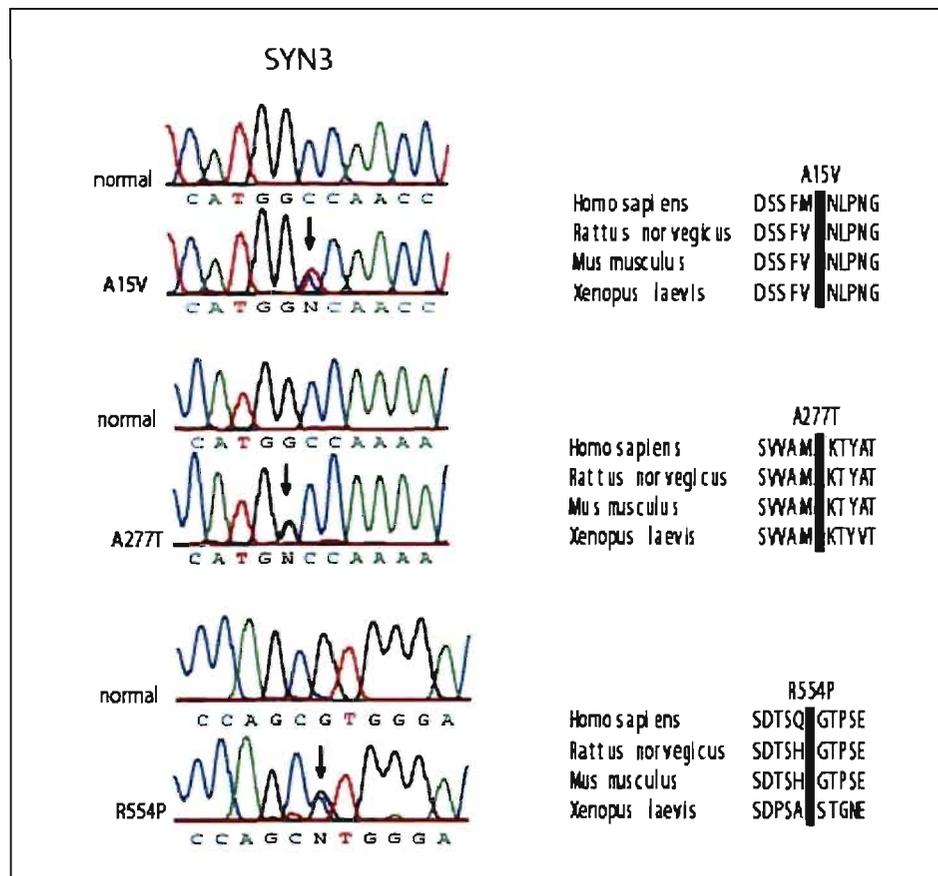


Figure 23 : Mutations identifiées dans *SYN3*

4.6.1 Mutation A15V

Concernant cette mutation, l'alanine présente à la position 15 est bien conservée à travers les espèces (figure 23, page 81) et est localisée dans le domaine A de la protéine (voir figure 10, page 53), plus précisément dans ce qui semblerait être un site de liaison pour la kinase CK1 (selon ELM). De plus, le serveur SIFT prédit une altération de la fonction de la protéine pour cette mutation. On se rappellera que le domaine A de la protéine est impliqué dans les mécanismes de relâche de neurotransmetteurs et ce de manière phospho-dépendante.

4.6.2 Mutation A277T

À première vue, cette mutation ne semble pas résider dans un site fonctionnel de la protéine, ce qui est consistant avec les résultats obtenus par SIFT (tolérée) et polyphen (bénigne). Cependant, les prédictions de structures faites par Mfold suggèrent un changement dans la structure secondaire de l'ARN (résultat non montré). À noter que cet acide aminé est conservé à travers les espèces (figure 23, page 81).

4.6.3 Mutation R554P

Ce résidu est conservé à travers les espèces et est localisé dans le domaine E de la protéine. SIFT prédit que ce changement sera toléré alors que polyphen ne peut prédire son impact. Il est possible que la structure de la protéine soit affectée par le changement de charge des acides aminés.

5. Annexe

5.1 Séquences des amorces

Tableau XIII : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des exons de *SYN1*

<i>SYN1</i>		Primer (5' → 3')	
Exon	Forward		Reverse
1	CTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCC		GGCGGGGCACAGAGGAAGCATCC
2	TTTTGCAACTCCATGAGGATTACA		CATGGGCCACAAGGTTGAGAT
3	CTCTCCAGGGCAAATACTTCAA		TGGGGTCCCTGGCTCTTT
4	ACCAGGTGGGCAGAGGGTAGAAA		TGGGCAAACATGAGAACCAGGAG
5	GACAAGCCCTGGGTGGTAAGTAAC		GGAAATTCACGGTAGACCCATCA
6	GGGCCCGGAGGTGGAGACAC		GAAAAAGGGGTCGATGAGGTCAGC
7	GCGCCTTGGCATGTCCACCTA		ACCCCGCTTCCCCTCACAC
8/9	CGAGCCCTTCATCGATGCCAAATA		CCTCGCCATTCACCAAGATGTCTC
10	GCCCATGGGCCCTAATTGCTGAG		GCGGGGCAGGGAGGTGCTC
11	CTGCCCCGCCCTGGGAACAG		GCTGGGGCGCTGAGGTGGGACTT
12_1	GCCCGCCCGCCTCTCCGTCTCC		CTTGGGGGAAGGGCTTGCTCAGG
12_2	GGCGGTCGCAGTCCCCTCCCTCAG		GGAGCCGGGCCAGAGACGGATGTC
13	CAGGCCCATGGTGGCAGGTG		CAGGGGCGGAGGTCTTCAGGAAT

Tableau XIV : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des exons de *SYN2*

<i>SYN2</i>		Primer (5' → 3')	
Exon	Forward		Reverse
1	NA		NA
2	TCGCCAATCTGCCCAACGGCTACA		AGCGGGACCTCGGGGACCCTCCTT
3	TGCTGTGGTCCTCTTCTTG		ACGAGATGGTTCACTCTGGC
4	AGGGATGTTTTGGAAATGGG		CCTCTTTGGGCCAGAGGTA
5	CTTGGGTTTTGGAAATGGG		ACTGCATCTTGAGTCCCTGC
6	CCCCAACTAATGCGTATCATATC		TTCAGAGCCCCACAATAACC
7	GAACCCGCCAAGGGTATTC		CACAAATGGGGCGCTCTG
8	CATATTGGTGGGTTTGGAGG		AGAGTTGGCTGCAATGTGG
9	AAAGTTGCATGCCCTCCTC		TGACTCCCTTTGGACAGAGC
10	GCCTGCAAAAATGGGTAGAA		ATCCCATCAACCCGTATTCA
11	CCCATTCTGAAAGATTGTACCAG		GCCTGTACTCCATTCTTTAGCC
12a	CCTTGCCATGGAGCCAC		GAGGAGAGGAGTTGGGTTTTTC
12b	CCTCTCCCAAGTCCAGTGTG		ACAGAAAGCAGCCTCAGGTC
12c	TGTGTTCTGTATTTTACATCCCAG		ATGGTGTGTTAGAGGCGG
12d	CCTCACCAGTTTGTCTCTTCC		GTCAGCTCATCGCTTGGAC
12e	GGTTGCATAAGAATCAGGTCC		CAGAAACCTGAGTGCTTTCCC
13	CTAACACACCCTTTGAGGC		TCTAGCAGCTCTGGAGCCC
14a	GTATCCTCACGTCACCGTCC		TTAAGCTGCCAGGAGTCCAC
14b	GAAGTCATCGTTTCGCTGTGA		ACACACCCTCATGGACACT

Tableau XV : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification des exons de *SYN3*

Exon	Primer (5' → 3')	
	Forward	Reverse
1	CCCCTGGCTCTTCTGGC	CTCCCCTTCTATTTCCCCAG
2	GTAAGGCCTTTGGGAGAAGG	GACCACATAAGATGGGGACC
3	CCCAATATGTGTTAACCGTTG	TTAGGTCGCAGGAAGTGGAC
4	GCCCTGCAAGTCAGTGCTAT	AGTGGGCTTGTTCGCAGAG
5	CAGATCAAGTGGGAGGTTTTG	CCCCTAGAGTCCACCTCCTC
6	GAACAAGCAGCACCCAGAG	CTGTGCTAAGGGGTTGATGG
7	CTTGTTCTGGCATAGGGTG	CCTTGGGTGCAGGAGACAG
8	GCCAAAGCAAAGAAGGAAAG	CTCTCAGGGCCTTTTGTG
9	CACTTCTCTCCCTCTACCCG	CAAAGACCATGCAGGGATTC
10	CCACTTCTGGGATGTGATGC	CTTTGGATCCAGGGGCTC
11	ATAAATGCTGCCCTCTCACC	AATCACATGTGGATCCCTCG
12	TCCTTGAAGCAACATTATTTGTG	TAACCCTGAATCAGCCAAGC
13_1	TAGCCCATCTGGCTTACAGG	GAATGTGAAAAGTAGCCACTCG
13_2	GCCTCCAGGTTCTCAAAC	GACCCTTTCCTTGGGAAGTC
13_3	GGGCCCTGTGAATGCCAC	ATAGGGGAAAGAGCACTGGG

5.2 Conditions d'amplification

Tableau XVI : Conditions d'amplification pour *SYN1*

<i>SYN1</i> Exon	Conditions réaction	Température d'hybridation	
1	Mg/Q	68(10x) 67(10x) 66(15x)	
2	Std	TD 62-55(14x) 55(21x)	
3	Q	TD 62-55(14x) 55(21x)	
4	Mg	60(35x)	
5	Mg	60(35x)	
6	Q	60(35x)	
7	Mg/Q	61(35x)	
8/9	Mg	60(35x)	
10	Q	TD 62-55(14x) 55(21x)	
11	Mg/Q	68(10x) 67(10x) 66(15x)	
12_1	Q	68(35x)	
12_2	Q	68(35x)	
13	Q	TD 62-55(14x) 55(21x)	

Légende

TD : « touchdown » PCR
Std : protocole standard
Mg : ajout 25mM MgCl₂
Q : ajout de 1 X de Bétaine
Mg/Q : ajout de 25mM MgCl₂
+1 X de Bétaine

Tableau XVII : Conditions d'amplification pour *SYN2*

SYN2 Exon	Conditions réaction	Température d'hybridation	
1	ND	ND	
2	Mg/2Q	TD 70-54(17x) 54(25x)	
3	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
4	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
5	Std	60(35x)	
6	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
7	Std	60(35x)	
8	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
9	Mg	TD 66-60(12x) 60(23x)	
10	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
11	Std	TD 66-60(12x) 60(23x)	
12a	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
12b	Std	60(35x)	
12c	Mg	TD 66-60(12x) 60(23x)	
12d	Std	TD 66-60(12x) 60(23x)	
12e	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
13	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
14a	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	
14b	Std	TD 63-56(14x) 57(21x)	

Légende
 ND : pas réussi
 TD : touchdown PCR
 Std : protocole standard
 Mg : ajout 25mM MgCl₂
 2Q/Mg : ajout de 25mM MgCl₂ + 2 X de Bétaine

Tableau XVIII : Conditions d'amplification pour *SYN3*

SYN3 Exon	Conditions réaction	Température d'hybridation	
1	Std	57(37x)	
2	Std	60(35x)	
3	Std	59(40x)	
4	Std	60(35x)	
5	Std	60(35x)	
6	Std	60(35x)	
7	Q	57(37x)	
8	Std	60(35x)	
9	Std	60(35x)	
10	Q	60(35x)	
11	Std	57(37x)	
12	Std	60(35x)	
13_1	Std	57(37x)	
13_2	Std	60(35x)	
13_3	Std	60(35x)	

Légende
 Std : protocole standard
 Q : ajout de 1 X de Bétaine

CHAPITRE 3 : Discussion et conclusion

1. Discussion

Afin de mettre en perspective les résultats présentés aux chapitres précédents, la discussion sera divisée en deux points essentiels : 1) l'hétérogénéité du phénotype; et 2) le dysfonctionnement synaptique potentiellement causé par les mutations identifiées, ainsi que les conséquences sur le développement du cerveau.

1.1 Hétérogénéité du phénotype

Une des caractéristiques des mutations retrouvées dans les gènes des synapsines est sans aucun doute l'hétérogénéité du phénotype clinique. Dans un premier temps, nous avons observé une variété de phénotype chez les individus porteurs de la mutation *SYNI*_{Q555X}, incluant épilepsie temporale, troubles du langage et autisme. Cette observation, quoique préoccupante en apparence, est néanmoins compatible avec plusieurs données de la littérature. En effet, tel que discuté au chapitre 1 (pages 5-6), l'épilepsie est fréquemment associée avec des troubles d'apprentissage, dont la dyslexie, les troubles du langage et l'autisme¹⁹⁻²². Également, les études d'agrégation familiale ont révélé une incidence accrue des troubles du langage dans la parenté du premier degré des individus autistes^{63; 70; 71}. Enfin, Garcia et ses collègues³⁶ ont identifié la mutation W356X dans *SYNI* qui est également associée à des phénotypes variés dont épilepsie (n = 7 individus), troubles d'apprentissage (n = 3 individus) et comportement agressif (n = 2 individus).

Les résultats présentés dans le chapitre 2 de ce mémoire viennent supporter davantage ces observations. En particulier, des mutations ont été identifiées dans *SYN1* chez 10 individus épileptiques ou autistes alors qu'elles n'ont pas été retrouvées chez plus de 400 chromosomes contrôles. De plus, nous avons observé qu'une même mutation (*SYN1*_{A550T}) était à la fois présente chez deux patients épileptiques ainsi que chez deux autistes, incluant une autiste avec épilepsie nocturne. Enfin, nous avons aussi repéré des mutations dans *SYN2* (n = 4) et dans *SYN3* (n = 3) chez un total de huit patients (1 épileptique, 7 autistes). Globalement, les résultats obtenus lors de cette deuxième étape du projet suggèrent que des mutations dans les trois gènes de la famille des synapsines pourraient être impliquées dans l'étiologie de l'épilepsie et de l'autisme. Nous ne pouvons exclure que certaines des variations retrouvées dans notre cohorte d'individus soient des polymorphismes rares. Cependant, la fréquence relativement élevée des mutations dans cette famille de gènes, la sévérité de certaines de ces mutations (*SYN1*_{Q555X} et *SYN2*_{A94fs199X}), et la ségrégation de certaines mutations avec la maladie suggèrent que plusieurs de ces mutations sont pathogènes. Des études fonctionnelles impliquant ces mutations, en particulier pour les faux-sens, seront néanmoins nécessaires afin de confirmer ces données préliminaires

Pour certaines de ces mutations, notamment les mutation *SYN1*_{A550T} et *SYN2*_{P253A}, nous avons observé une pénétrance incomplète (figures 14 et 18, pages 64 et 72). Comme les individus porteurs de ces mutations n'ont pu être examinés en détails, il est possible qu'ils présentent une forme plus fruste de la maladie. Il est également possible que cette pénétrance incomplète associée à une même mutation dans *SYN1* soit explicable par un phénomène de compensation par les autres membres de la famille des synapsines, ou encore par d'autres protéines ayant une fonction semblable. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par les études fonctionnelles chez la souris. En effet, alors qu'il a été observé qu'une augmentation de la fonction de *SYN1* entraîne un accroissement de la potentialisation à long terme (LTP) et donc une facilitation des apprentissages l'inactivation de *SYN1* n'altère pas ces fonctions¹⁵⁰. En revanche, la double inactivation *SYN1/SYN2* résulte en une diminution des

capacités d'apprentissage, qui n'est pas présente chez les simples mutants, ce qui suggère une compensation par *SYN2* chez les souris dépourvue de *SYN1*^{38; 151}. Il est également plausible que la grande variété observée dans les phénotypes associés aux mutations dans les synapsines soit explicable par une expression variable de ces différents gènes (*SYN1*, *SYN2*, *SYN3*) avec fonction similaire. Enfin, puisque *SYN1* est localisé sur le chromosome X, l'absence de phénotype chez les mères porteuses pourrait s'expliquer par une expression préférentielle de l'allèle normale par rapport à l'allèle muté, phénomène connu sous le nom de sélection secondaire^{152; 153}. Par exemple, il est possible de croire que la patiente porteuse de la mutation A550T, atteinte d'autisme et d'épilepsie, aurait un ratio d'inactivation différent de celui de sa mère (figure 14, page 64), ratio qui favoriserait l'expression du chromosome porteur de la mutation pour la fille et celle du chromosome normal pour la mère.

Il existe d'autres exemples dans la littérature de gènes mutés associés à des phénotypes neurologiques hétérogènes. Ainsi, des mutations dans le gène *ARX* ont été associées à un très large spectre de phénotypes, soit retard mental, autisme, épilepsie et dystonie^{154; 155}. Également, les mutations dans le gène *MECP2* localisé sur le chromosome X sont associées au syndrome de Rett. De façon intéressante, les femmes porteuses de ces mutations peuvent être asymptomatiques ou présenter une forme intermédiaire de la maladie, tel que troubles d'apprentissage, autisme ou apparition tardive du syndrome de Rett⁸⁵. L'impact de ces mêmes mutations est plus marqué chez les hommes atteints alors qu'on peut rencontrer un retard mental, des crises convulsives, une spasticité, une macrocéphalie ou un trouble bipolaire⁸⁵.

1.2 Dysfonctionnement synaptique

1.2.1 Le développement cérébral

Le développement du cerveau humain et de ses 10^{16} synapses nécessite une succession de plusieurs étapes complexes et régulées (figure 24).

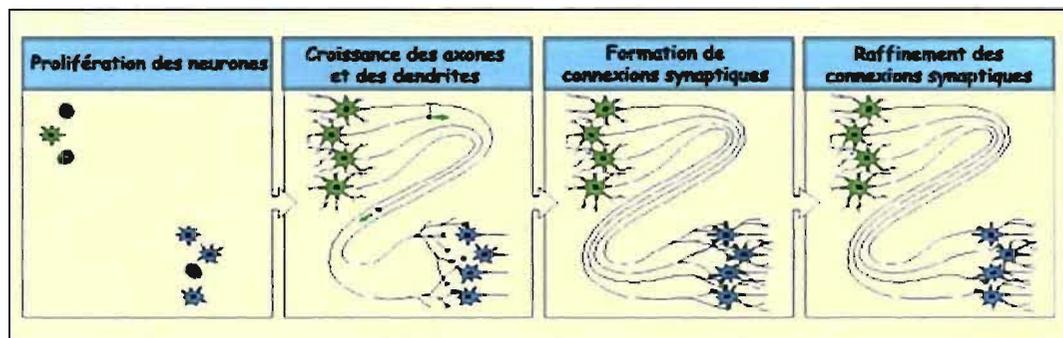


Figure 24 : Étapes de développement du cerveau.

Tirée du site www.lecerveau.mcgill.ca⁷⁶

La totalité des cellules nerveuses se développent en quelques mois, à partir des cellules souches embryonnaires situées dans le tube neural qui se différencient en cellules gliales ou neurones. Bien que les cellules gliales n'originent pas toutes des mêmes précurseurs (glioblastes du tube neural pour les astrocytes et les oligodendrocytes versus monocytes du sang pour la microglie), elles ont comme rôle d'assurer le bon fonctionnement du système nerveux alors que les neurones eux constituent l'unité fonctionnelle de base de notre cerveau. Une différenciation subséquente permet de produire plusieurs types de neurones distincts selon les différentes régions du système nerveux. Selon leur origine et leur destination, les neurones sont guidés par des molécules d'adhérence (neurones du système nerveux périphérique ou neurones constituant les noyaux) ou migrent le long d'un type particulier de cellule gliale, la glie radiale (neurones du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet). Une fois rendus à destination, les neurones allongent leur axone (axonogénèse) et leurs dendrites (dendritogénèse) afin d'établir une

connexion avec d'autres neurones. Le nombre d'interactions (synapses) est phénoménal et permet de générer un immense réseau de communication entre les cellules nerveuses. Cette étape d'élaboration d'un réseau, nommée synaptogénèse, débute dès la seconde moitié de la grossesse pour se terminer à l'adolescence. La communication entre les neurones est rendue possible grâce à l'activité rythmique spontanée générée par chacune des synapses. Ce sont les propriétés d'excitabilité des neurones et l'exocytose de neurotransmetteurs par les vésicules synaptiques qui sont la source de cette activité rythmique. Cet échange d'information entre les neurones est nommé transmission synaptique. Il s'agit d'un mécanisme essentiel au fonctionnement du système nerveux, puisque c'est ce vaste réseau de connexions qui perçoit, transmet et intègre les informations reçues sous forme de signaux chimiques et électriques et qui détermine par la suite les actions motrices à effectuer. Les principaux acteurs de ces contacts intercellulaires sont l'élément présynaptique, contenant les vésicules synaptiques (VS) chargées de neurotransmetteurs, et l'élément postsynaptique, qui contient les récepteurs spécifiques à ces neurotransmetteurs (figure 25).

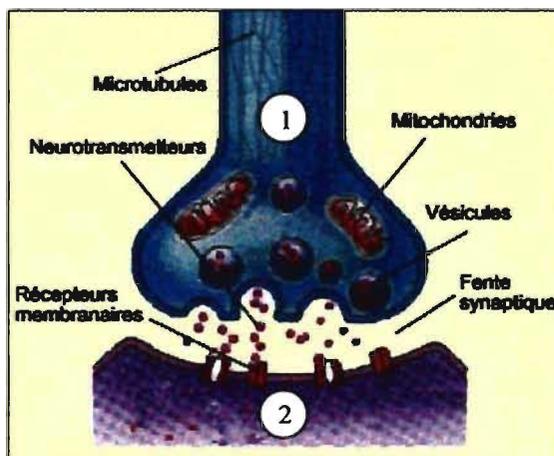


Figure 25 : Aspect général de la synapse
 (1) élément présynaptique (2) élément postsynaptique.
 Tirée du site www.lecerveau.mcgill.ca⁷⁶

Au cours de l'apprentissage, les interactions entre les cellules nerveuses augmentent et les synapses se raffinent en éliminant les synapses redondantes (élagage). La plasticité synaptique correspond aux modifications qui surviennent au niveau de la synapse au cours du développement et de l'apprentissage. Ces changements dans la structure ou dans la physiologie de la synapse résultent soit en l'augmentation (potentialisation) ou la diminution (dépression) de l'efficacité synaptique. C'est cette caractéristique fondamentale du cerveau qui permet notamment la mémorisation d'une tâche et l'apprentissage. Quant à la phase d'élimination sélective des synapses, elle a pour but d'éliminer la redondance et de favoriser la stabilisation des synapses fonctionnant le mieux. Elle amène une réduction de près de 60% des synapses lorsque le cerveau devient adulte.

1.2.2 Le dysfonctionnement synaptique et ses conséquences

Les modèles animaux ont montré que les synapsines contribuent à la stabilité du pool de réserve des VS^{38; 39; 156}, ce qui est consistant avec l'accroissement de la dépression synaptique retrouvée chez les souris déficientes en *SYN1/2*³⁸. Un désordre fonctionnel au niveau des synapsines pourrait donc mener à un épuisement du pool de réserve des VS et ainsi causer des déficits cognitifs par l'absence ou l'affaïssement de la potentialisation (LTP). Ce mécanisme a déjà été démontré chez la souris déficiente en *SYN2* mais pas chez celle déficiente en *SYN1*. Cela pourrait être attribuable à un phénomène de compensation, tel que mentionné ci-haut (page 95). Effectivement, le niveau d'expression de *SYN2* est de 71.9% par rapport à la normale chez la souris où *SYN1* est manquant³⁸. De façon intéressante, la double inactivation *SYN1/2* ou la triple inactivation *SYN1/2/3* sont caractérisées par des crises convulsives et des déficits cognitifs plus sévères chez la souris.

Il est donc vraisemblable que les mutations dans les synapsines pourraient être responsables des déficits cognitifs observés chez les patients épileptiques, autistes et dyslexiques par une dépression synaptique marquée lors des périodes de stimulation

intense (développement), tandis que l'hyperexcitabilité du cortex cérébral menant aux crises d'épilepsie pourrait être attribué au débalancement des ratios d'inhibition/excitation. Ce débalancement pourrait être créé par une sensibilité accrue des neurones GABAergiques pour une déplétion du pool de VS, puisque ceux-ci ont un haut taux de relâche en état de stimulation intensive ¹²⁹.

1.2.3 Rôle potentiel de la mutation Q555X dans l'épilepsie et les troubles du langage

La mutation Q555X est située dans un domaine hautement phosphorylée de *SYN1* et supprime du même coup les domaines D et E de la protéine (figure 10, page 53). Le domaine D spécifique de la synapsine I contient des sites de phosphorylation importants pour sa conformation, ses propriétés biochimiques, et de ses interactions avec d'autres protéines, notamment via les domaines SH3 ¹⁵⁷. En particulier, le domaine D participe à la liaison de la synapsine I avec les filaments d'actine et la membrane des VS, en plus de permettre son interaction avec d'autres protéines associées aux VS dont Rab3 ⁶⁰. Nous avons démontré que la mutation *SYN1*_{Q555X} mène à la production d'une protéine tronquée *in vitro* (figure 4, page 32). Si cette protéine tronquée est également produite *in vivo*, il est plausible que cette protéine serait dysfonctionnelle, notamment par la perte des sites de phosphorylation 2 et 3 pour la CaMKII (figure 11, page 54). En effet, la perte de ces deux sites est susceptible de causer une élévation de l'affinité de la protéine pour les VS et pour les filaments d'actine ^{158; 159}. De cette manière, l'attachement des VS au cytosquelette pré-synaptique serait favorisé, alors que leur transport à la zone active et la relâche de neurotransmetteurs seraient inhibés. Ceci mènerait vraisemblablement à un ralentissement du cycle d'endocytose/exocytose des VS. Également, le domaine E de la synapsine I, partagé par les deux autres membres de la famille des synapsines, serait responsable de l'interaction avec l'actine et modifierait sa dynamique en modulant sa polymérisation ou son enchevêtrement ¹⁶⁰. Son absence résulte en une inhibition de la relâche synaptique, caractérisée par une déplétion du pool de réserve des VS ^{136; 160}. L'absence du domaine E causée par la mutation Q555X pourrait donc

contribuer davantage au ralentissement de la transmission synaptique. Enfin, la mutation Q555X pourrait être associée à une dégradation prématurée de son ARNm, ce qui pourrait entraver la production de la protéine *SYNI*¹⁶¹. L'absence de *SYNI* cause l'épilepsie chez la souris¹³⁷⁻¹³⁹. De façon intéressante, l'étude de ces souris KO a montré que le ralentissement de la transmission synaptique est plus marqué pour les synapses inhibitrices. Un tel déséquilibre du ratio inhibition/excitation expliquerait l'épilepsie dans ce modèle. Il est donc vraisemblable que le ralentissement de la transmission synaptique créé par la mutation Q555X (voir figure 5, page 33) cause l'épilepsie par un phénomène similaire chez les patients de la famille AB.

En ce qui a trait aux troubles du langage et de comportement, il est important de rappeler que les souris KO pour les synapsines présentent des troubles cognitifs, en l'absence de lésion structurale détectable. À cet égard, une perturbation de la transmission synaptique à des étapes déterminantes du développement du cerveau pourrait expliquer les anomalies de la cognition rencontrées chez les individus porteurs de la mutation *SYNI*_{Q555X}. En particulier, les variations dans la balance inhibition/excitation peuvent être suffisantes pour changer les patrons de connexions entre les différentes régions du cerveau menant ainsi à des déficits développementaux et comportementaux¹⁶²⁻¹⁶⁵. Enfin, en plus de son rôle dans la relâche des VS, l'absence de *SYNI* a été associée à des anomalies de la croissance neuronale et de la synaptogénèse^{144;166}, deux processus clés dans l'élaboration du réseau cortical.

1.2.4 Rôles potentiels des mutations faux-sens dans les synapsines dans l'épilepsie et l'autisme

Un simple changement de nucléotide dans un gène ou à proximité d'un gène peut affecter l'expression ou la fonction de la protéine produite. À juste titre, environ 50% des variations génétiques associées à des maladies sont des mutations faux-sens¹⁶⁷. Dans cette section, nous émettons des hypothèses afin de prédire comment les mutations faux-sens dans les synapsines pourraient mener à la maladie.

1.2.4.1 *SYNI*

- A550T et T567A: Tel que mentionné au chapitre 2, ces deux acides aminés sont situés dans le domaine D de la protéine, domaine contenant de nombreux sites de phosphorylation. Il est possible que la mutation A550T rende inaccessible ou non fonctionnel les sites de phosphorylation 6 (MAPK et CDK5) et 7 (CDK5) en position 549 et 551 de *SYNI* (voir figure 11, page 54). La phosphorylation par les MAPK semble altérer la mobilité de la protéine et décroît son affinité pour l'actine¹⁶⁸ tandis que la phosphorylation par CDK5 inhibe la polymérisation de l'actine¹³¹. Il est donc possible que le cycle de relâche des VS soit ralenti par la hausse d'affinité de la synapsine I pour l'actine ainsi que par un recyclage déficient des VS due à une mobilité réduite de la synapsine I. Un mécanisme similaire pourrait être en cause pour la mutation T567A, puisque deux sites de phosphorylation pour la CaMKII sont présents en position 566 et 570. En effet, des études⁵⁸ ont démontré que des mutations dans les sites de phosphorylation pour la CaMKII entraînaient une dispersion moins rapide de la synapsine I ainsi qu'un ralentissement de l'exocytose des VS.

- A51G : La mutation A51G est située dans ce qui pourrait être un site de phosphorylation pour la kinase GSK3 (ELM). Ce site n'est pas mentionné dans les études portant sur la synapsine I. Cependant, des études récentes ont montré l'implication de GSK3 dans la plasticité synaptique^{169; 170}. En effet, il semble que l'inhibition de la GSK-3 contribuerait à augmenter l'expression et la dispersion de la synapsine I¹⁷⁰, ce qui aurait comme conséquence de favoriser la transmission synaptique. En supposant que ce site est bien réel, la mutation A51G pourrait donc ralentir la transmission synaptique et ainsi inhiber l'induction de la LTP en favorisant la phosphorylation de la synapsine I par GSK3.

1.2.4.2 SYN2

- P253A et Y236S : Ces mutations sont toutes deux localisées dans le domaine C de la protéine, domaine le plus conservé entre les différentes synapsines. Le domaine C est impliqué dans les interactions avec l'actine, les VS et l'ATP, ainsi que dans l'homo- et l'hétérodimérisation des synapsines. Une altération d'un site de liaison ou un repliement anormal de la protéine causé par ces mutations pourraient affecter une de ces interactions et ainsi compromettre la fonction synaptique. Enfin, l'ajout d'un résidu sérine pourrait avoir un impact fonctionnel par la création d'un site de phosphorylation pour une kinase.
- G464R : Cette mutation non conservatrice (non polaire, neutre → polaire, chargé positivement) localisée dans le domaine G pourrait affecter le repliement de la protéine par un changement dans sa structure tertiaire. Cela aurait pour effet de cacher des sites d'interactions pour d'autres partenaires. Bien que ce domaine soit peu connu, il semble interagir avec la kinase c-Src¹⁷¹. Le rôle de cette kinase dans la plasticité synaptique est encore inconnu. Cependant, la phosphorylation par Src augmenterait l'affinité des synapsines

pour l'actine et les VS ¹⁷². De plus, son absence a peu d'impact sur la fonction synaptique ¹⁷³, ce qui laisse suspecter une fonction redondante.

1.2.4.3 SYN3

- A15V : Cet acide aminé est situé dans le domaine A, plus précisément dans ce qui pourrait être un site de phosphorylation pour la kinase CK1 (ELM). Toutefois, cette liaison n'est pas rapportée dans la littérature. En ce qui a trait au domaine A plus particulièrement, il s'agit d'un domaine conservé dans tous les isoformes de la famille et assure l'interaction avec les VS par des sites de liaison pour les kinases PKA et CaMKI.
- A277T : Cette substitution d'un acide aminé non polaire pour un acide aminé polaire pourrait également avoir un impact sur la conformation de la structure protéique. En effet, un résidu polaire cherchera à rester à l'extérieur de la structure protéique contrairement à un résidu non polaire qui se localisera au centre de la molécule. Cela pourrait entraver la fonction du domaine C, domaine conservé entre les synapsines et connu pour ses interactions avec l'actine, l'ATP, les VS et les autres synapsines.
- R554P : Cette mutation non conservatrice (polaire, chargé positivement → non polaire, neutre) dans le domaine E de la protéine pourrait affecter la structure protéique par son changement de charge et aussi par son changement de polarité. Cela pourrait nuire aux interactions protéines-protéines spécifique à ce domaine. Rappelons-nous que ce domaine est conservé entre les synapsines et est impliqué dans la cinétique de relâche des VS par son rôle dans le maintien du pool de réserve ¹³⁶.

En attendant les résultats des études fonctionnelles, les mécanismes par lesquels les mutations faux-sens dans les synapsines mènent à une anomalie de la transmission synaptique demeurent hypothétiques. D'autres types d'études pourraient être envisageables afin de déterminer l'impact de ces mutations, dont notamment des études visant à comparer la localisation subcellulaire des synapsines mutées par rapport aux synapsines sauvages et ce à partir de cultures neuronales¹⁷⁴ ou encore des études de neurophysiologie cellulaire où l'on pourrait mesurer l'effet des mutations sur l'efficacité de la transmission synaptique¹⁷⁵. Cependant, nos résultats viennent supporter les études ayant identifié des mutations dans les gènes synaptiques chez des patients autistes. En effet, les mutations identifiées dans les gènes *NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK3* et *NRXN1* ont ouvert la voie à de nombreuses études portant sur l'importance des gènes synaptiques dans le développement du cerveau et des fonctions cognitives (voir figure 26). Plus encore, une récente étude¹⁷⁶ a démontré qu'une mutation faux-sens dans la *NLGN3* augmente la transmission synaptique inhibitrice chez la souris. Cela renforce donc l'hypothèse voulant que l'autisme puisse être causé par un déséquilibre de la balance inhibition/excitation. Les mutations dans les synapsines pourraient donc représenter une preuve supplémentaire de ce mécanisme moléculaire.

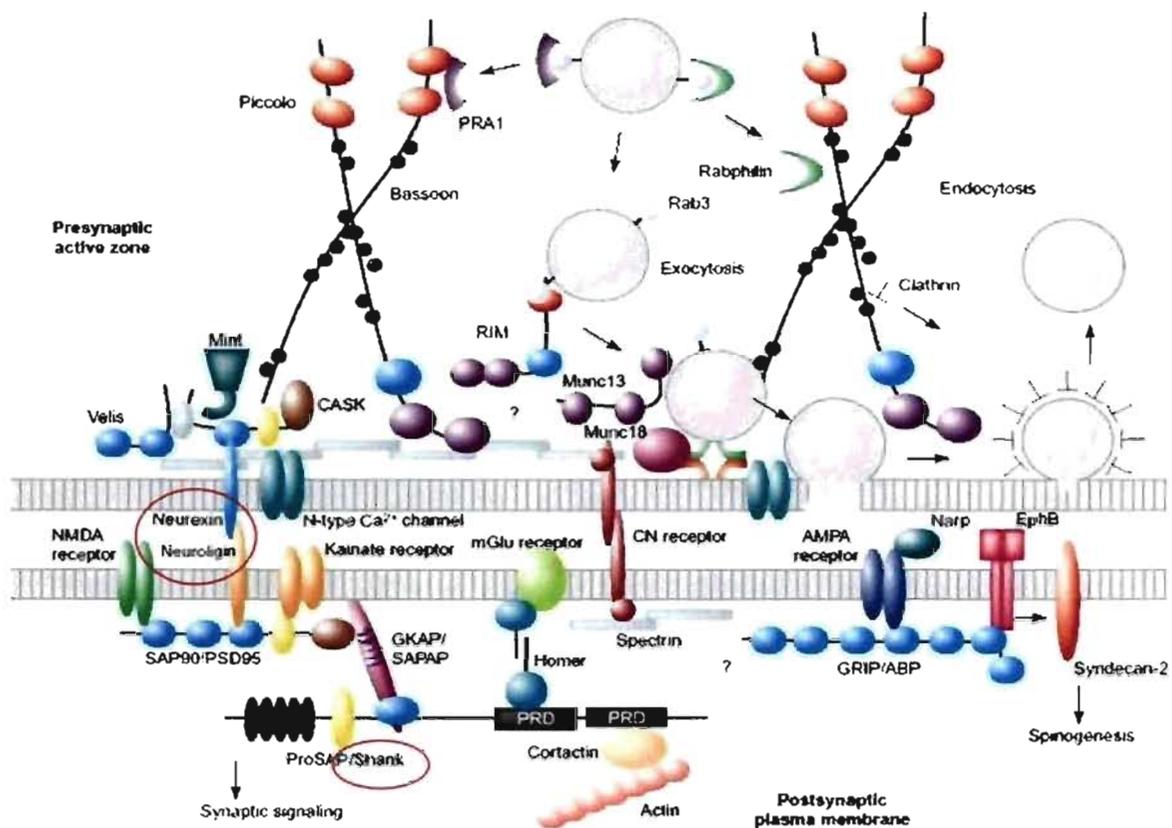


Figure 26 : Complexe multimérique des protéines synaptiques retrouvées dans le SNC. Les gènes impliqués dans l'autisme sont encadrés en rouge. Les synapsines pourraient être ajoutées en tant que protéines liant les VS et les filaments d'actine (non montrés). Tirée de Garner CC. 2002 ¹⁷⁷

2. Conclusion

Dans le chapitre 1 de ce mémoire, nous avons démontré que des mutations dans la synapsine I sont associées à des phénotypes variés incluant l'épilepsie, les troubles du langage et l'autisme. Dans le chapitre 2, nous avons montré que des mutations dans *SYN1*, de même que dans deux autres gènes de la famille des synapsines (*SYN2* et *SYN3*), sont également associées à l'autisme et à l'épilepsie temporale. Il est vraisemblable qu'une proportion significative des mutations retrouvées dans ces gènes perturbe la transmission synaptique et ultimement, le développement normal du cerveau. Bien que les manifestations cliniques soient variées chez les individus porteurs de ces mutations, les phénotypes observés sont compatibles avec ceux observés chez l'animal dépourvu de synapsines (troubles cognitifs et épilepsie). Un continuum clinique entre ces divers troubles neurologiques est également compatible avec la présence d'une co-morbidité préalablement observée en clinique et dans les études d'agrégation familiale. Nos résultats confirment chez l'humain qu'une perturbation des mécanismes de relâche des vésicules synaptiques constitue un mécanisme important dans l'épileptogénèse, tel que suggéré par les études animales

37-39

D'autres études ont montré l'implication des gènes synaptiques dans l'étiologie de l'autisme^{68; 102; 103; 107}. Cependant, la découverte de mutations dans les gènes de la famille des synapsines demeure la première évidence qu'un dysfonctionnement de la fonction présynaptique peut mener à des troubles du développement cognitif chez l'humain. Cela a pour conséquence d'attirer tous les regards sur les gènes ayant une fonction semblable aux synapsines, ainsi que sur leurs partenaires d'interactions au niveau de la synapse, en vue d'incriminer d'autres gènes impliqués dans les maladies neurodéveloppementales.

BIBLIOGRAPHIE

1. OMS (2005) Tableau de l'épilepsie: perspective historique. *Epilepsie Canada*
2. International League Against Epilepsy: <http://www.ilae-epilepsy.org>
3. Miles R (2000) Perspectives: neurobiology. Diversity in inhibition. *Science* 287:244-246
4. Fisher PD, Sperber EF, Moshe SL (1998) Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev* 20:563-573
5. Allen I (1945) Observation on cases of reflex epilepsy. *N Z Med J* 44:135-142
6. Keipert J (1969) Epilepsy precipitated by bathing: water-immersion epilepsy. *Aust Paediatr J* 5:244-247
7. Kurata S (1979) Epilepsy precipitated by bathing: a follow up study. *Brain Dev* 11:400-405
8. Szymonowicz W, Meloff KL (1978) Hot water epilepsy. *Can J Neurol Sci* 5:247-251
9. Stensman R, Ursing B (1971) Epilepsy precipitated by hot water immersion. *Neurology* 21:559-562
10. Satishchandra P, Shivaramakrishana A, Kaliaperumal VG, Schoenberg BS (1988) Hot-water epilepsy: a variant of reflex epilepsy in southern India. *Epilepsia* 29:52-56
11. Mani KS, Mani AJ, Ramesh CK (1974) Hot-water epilepsy--a peculiar type of reflex epilepsy: clinical and EEG features in 108 cases. *Trans Am Neurol Assoc* 99:224-226
12. Bebek N, Gurses C, Gokyigit A, Baykan B, Ozkara C, Derwent A (2001) Hot water epilepsy: clinical and electrophysiologic findings based on 21 cases. *Epilepsia* 42:1180-1184
13. Erdem E, Topcu M, Renda Y, Ciger A, Varli K, Zileli T (1992) Hot water epilepsy. *Clin Electroencephalogr* 23:152-158
14. Ioos C, Fohlen M, Villeneuve N, Badinand-Hubert N, Jalin C, Cheliout-Heraut F, Pinard JM (2000) Hot water epilepsy: a benign and unrecognized form. *J Child Neurol* 15:125-128
15. Roos RA, van Dijk JG (1988) Reflex-epilepsy induced by immersion in hot water. Case report and review of the literature. *Eur Neurol* 28:6-10

16. Satishchandra P (2003) Hot-water epilepsy. *Epilepsia* 44 Suppl 1:29-32
17. Tezer FI, Ertas N, Yalcin D, Saygi S (2006) Hot water epilepsy with cerebral lesion: a report of five cases with cranial MRI findings. *Epilepsy Behav* 8:672-676
18. Cassidy SB (1997) Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 34:917-923
19. Schachter SC, Galaburda AM, Ransil BJ (1993) Associations of dyslexia with epilepsy, handedness, and gender. *Ann N Y Acad Sci* 682:402-403
20. Landau WM, Kleffner FR (1957) Syndrome of acquired aphasia with convulsive disorder in children. *Neurology* 7:523-530
21. Rapin I (1997) Autism. *N Engl J Med* 337:97-104
22. Olsson I, Steffenburg S, Gillberg C (1988) Epilepsy in autism and autisticlike conditions. A population-based study. *Arch Neurol* 45:666-668
23. Fisher SE, DeFries JC (2002) Developmental dyslexia: genetic dissection of a complex cognitive trait. *Nat Rev Neurosci* 3:767-780
24. Habib M (2000) The neurological basis of developmental dyslexia: an overview and working hypothesis. *Brain* 123 Pt 12:2373-2399
25. Ramus F (2001) Dyslexia. Talk of two theories. *Nature* 412:393-395
26. Berkovic SF, McIntosh A, Howell RA, Mitchell A, Sheffield LJ, Hopper JL (1996) Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol* 40:227-235
27. Kjeldsen MJ, Sorensen TT, Friis ML (1996) [Genetic aspects of epilepsy]. *Nord Med* 111:275-278
28. Annegers JF, Hauser WA, Anderson VE, Kurland LT (1982) The risks of seizure disorders among relatives of patients with childhood onset epilepsy. *Neurology* 32:174-179
29. Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL (1998) Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol* 43:435-445
30. Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S (2006) Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci* 29:391-397
31. Gourfinkel-An I, Baulac S, Nabbout R, Ruberg M, Baulac M, Brice A, LeGuern E (2004) Monogenic idiopathic epilepsies. *Lancet Neurol* 3:209-218
32. Meisler MH, Kearney J, Ottman R, Escayg A (2001) Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Annu Rev Genet* 35:567-588

33. Noebels JL (2003) The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci* 26:599-625
34. Feng HJ, Naritoku DK, Randall ME, Faingold CL (2001) Modulation of audiogenically kindled seizures by gamma-aminobutyric acid-related mechanisms in the amygdala. *Exp Neurol* 172:477-481
35. Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21:1315-1325
36. Garcia CC, Blair HJ, Seager M, Coulthard A, Tennant S, Buddles M, Curtis A, Goodship JA (2004) Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J Med Genet* 41:183-186
37. Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC (1993) Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 75:661-670
38. Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC (1995) Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375:488-493
39. Li L, Chin LS, Shupliakov O, Brodin L, Sihra TS, Hvalby O, Jensen V, Zheng D, McNamara JO, Greengard P, et al. (1995) Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9235-9239
40. Ryan TA, Li L, Chin LS, Greengard P, Smith SJ (1996) Synaptic vesicle recycling in synapsin I knock-out mice. *J Cell Biol* 134:1219-1227
41. Strachan, T. and Read, AP. (1999). Genetic mapping of mendelian characters. In *Human molecular genetics-second edition*, F. Kingston, L. Mansell and J. Ray, eds. (Oxford: BIOS Scientific).
42. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996-1006
43. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, et al. (2007) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*
44. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
45. Hill RS, Walsh CA (2005) Molecular insights into human brain evolution. *Nature* 437:64-67

46. Valtorta F, Benfenati F, Greengard P (1992) Structure and function of the synapsins. *J Biol Chem* 267:7195-7198
47. Hinshelwood J (1895) Word blindness and visual memories. *Lancet* 2:1566-1570
48. Shaywitz SE (1998) Dyslexia. *N Engl J Med* 338:307-312
49. Bishop DV, Adams C (1990) A prospective study of the relationship between specific language impairment, phonological disorders and reading retardation. *J Child Psychol Psychiatry* 31:1027-1050
50. DeFries JC, Fulker DW, LaBuda MC (1987) Evidence for a genetic aetiology in reading disability of twins. *Nature* 329:537-539
51. Hannula-Jouppi K, Kaminen-Ahola N, Taipale M, Eklund R, Nopola-Hemmi J, Kaariainen H, Kere J (2005) The axon guidance receptor gene *ROBO1* is a candidate gene for developmental dyslexia. *PLoS Genet* 1:e50
52. Taipale M, Kaminen N, Nopola-Hemmi J, Haltia T, Myllyluoma B, Lyytinen H, Muller K, Kaaranen M, Lindsberg PJ, Hannula-Jouppi K, Kere J (2003) A candidate gene for developmental dyslexia encodes a nuclear tetratricopeptide repeat domain protein dynamically regulated in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11553-11558
53. Cope N, Harold D, Hill G, Moskvina V, Stevenson J, Holmans P, Owen MJ, O'Donovan MC, Williams J (2005) Strong evidence that *KIAA0319* on chromosome 6p is a susceptibility gene for developmental dyslexia. *Am J Hum Genet* 76:581-591
54. Schumacher J, Anthoni H, Dahdouh F, Konig IR, Hillmer AM, Kluck N, Manthey M, Plume E, Warnke A, Remschmidt H, Hulsmann J, Cichon S, Lindgren CM, Propping P, Zucchelli M, Ziegler A, Peyrard-Janvid M, Schulte-Korne G, Nothen MM, Kere J (2006) Strong genetic evidence of *DCDC2* as a susceptibility gene for dyslexia. *Am J Hum Genet* 78:52-62
55. Raskind WH, Igo RP, Chapman NH, Berninger VW, Thomson JB, Matsushita M, Brkanac Z, Holzman T, Brown M, Wijsman EM (2005) A genome scan in multigenerational families with dyslexia: Identification of a novel locus on chromosome 2q that contributes to phonological decoding efficiency. *Mol Psychiatry* 10:699-711
56. Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Brustein E (2002) Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog Neurobiol* 68:85-111
57. Ferreira A, Rapoport M (2002) The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci* 59:589-595
58. Chi P, Greengard P, Ryan TA (2001) Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nat Neurosci* 4:1187-1193

59. Onofri F, Giovedi S, Kao HT, Valtorta F, Bongiorno Borbone L, De Camilli P, Greengard P, Benfenati F (2000) Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains. *J Biol Chem* 275:29857-29867
60. Giovedi S, Darchen F, Valtorta F, Greengard P, Benfenati F (2004) Synapsin is a novel Rab3 effector protein on small synaptic vesicles. II. Functional effects of the Rab3A-synapsin I interaction. *J Biol Chem* 279:43769-43779
61. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP (2001) A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413:519-523
62. Folstein SE, Santangelo SL, Gilman SE, Piven J, Landa R, Lainhart J, Hein J, Wzorek M (1999) Predictors of cognitive test patterns in autism families. *J Child Psychol Psychiatry* 40:1117-1128
63. Piven J, Palmer P, Landa R, Santangelo S, Jacobi D, Childress D (1997) Personality and language characteristics in parents from multiple-incidence autism families. *Am J Med Genet* 74:398-411
64. Enard W, Przeworski M, Fisher SE, Lai CS, Wiebe V, Kitano T, Monaco AP, Paabo S (2002) Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature* 418:869-872
65. Rojas DC, Camou SL, Reite ML, Rogers SJ (2005) Planum temporale volume in children and adolescents with autism. *J Autism Dev Disord* 35:479-486
66. Cantalupo C, Hopkins WD (2001) Asymmetric Broca's area in great apes. *Nature* 414:505
67. Gannon PJ, Holloway RL, Broadfield DC, Braun AR (1998) Asymmetry of chimpanzee planum temporale: humanlike pattern of Wernicke's brain language area homolog. *Science* 279:220-222
68. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, 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. *Nat Genet* 34:27-29
69. Kjelgaard MM, Tager-Flusberg H (2001) An Investigation of Language Impairment in Autism: Implications for Genetic Subgroups. *Lang Cogn Process* 16:287-308
70. Piven J, Palmer P (1997) Cognitive deficits in parents from multiple-incidence autism families. *J Child Psychol Psychiatry* 38:1011-1021

71. Piven J, Palmer P, Jacobi D, Childress D, Arndt S (1997) Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry* 154:185-190
72. Bolton P, Macdonald H, Pickles A, Rios P, Goode S, Crowson M, Bailey A, Rutter M (1994) A case-control family history study of autism. *J Child Psychol Psychiatry* 35:877-900
73. Szatmari P, Jones MB, Holden J, Bryson S, Mahoney W, Tuff L, MacLean J, White B, Bartolucci G, Schutz C, Robinson P, Hoult L (1996) High phenotypic correlations among siblings with autism and pervasive developmental disorders. *Am J Med Genet* 67:354-360
74. Dawson G, Webb S, Schellenberg GD, Dager S, Friedman S, Aylward E, Richards T (2002) Defining the broader phenotype of autism: genetic, brain, and behavioral perspectives. *Dev Psychopathol* 14:581-611
75. Bleuler E (1911) *Dementia praecox ou Groupe des schizophrénies*. Epel, Paris
76. Kanner L (1943) Autistic disturbance of affective contact. *Nervous Child* 2:217-250
77. Asperger H (1944) Die 'aunstisehen Psychopathen' im Kindesalter. *Archiv fur psychiatrie und Nervenkrankheiten* 117:76-136
78. Wing L (1981) Asperger's syndrome: A clinical account. *Psychological Medicine* 11:115-130
79. Fombonne E (2002) Epidemiological trends in rates of autism. *Mol Psychiatry* 7 Suppl 2:S4-6
80. Tremblay, G (2007) Les troubles envahissants du développement: L'autisme et autres troubles. *Psychologie Québec Mars 2007* p22-26.
81. Le Couteur A, Rutter M, Lord C, Rios P, Robertson S, Holdgrafer M, McLennan J (1989) Autism diagnostic interview: a standardized investigator-based instrument. *J Autism Dev Disord* 19:363-387
82. Lord C, Rutter M, Goode S, Heemsbergen J, Jordan H, Mawhood L, Schopler E (1989) Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J Autism Dev Disord* 19:185-212
83. Palmen SJ, van Engeland H, Hof PR, Schmitz C (2004) Neuropathological findings in autism. *Brain* 127:2572-2583
84. Courchesne E, Carper R, Akshoomoff N (2003) Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *JAMA* 290:337-344

85. Zoghbi HY (2003) Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science* 302:826-830
86. Folstein S, Rutter M (1977) Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 18:297-321
87. Rutter M, Andersen-Wood L, Beckett C, Bredekamp D, Castle J, Groothues C, Kreppner J, Keaveney L, Lord C, O'Connor TG (1999) Quasi-autistic patterns following severe early global privation. English and Romanian Adoptees (ERA) Study Team. *J Child Psychol Psychiatry* 40:537-549
88. Klauck SM (2006) Genetics of autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet* 14:714-720
89. Jamain S, Betancur C, Giros B, Leboyer M, Bourgeron T (2003) [Genetics of autism: from genome scans to candidate genes]. *Med Sci (Paris)* 19:1081-1090
90. Depienne C, Heron D, Betancur C, Benyahia B, Trouillard O, Bouteiller D, Verloes A, LeGuern E, Leboyer M, Brice A (2007) Autism, language delay and mental retardation in a patient with 7q11 duplication. *J Med Genet* 44:452-458
91. Rogers SJ, Wehner DE, Hagerman R (2001) The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr* 22:409-417
92. Lauritsen M, Ewald H (2001) The genetics of autism. *Acta Psychiatr Scand* 103:411-427
93. Hara H (2007) Autism and epilepsy: A retrospective follow-up study. *Brain Dev*
94. Chakrabarti S, Fombonne E (2005) Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry* 162:1133-1141
95. Bolton PF, Griffiths PD (1997) Association of tuberous sclerosis of temporal lobes with autism and atypical autism. *Lancet* 349:392-395
96. Folstein SE, Rosen-Sheidley B (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2:943-955
97. Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR (2005) Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med* 353:1694-1701
98. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC, Prieur M, Vekemans M, Carter NP, Munnich A, Colleaux L, Philippe A (2006) Array-based comparative genomic

hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* 43:843-849

99. Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L (2006) Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 11:1, 18-28

100. Santangelo SL, Tsatsanis K (2005) What is known about autism: genes, brain, and behavior. *Am J Pharmacogenomics* 5:71-92

101. Torniero C, dalla Bernardina B, Novara F, Vetro A, Ricca I, Darra F, Pramparo T, Guerrini R, Zuffardi O (2007) Cortical dysplasia of the left temporal lobe might explain severe expressive-language delay in patients with duplication of the Williams-Beuren locus. *Eur J Hum Genet* 15:62-67

102. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39:25-27

103. Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, Cook EH, Jr., Skinner C, Schwartz CE, Sommer SS (2006) High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett* 409:10-13

104. Klauck SM, Felder B, Kolb-Kokocinski A, Schuster C, Chiocchetti A, Schupp I, Wellenreuther R, Schmotzer G, Poustka F, Breitenbach-Koller L, Poustka A (2006) Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. *Mol Psychiatry* 11:1073-1084

105. Wickelgren I (2005) Neurology. Autistic brains out of synch? *Science* 308:1856-1858

106. Splawski I, Yoo DS, Stotz SC, Cherry A, Clapham DE, Keating MT (2006) CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *J Biol Chem* 281:22085-22091

107. Laumonier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74:552-557

108. Coutinho AM, Oliveira G, Katz C, Feng J, Yan J, Yang C, Marques C, Ataide A, Miguel TS, Borges L, Almeida J, Correia C, Currais A, Bento C, Mota-Vieira L, Temudo T, Santos M, Maciel P, Sommer SS, Vicente AM (2007) MECP2 coding

sequence and 3'UTR variation in 172 unrelated autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144:475-483

109. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23:185-188

110. Anderson PL, Meier-Hedde R (2001) Early case reports of dyslexia in the United States and Europe. *J Learn Disabil* 34:9-21

111. Gitler D, Takagishi Y, Feng J, Ren Y, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Greengard P, Augustine GJ (2004) Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 24:11368-11380

112. Shaywitz SE, Shaywitz BA, Fletcher JM, Escobar MD (1990) Prevalence of reading disability in boys and girls. Results of the Connecticut Longitudinal Study. *JAMA* 264:998-1002

113. Rumsey JM (1992) The biology of developmental dyslexia. *JAMA* 268:912-915

114. Rutter M, Caspi A, Fergusson D, Horwood LJ, Goodman R, Maughan B, Moffitt TE, Meltzer H, Carroll J (2004) Sex differences in developmental reading disability: new findings from 4 epidemiological studies. *JAMA* 291:2007-2012

115. Tuchman R, Rapin I (2002) Epilepsy in autism. *Lancet Neurol* 1:352-358

116. Pennington BF, Lefly DL (2001) Early reading development in children at family risk for dyslexia. *Child Dev* 72:816-833

117. Willcutt EG, Pennington BF, Boada R, Ogline JS, Tunick RA, Chhabildas NA, Olson RK (2001) A comparison of the cognitive deficits in reading disability and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Abnorm Psychol* 110:157-172

118. Conti-Ramsden G, Simkin Z, Botting N (2006) The prevalence of autistic spectrum disorders in adolescents with a history of specific language impairment (SLI). *J Child Psychol Psychiatry* 47:621-628

119. McArthur GM, Hogben JH, Edwards VT, Heath SM, Mengler ED (2000) On the "specifics" of specific reading disability and specific language impairment. *J Child Psychol Psychiatry* 41:869-874

120. Shastri BS (2007) Developmental dyslexia: an update. *J Hum Genet* 52:104-109

121. Harold D, Paracchini S, Scerri T, Dennis M, Cope N, Hill G, Moskvina V, Walter J, Richardson AJ, Owen MJ, Stein JF, Green ED, O'Donovan MC, Williams J, Monaco AP (2006) Further evidence that the KIAA0319 gene confers susceptibility to developmental dyslexia. *Mol Psychiatry* 11:1085-1091, 1061

122. Meng H, Smith SD, Hager K, Held M, Liu J, Olson RK, Pennington BF, DeFries JC, Gelernter J, O'Reilly-Pol T, Somlo S, Skudlarski P, Shaywitz SE, Shaywitz BA, Marchione K, Wang Y, Paramasivam M, LoTurco JJ, Page GP, Gruen JR (2005) DCDC2 is associated with reading disability and modulates neuronal development in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17053-17058
123. Marino C, Citterio A, Giorda R, Facoetti A, Menozzi G, Vanzin L, Lorusso ML, Nobile M, Molteni M (2007) Association of short-term memory with a variant within DYX1C1 in developmental dyslexia. *Genes Brain Behav*
124. Rosen GD, Bai J, Wang Y, Fiondella CG, Threlkeld SW, Loturco JJ, Galaburda AM (2007) Disruption of Neuronal Migration by RNAi of *Dyx1c1* Results in Neocortical and Hippocampal Malformations. *Cereb Cortex*
125. Paracchini S, Thomas A, Castro S, Lai C, Paramasivam M, Wang Y, Keating BJ, Taylor JM, Hacking DF, Scerri T, Francks C, Richardson AJ, Wade-Martins R, Stein JF, Knight JC, Copp AJ, Loturco J, Monaco AP (2006) The chromosome 6p22 haplotype associated with dyslexia reduces the expression of KIAA0319, a novel gene involved in neuronal migration. *Hum Mol Genet* 15:1659-1666
126. Galaburda AM, LoTurco J, Ramus F, Fitch RH, Rosen GD (2006) From genes to behavior in developmental dyslexia. *Nat Neurosci* 9:1213-1217
127. Galaburda AM, Sherman GF, Rosen GD, Aboitiz F, Geschwind N (1985) Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies. *Ann Neurol* 18:222-233
128. Humphreys P, Kaufmann WE, Galaburda AM (1990) Developmental dyslexia in women: neuropathological findings in three patients. *Ann Neurol* 28:727-738
129. Baldelli P, Fassio A, Corradi A, Cremona O, Valtorta F, Benfenati F (2005) Synapsins and neuroexocytosis: recent views from functional studies on synapsin null mutant mice. *Arch Ital Biol* 143:113-126
130. Kao HT, Porton B, Hilfiker S, Stefani G, Pieribone VA, DeSalle R, Greengard P (1999) Molecular evolution of the synapsin gene family. *J Exp Zool* 285:360-377
131. Yamagata Y (2003) New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and differential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation in vivo. *J Pharmacol Sci* 93:22-29
132. Hosaka M, Hammer RE, Sudhof TC (1999) A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* 24:377-387
133. Mienville, Jean-Marc Notes de cours en neurobiologie, Université de Nice-Sophia Antipolis, France, <http://www.unice.fr/JMM/Cours/Neuro.pdf>, p.9

134. Benfenati F, Onofri F, Giovedi S (1999) Protein-protein interactions and protein modules in the control of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:243-257
135. Feng J, Chi P, Blanpied TA, Xu Y, Magarinos AM, Ferreira A, Takahashi RH, Kao HT, McEwen BS, Ryan TA, Augustine GJ, Greengard P (2002) Regulation of neurotransmitter release by synapsin III. *J Neurosci* 22:4372-4380
136. Hilfiker S, Schweizer FE, Kao HT, Czernik AJ, Greengard P, Augustine GJ (1998) Two sites of action for synapsin domain E in regulating neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 1:29-35
137. Humeau Y, Doussau F, Vitiello F, Greengard P, Benfenati F, Poulain B (2001) Synapsin controls both reserve and releasable synaptic vesicle pools during neuronal activity and short-term plasticity in *Aplysia*. *J Neurosci* 21:4195-4206
138. Pieribone VA, Shupliakov O, Brodin L, Hilfiker-Rothenfluh S, Czernik AJ, Greengard P (1995) Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375:493-497
139. Takei Y, Harada A, Takeda S, Kobayashi K, Terada S, Noda T, Takahashi T, Hirokawa N (1995) Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. *J Cell Biol* 131:1789-1800
140. Terada S, Tsujimoto T, Takei Y, Takahashi T, Hirokawa N (1999) Impairment of inhibitory synaptic transmission in mice lacking synapsin I. *J Cell Biol* 145:1039-1048
141. Brenner RP (2004) EEG in convulsive and nonconvulsive status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 21:319-331
142. Ferreira A, Chin LS, Li L, Lanier LM, Kosik KS, Greengard P (1998) Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development. *Mol Med* 4:22-28
143. Ferreira A, Han HQ, Greengard P, Kosik KS (1995) Suppression of synapsin II inhibits the formation and maintenance of synapses in hippocampal culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9225-9229
144. Chin LS, Li L, Ferreira A, Kosik KS, Greengard P (1995) Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9230-9234
145. Ferreira A, Kao HT, Feng J, Rapoport M, Greengard P (2000) Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. *J Neurosci* 20:3736-3744
146. Hosaka M, Sudhof TC (1998) Synapsin III, a novel synapsin with an unusual regulation by Ca²⁺. *J Biol Chem* 273:13371-13374

147. Rosales JL, Nodwell MJ, Johnston RN, Lee KY (2000) Cdk5/p25(nck5a) interaction with synaptic proteins in bovine brain. *J Cell Biochem* 78:151-159
148. Benfenati F, Valtorta F, Rubenstein JL, Gorelick FS, Greengard P, Czernik AJ (1992) Synaptic vesicle-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* 359:417-420
149. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelemtter J, Gejman PV (2003) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 12:205-216
150. Kushner SA, Elgersma Y, Murphy GG, Jaarsma D, van Woerden GM, Hojjati MR, Cui Y, LeBoutillier JC, Marrone DF, Choi ES, De Zeeuw CI, Petit TL, Pozzo-Miller L, Silva AJ (2005) Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J Neurosci* 25:9721-9734
151. Silva AJ, Rosahl TW, Chapman PF, Marowitz Z, Friedman E, Frankland PW, Cestari V, Cioffi D, Sudhof TC, Bourtschuladze R (1996) Impaired learning in mice with abnormal short-lived plasticity. *Curr Biol* 6:1509-1518
152. Migeon BR (1998) Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells. *Cytogenet Cell Genet* 80:142-148
153. Migeon BR, Haisley-Royster C (1998) Familial skewed X inactivation and X-linked mutations: unbalanced X inactivation is a powerful means to ascertain X-linked genes that affect cell proliferation. *Am J Hum Genet* 62:1555-1557; author reply 1557-1558
154. Sherr EH (2003) The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes. *Curr Opin Pediatr* 15:567-571
155. Gecz J, Cloosterman D, Partington M (2006) ARX: a gene for all seasons. *Curr Opin Genet Dev* 16:308-316
156. Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P (1999) Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:269-279
157. Evergren E, Benfenati F, Shupliakov O (2007) The synapsin cycle: A view from the synaptic endocytic zone. *J Neurosci Res*
158. Schiebler W, Jahn R, Doucet JP, Rothlein J, Greengard P (1986) Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J Biol Chem* 261:8383-8390

159. Bahler M, Greengard P (1987) Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature* 326:704-707
160. Hilfiker S, Benfenati F, Doussau F, Nairn AC, Czernik AJ, Augustine GJ, Greengard P (2005) Structural domains involved in the regulation of transmitter release by synapsins. *J Neurosci* 25:2658-2669
161. Frischmeyer PA, Dietz HC (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8:1893-1900
162. Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra PP (1999) Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15222-15227
163. Rubenstein JL, Merzenich MM (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2:255-267
164. Wassef A, Baker J, Kochan LD (2003) GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* 23:601-640
165. Cline H (2005) Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr Biol* 15:R203-205
166. Ferreira A, Li L, Chin LS, Greengard P, Kosik KS (1996) Postsynaptic element contributes to the delay in synaptogenesis in synapsin I-deficient neurons. *Mol Cell Neurosci* 8:286-299
167. Ng PC, Henikoff S (2006) Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:61-80
168. Jovanovic JN, Benfenati F, Siow YL, Sihra TS, Sanghera JS, Pelech SL, Greengard P, Czernik AJ (1996) Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3679-3683
169. Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL (2007) LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron* 53:703-717
170. Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, Wang Q, Chen JG, Wang JZ (2007) Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci* 27:12211-12220
171. Onofri F, Giovedi S, Vaccaro P, Czernik AJ, Valtorta F, De Camilli P, Greengard P, Benfenati F (1997) Synapsin I interacts with c-Src and stimulates its tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12168-12173

172. Onofri F, Messa M, Matafora V, Bonanno G, Corradi A, Bachi A, Valtorta F, Benfenati F (2007) Synapsin phosphorylation by SRC tyrosine kinase enhances SRC activity in synaptic vesicles. *J Biol Chem* 282:15754-15767
173. Lowell CA, Soriano P (1996) Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev* 10:1845-1857
174. Gitler D, Xu Y, Kao HT, Lin D, Lim S, Feng J, Greengard P, Augustine GJ (2004) Molecular determinants of synapsin targeting to presynaptic terminals. *J Neurosci* 24:3711-3720
175. Saint-Amant L, Drapeau P (2001) Synchronization of an embryonic network of identified spinal interneurons solely by electrical coupling. *Neuron* 31:1035-1046
176. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Sudhof TC (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318:71-76
177. Garner CC (2002) Microposter. *Trends Neurosci* 25:251