HAL
open science

Folates et pathologies du neurodéveloppement : autisme et anomalies de fermeture du tube neural

Émeline Renard

▶ **To cite this version:**

Émeline Renard. Folates et pathologies du neurodéveloppement : autisme et anomalies de fermeture du tube neural. Biologie du développement. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0279 . tel-02129845

HAL Id: tel-02129845

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02129845

Submitted on 14 Jan 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT
ED 266

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Emeline RENARD**

Folates et pathologies du neurodéveloppement : autisme et anomalies de fermeture du tube neural

21/12/2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Pr Edward Quadros**	**Professeur, SUNY Downstate Medical Center New York**
	Pr Franck Sturtz	**Professeur, CHU Limoges**
Examinateurs :	**Pr Véronique David**	**Professeur, CHU Rennes**
	«	**«**
	Pr Jean-Louis Guéant	**Professeur, Unité Inserm U1256, Nancy Université, directeur de thèse**
	Pr Bruno Leheup	**Professeur, CHU de Nancy, co-directeur de thèse**
	Dr Céline Chéry	**Ingénieur, co-directeur de thèse**

Unité Inserm U1256 – NGERE - Nutrition - génétique et exposition aux risques environnementaux

Faculté de médecine 9 avenue de la Forêt de Haye - B.P. 184 54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY CEDEX - FRANCE

Remerciements :

Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine, qui m'a accueilli au sein du laboratoire INSERM U1256 depuis le Master jusqu'à la Thèse. Je le remercie pour sa disponibilité, son soutien et son accompagnement tout au long de la thèse. J'espère avoir été à la hauteur de ses attentes.

Je remercie Monsieur le Professeur Bruno Leheup, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine, de m'avoir fait confiance pour ce projet et de m'avoir accompagné tout au long de ce travail.

Je remercie Madame le Docteur Céline Chéry, Docteur de l'Université de Lorraine, Ingénieur Biologiste au CHU de Nancy, pour son investissement, sa disponibilité et son accompagnement dans ce travail.

Monsieur le Professeur Edward V Quadros, Professeur à la State University of New York à Brooklyn et Monsieur le Professeur Franck Sturz, Professeur à la Faculté de Médecine de Limoges, ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie, de même que pour leur participation au Jury.

Je remercie Madame le Professeur Véronique David, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Rennes de m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de soutenance.

Je remercie Madame le Professeur Rosa Maria Rodriguez-Guéant, Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine, pour son soutien et sa disponibilité dans ce travail.

Je remercie Monsieur le Docteur Abderrahim Oussalah, Maitre de Conférence des Universités à la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine, pour sa précieuse aide et sa disponibilité dans les dernières étapes de la thèse.

Je remercie Thomas Josse, Denise Forest-Tramoy, Pascal Perrin, Corinne Payet et Renée Debard de l'équipe de Biologie Moléculaire du service de Biochimie du Professeur Jean-Louis Guéant pour leurs aides dans les étapes techniques de la thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'unité Inserm U1256 que j'ai rencontré tout au long de ces années de thèse.

Je remercie mes collègues pédiatres de l'hopital d'enfants pour leur soutien et leur compréhension au cours des ces deux dernières années.

Dédicaces

A Pascal, à mes parents, à ma sœur, à ma famille, pour votre patience et votre accompagnement sans faille tout au long de ce travail ;

A mes collègues de l'hôpital d'enfants, pour votre soutien et votre bienveillance ;

Table des matières

I. Métabolisme des folates et pathologies du neurodéveloppement 3

a. Les pathologies du neurodéveloppement 3

i. Généralités 3

ii. L'autisme 5

1. Généralités et description clinique 5

2. Données épidémiologiques 7

3. Etiologies 8

4. Prise en charge thérapeutique 13

iii. Les anomalies de fermeture du tube neural 14

1. Embryologie du tube neural 14

2. Description clinique 21

3. Données épidémiologiques 24

4. Etiologies 24

a. Génétique 24

b. Folates et vitamine B12 25

c. Autres métabolismes 25

d. Facteurs socio-économiques 26

e. Facteurs environnementaux 27

f. Prise en charge thérapeutique 28

b. Métabolisme des folates et des monocarbones 29

i. Généralités 29

1. Folates 29

a. Origines 29

b. Transports des folates 32

c. Rôles biochimiques 33

d. Pathologies 34

2. Vitamine B12 35

3. Cycle de la méthionine et réaction de méthylation 39

ii. Métabolisme des folates dans l'autisme 41

iii. Métabolisme des folates dans les anomalies de fermeture du tube neural 45
II. Etude EFFET : évaluation de l'efficacité de la vitamine B9 sur la réduction des troubles du spectre autistique..... 48
a. Bases scientifiques de l'étude 48
b. Matériel et méthode 49
i. Descriptif de l'étude 49
ii. Déroulement de l'étude 52
iii. Analyse statistique :..... 56
c. Résultats 57
i. Description clinique de la population de l'étude 57
ii. Profil génétique de la population de l'étude..... 59
iii. Profil du métabolisme des folates et monocarbones 60
iv. Comparaison des groupes 61
III. Gènes candidats et anomalie de fermeture du tube neural..... 73
a. Bases de l'étude et objectifs 73
b. Matériel et méthode 75
i. Population de l'étude 75
ii. Profil biochimique..... 75
iii. Recherche de variants sur ADN génomique par séquençage haut débit 75
iv. Validation des variants et étude de réplication 76
v. Analyse pangénomique de la méthylation de l'ADN..... 77
vi. Analyse bioinformatique 77
1. Analyse des résultats de séquençage 77
a. Analyse pangénomique (phase #1)..... 77
b. Analyse par gènes d'intérêt (phase #2) 78
c. Etude de réplication (phase #3)..... 79
2. Analyse des résultats de méthylation..... 79
c. Résultats 81
i. Population de l'étude 81
ii. Identification de variants par NGS..... 83
1. Phase #1..... 84
2. Phase #2..... 87

iii. Etude de réplication 91
iv. Description des variants du métabolisme des monocarbones 92
v. Résultats de l'analyse de méthylation 93
d. Discussion 95
IV. Discussion générale et conclusion 100
V. Références 103
VI. Fiches annexes 112
Fiche n°1 : Critères d'exclusion de l'étude EFFET 113
Fiche n°2 : Score d'évaluation ADOS (Autism Diagnosis Observation Schedule) 114
Fiche n° 3 : Score SRS (Social Responsiveness Scale) 128
Fiche n° 4 : Technique de dosage des anticorps anti-FR alpha "blocking" et "binding" 135
Fiche n°5 : Dosage des vitamines B9 et B12 par RIA Technique adioisotopique, SimulTRAC-SNB[1] 136
Fiche n°6 : Dosage de l'Hcy, MMA, SAM et SAH 137
Fiche n° 7 : Données médicales recueillies dans le dossier médical à l'inclusion des patients dans l'étude EFFET 139
Fiche n°8: Questionnaire utilisé lors de l'appel à 12 semaines après la fin de traitement 140
Fiche n°9 : Extraction d'ADN sur prélèvement EDTA[1] 141
Fiche n°10 : Dosage d'ADN par Picogreen 143
Fiche n°11 : Préparation de la librairie[1] et séquençage[2] 145
Fiche n° 12 : Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 147
Fiche n° 13 : Séquençage automatique de l'ADN par technique fluorescente[1] 149
Fiche n°14 : Bisulfitation de l'ADN[1] 151
Fiche n°15: Etude pangénomique du méthylome de l'ADN génomique 152
Fiche n°16 : Liste de gènes sélectionnés pour le métabolisme des folates et monocarbones 155
Fiche n°17: Liste de gènes impliqués dans l'embryogénèse du tube neural (non impliqués dans le métabolisme des monocarbones) et associés au risque de NTD 156
Fiche n°18: Détail des beta-value du patient S27 en comparaison avec les contrôles pour les locus TTC40, LINC01166 (alias, LOC101927590), et LINC01168 (alias, LOC399829) 157
Fiche n° 19 : Données d'expression des 2 LINC : LINC01166 et LINC01168 issue de GTEx (Genotype Tissue Expression Project (GTEx) (gtexportal.org) 160
VII. Article soumis 161

Abréviations

αFP: Alpha-foeto protéine

AAF: Fréquence allélique alternative

ACM: Anomalie Chromosomique Microréseau

ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*

AdoCbl: Adénosylcobabalamine

ADOS: *Autism Observation Schedule*

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFTN: Anomalie de fermeture du tube neural

ANC: Apports nutritionnels recommetés

ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN: Acide Ribonucléique

BMP4: *Bone Morphogenic Protein 4*

BWA-MEM: Burrows-Wheeler Aligner

CBS : Cystathionine-béta-synthase

CFAP4: Cilia and Flagella Associated Protein 46

CMP: Centre Médico-Psychologique

CRA: Centre Ressource Autisme

CPDP: Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal

CPP: Comité de Protection des Personnes

CELF: *Clinical Evaluation of Language Fundamentals*

DHA: Acide docosahexaénoïque

DHFR: *DihydrofolateRéductase*

DNMT: ADN méthyltransférase

DSM: *Diagnostic et Statistical Manual of Mental Disorders*

EDTA: Acide éthylènediamine tétraacétique

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

FI: Facteur intrinsèque

FOLH1: Folate Hydrolase

FRα: *Folate receptor alpha*

Hcy : Homocystéine

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

IGF: *Insulin Growth Factor*

IMC: Indice de Masse corporelle

ITG: Interruption Thérapeutique de grossesse

LC/MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LD: Linkage disequilibrium

LINC: *Long intergenic non-protein RNA*

LMBRD1: Protéine lysosomale LMBR domain containing-1

5-MTHF : 5 méthyltetrahydrofolate

MMA: Acide méthylmalonique

MeCbl: Méthylcobalamine

MTHFD-1: *MethyltetrahydrofolateDehydrogenase*

MTR: Gène de la méthionine synthase

MS: Méthionine synthase

MUT: Mutase

NGS: *Next Generation Sequencing*

NTD: *Neural Tube Defect,* anomalie de fermeture du tube neural

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

PKA: Protéine kinase A

PCP: *Planar Cell Polarity*

PTCH1: Patched 1

RFC*: Reduced Folate Carrier*

RIA: *Radio immunologic assay* (dosage radio-immunologique)

ROS: Espèces réactives à l'oxygène

TDAH: Trouble déficit de l'attention /hyperactivité

TGFβ : *Transforming Growth Factorβ*

THF: Tétrahydrofolate

SAH: S-adénosylhomocysteine

SAM: S-adénosylméthionine

SAM: *Sequence alignement / Map*

Shh: Sonic Hedgehog

SNC: Système Nerveux Central

SNP: *Single-Nucleotide Polymorphism*

SNV: Single Nucleotide Variant

SRS: *Social Responsiveness Scale*

TSA: Troubles du spectre autistique

Introduction:

Le neurodéveloppement morphologique et cognitif est un enjeu crucial au cours des toutes premières années de vie d'un individu. Il est sous la dépendance de multiples facteurs génétiques, environnementaux, maternels dont l'importance est de mieux en mieux cernée, plus particulièrement au cours la période anténatale.

Le métabolisme des monocarbones joue un rôle clé dans le neurodéveloppement. Il dépend de deux coenzymes/vitamines, dont les folates ou vitamine B9, qui sont présents notamment dans les légumes verts et les cobalamines ou vitamine B12, apportées par l'alimentation animale.

L'importance du rôle des folates dans le neurodéveloppment morphologique est illustrée par la diminution du risque de survenue de malformations du tube neural par la supplémentation en acide folique en période périconceptionnel (Vitamin Study Research Group, 1991 ; Czeizel *et al*., 1992).

De récents travaux ont mis en évidence l'importance des folates dans le neurodéveloppement cognitif en montrant que les symptômes autistiques pourraient être en lien avec une carence cérébrale en vitamine B9 secondaire à la présence d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur aux folates cérébral FR *alpha (Folate receptor alpha)*. Des résultats préliminaires suggèrent une amélioration des symptômes autistiques par un traitement par acide folinique (Frye *et al*., 2016).

Les folates et la vitamine B12 interviennent dans le cycle des monocarbones en permettant la synthèse de la méthionine par méthylation de l'homocystéine. La méthionine est le précurseur de la S-adénosyl méthionine (SAM), qui est le principal donneur de méthyl nécessaire notamment à la méthylation de l'ADN. C'est pourquoi la B9 et la B12 sont souvent qualifiées de précurseurs ou donneurs de groupements méthyles. La méthylation de l'ADN est un des mécanismes épigénétiques clé permettant de réguler l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN. Le rôle de ces deux vitamines est à mettre en parallèle avec l'hypothèse de Barker dite également de « *fetal programming* » selon laquelle l'environnement et notamment l'environnement prénatal pourrait grâce à des mécanismes

épigénétiques influencer la survenue de maladie tout au long de la vie (Barker et Osmond, 1986 ; de Boo et Harding, 2006).

Ce travail porte sur le rôle du métabolisme des monocarbones et des folates dans les pathologies du neurodéveloppement que sont l'autisme et les anomalies de fermeture du tube neural. Il a un double but, évaluer le rôle des déterminants génétiques de ce métabolisme dans les anomalies de fermeture du tube neural et l'effet de l'acide folinique sur les symptômes autistiques.

I. Métabolisme des folates et pathologies du neurodéveloppement

a. Les pathologies du neurodéveloppement

i. Généralités

Le neurodéveloppement d'un enfant peut se définir comme l'ensemble des étapes de développement du système nerveux à la fois sur le plan morphologique et sur le plan fonctionnel (Chabrol B *et al*.). Le neurodéveloppement débute très précocement au cours de la vie embryonnaire dès la 3ème semaine de développement par la formation de la plaque neurale qui sera l'ébauche embryonnaire du système nerveux central (SNC). Ce développement se poursuivra au cours de la vie embryonnaire puis foetale et également après la naissance pendant l'enfance puis l'adolescence. D'un point de vue morphologique, le développement du système nerveux central débute par la formation de la plaque puis du tube neural qui donnera naissance aux structures encéphaliques et à la moelle épinière. S'en suit une phase de prolifération et de migration neuronale, de prolifération des cellules gliales et de mise en place de la synaptogénèse jusqu'à la naissance.

À la naissance, les structures morphologiques sont en place mais elles vont poursuivre leur maturation au cours des premières années de vie. La maturation du SNC comporte quatre aspects : la myélinisation, l'établissement de relations inter-neuronales, l'organisation de l'activité électrique du cerveau, l'organisation des grands systèmes neuro-fonctionnels. La myélinisation consiste en la formation de la gaine de myéline autour des axones dans le but d'augmenter la vitesse de conduction nerveuse. Elle apparaît vers le 4ème mois de grossesse et se termine vers 2 ans, par les grands centres du langage, de la gnosie (connaissance), de la praxie (action). Le développement du cerveau se spécialise ensuite par l'organisation des capacités fonctionnelles de l'enfant : organisation des expressions émotionnelles, organisation des centres sensori-moteurs, organisation des centres perceptifs et analyseurs…

Les pathologies du neurodéveloppement englobent un grand nombre de pathologies du nouveau-né et de l'enfant qui peuvent être à la fois morphologiques ou fonctionnelles.

Les anomalies morphologiques sont principalement liées à des anomalies du développement embryonnaire, survenant en général à des stades précoces de la grossesse. La plus fréquente concerne les anomalies liées à une anomalie de fermeture du tube neural (AFTN). Cette

malformation est, par sa fréquence, la seconde malformation congénitale après les cardiopathies dans le monde. D'autres anomalies plus rares sont possibles : agénésie de certaines structures cérébrales (corps calleux, hypophyse…), défaut de séparation entre les deux hémisphères (holoprosencéphalie), défaut de gyration cérébrale, dysplasies… avec des conséquences cliniques variables. Ces malformations possèdent probablement des origines diverses, mais elles peuvent aussi être la conséquence d'un accident du neurodéveloppement survenant à des stades de développement différents.

Les pathologies du neurodéveloppement peuvent également être liées à un défaut de fonctionnement comme c'est le cas dans le cadre d'un retard de développement (également appelé retard psychomoteur), dans le cadre de l'autisme ou dans les troubles du déficit de l'attention/hyperactivité (TDAH).

Dans ce travail, nous nous concentrons sur deux maladies du neurodéveloppement fréquentes ou le métabolisme des folates semble impliqué à des niveaux et avec des mécanismes différents : l'autisme et les anomalies de fermeture du tube neural.

ii. L'autisme

1. Généralités et description clinique

La définition médicale de l'autisme a beaucoup évolué sur les dernières décennies. Initialement appelée « schizophrénie infantile » dans sa première définition en 1954, la définition actuelle déterminée par la dernière classification du DSM-V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) est celle des « troubles du spectre autistique ».

D'un point de vue clinique, ces troubles se définissent par deux symptômes dits de base :

- Troubles de la communication sociale
- Répertoire de comportement restreint et répétitif

Cette nouvelle classification se distingue de la précédente (DSM IV) où le diagnostic se fondait sur trois symptômes clés: trouble du langage/de la communication; trouble de la réciprocité sociale; activités restreintes ou répétitives. Une des différences concerne l'âge du diagnostic, pour la DSM IV, les symptômes devaient apparaître avant l'âge de 36 mois, pour la dernière version : « les symptômes doivent être présents dès la petite enfance mais peuvent ne se manifester pleinement que lorsque la limitation des capacités empêche de répondre aux exigences sociales ». Dans cette classification sont compris: l'autisme infantile, le syndrome d'Asperger, le trouble désintégratif de l'enfance et le trouble envahissant du développement qui semblent partager les mêmes caractéristiques mais à des degrés de sévérité variables.

La sévérité de ce trouble est variable mais reste souvent responsable d'un handicap plus ou moins sévère.

Sur le plan clinique, les troubles de la communication sociale peuvent se traduire par des troubles de la réciprocité sociale allant de la difficulté à engager une conversation à l'impossibilité d'initier un contact oculaire, des difficultés à maintenir ou développer des relations sociales (adaptation et partage du jeu, intérêt pour ses pairs).

Les comportements répétitifs et restreints peuvent se définir par des mouvements ou l'utilisation d'objets répétitifs et stéréotypés, des comportements stéréotypés et inflexibles, des centres d'intérêt restreints et anormaux, associés à une sensibilité anormale à l'environnement (hypo ou hyperréactivité à certains stimulis).

Ces signes sont à l'origine d'altération du fonctionnement social (scolaire, familial…) souvent à l'origine d'un handicap nécessitant des adaptations (scolarité dans une structure adaptée, présence d'une auxiliaires de vie scolaire…).

D'un point de vue pratique, le diagnostic est posé sur la base de ces différents symptômes par les pédopsychiatres (souvent au sein de centre ressource autisme) et standardisé avec des échelles telles que l'ADOS (*Autism Diagnosis Observation Schedule*) ou la CARS (*Childhood Autism Rating Scale*).

2. Données épidémiologiques

Les difficultés de définitions de cette maladie au fil des années rendent difficile une estimation précise de la prévalence de l'autisme dans le monde.

En 2012, une étude a estimé la prévalence moyenne des troubles autistiques à 62 pour 10 000 dans le monde (Elsabbagh *et al.*, 2012) avec probablement une disparité géographique et ethnique.

Cette prévalence apparaît être en augmentation sur les dernières décennies probablement en lien avec un meilleur diagnostic secondaire à une meilleure connaissance de la maladie mais la question de l'impact environnemental se pose également, puisque cette prévalence était estimée à 1 pour 1000 il y a quelques dizaines d'années. Cette maladie est plus fréquente chez les garçons avec un ratio de 4,3 pour 1 (Elsabbagh *et al.*, 2012).

3. Etiologies

L'origine de l'autisme reste encore un ce jour inconnue. De nombreuses hypothèses sont évoquées, soulignant à chaque fois une origine probablement multifactorielle faisant intervenir des facteurs de risque environnementaux, maternels et génétiques, intervenant probablement précocement au cours du développement.

Sur le plan génétique, hormis le syndrome de Rett lié à une mutation du gène *MeCP2* localisé sur le chromosome X, et une fréquence plus importante de troubles autistiques en cas de syndrome de l'X fragile ou de sclérose tubéreuse de Bourneville, une anomalie génétique n'est que rarement retrouvée chez les patients présentant des troubles autistiques isolés (moins de 10 % des cas) (Muhle *et al*., 2004). L'hypothèse d'une origine génétique est toutefois soutenue par les études faites sur les jumeaux monozygotes et les formes familiales suggérant une héritabilité proche de 80 % (Lai *et al*., 2014), sans toutefois être à 100 %.

L'épilepsie et la dépression font partie des comorbidités neurologiques fréquemment associées aux troubles du spectre autistique (70 % selon Lai *et al*., 2014).

L'une des hypothèses qui relie la génétique à l'autisme, concerne le rôle que l'environnement pourrait avoir sur l'expression des gènes. Celle-ci est sous tendue par l'augmentation de l'incidence décrite des troubles autistiques suggérant une origine environnementale. L'influence de l'environnement sur la génétique peut s'expliquer par des mécanismes de régulation épigénétique, c'est-à-dire par modification de l'expression de certains gènes sans modification de la structure codante de l'ADN.

Les facteurs environnementaux suspectés sont nombreux dans l'autisme qu'ils soient maternels avec une exposition *in utero* pendant la grossesse ou avec une exposition au cours de l'enfance. Bien qu'ils soient difficiles à mettre en évidence, le rôle de l'environnement est estimé comme expliquant 55 % de la variance du risque d'autisme chez des jumeaux monozygotes (Hallmayer *et al*., 2011). L'environnement peut être défini comme l'ensemble des éléments non génétiques qu'ils soient alimentaires, infectieux, chimiques, jusqu'aux comportements sociaux. Son impact sur l'autisme est très probablement multifactoriel, et suspecté comme interagissant avec des facteurs de susceptibilité génétiques.

L'alimentation fait partie de ces facteurs susceptibles d'intervenir au cours du développement anténatal via l'alimentation maternelle et dans les premiers mois ou années

de vie via l'alimentation du nouveau-né et du nourrisson. Les carences nutritionnelles maternelles sont susceptibles d'influencer le développement cérébral de l'enfant à venir, ce pourquoi beaucoup d'études se sont intéressées aux vitamines. La supplémentation maternelle vitaminique pendant les trois premiers mois de grossesse est associée à un risque plus faible d'autisme chez l'enfant à venir (Schmidt *et al.*, 2011) en lien notamment avec la supplémentation en vitamine du groupe B et plus particulièrement la vitamine B9 (Schmidt *et al*., 2012).

D'autres équipes se sont intéressées au rôle de la vitamine D. Un taux bas de 25-OH vitamine D chez la mère et l'enfant à venir serait associé à un risque accru d'autisme (Grant et Soles, 2009). Ce résultat a été contredit par d'autres études mais sur de petits effectifs. Cependant des médecins ont décrit le cas d'un enfant de 32 mois qui présentait des troubles autistiques et une carence en vitamine D et pour lequel la supplémentation en vitamine D a permis d'améliorer les troubles autistiques (Jia F *et al.*, 2015).

Une des autres hypothèses concerne la consommation de poissons. Sa consommation maternelle est source à la fois d'acide gras (notamment d'acide docosahexaénoïque (DHA)), mais potentiellement aussi de mercure (Oken et Bellinger, 2008). Sa consommation serait associée à de meilleures performances cognitives chez les enfants mais les résultats des différentes études sont contradictoires et contrebalancés par le rôle toxique du mercure fréquemment contenu dans ces poissons. Le rôle des acides gras polyinsaturés (oméga-6 et 3) a spécifiquement été étudié. Ces acides gras longues chaînes sont impliqués dans des processus neuronaux allant de la régulation de la transcription des gènes aux processus de signalisation cellulaire et jouent un rôle central dans le développement et le fonctionnement du système nerveux. Le manque d'oméga-3 a été associé dans plusieurs études à un risque augmenté de trouble du spectre autistique (Richardson et Ross, 2000 ; Schuchardt *et al*., 2010).

L'exposition à différents toxiques a également fait l'objet de nombreuses recherches (Kalkbrenner *et al*., 2014). Beaucoup d'études se sont intéressées à l'effet du tabac et de l'alcool sur le neurodéveloppement et plus particulièrement sur les troubles autistiques. Plusieurs études comprenant à chaque fois d'importants biais de confusion suggéraient un lien entre l'exposition au tabac *in utero* et le risque de troubles autistiques. Une large étude suédoise n'a pas mis en évidence d'association entre tabagisme et risque de trouble autistique après ajustement sur de nombreux facteurs de confusions dont les

catégories socio-économiques (Lee *et al*., 2012a). Ces données ont été confirmées par d'autres études plus récentes (Tran *et al*., 2013).

L'effet de l'alcool *in utero* sur le développement cérébral est désormais bien connu, avec le risque de syndrome d'alcoolisation fœtale en cas d'exposition anténatale à l'alcool (Stokowski, 2004). Les signes couramment rapportés sont un retard de croissance, une microcéphalie et un retard de développement avec des troubles du comportement. Toutefois très peu d'études se sont spécifiquement intéressées au lien entre l'exposition à l'alcool en période anténatale et les troubles autistiques.

Une des grandes questions de société actuelle concerne le rôle de la pollution atmosphérique sur des maladies comme l'autisme dont l'incidence a augmentée au cours des dernières années. Bien que les études soient compliquées à mettre en place du fait de la complexité à évaluer l'exposition réelle aux polluants et l'interaction avec de nombreux facteurs de confusion, certaines d'entre elles ont conclu à un risque augmenté de troubles autistiques lié à la pollution atmosphérique (Kalkbrenner *et al*., 2014; Windham *et al.*, 2006 ; Becerra *et al.*, 2013). Les polluants suspectés sont les métaux lourds, les particules de diesel, les solvants chlorés et les nanoparticules.

L'une des autres sources d'inquiétude concerne l'impact des pesticides et plus largement des perturbateurs endocriniens. Plusieurs études ont démontré une association significative entre l'exposition aux pesticides et le risque de troubles autistiques, que ce soit pour les organochlorés, organophosphorés et les autres classes de pesticides (Kalkbrenner *et al*., 2014).

Concernant les perturbateurs endocriniens (Bisphénol A, phtalates, retardateurs de flamme bromés…), ils sont suspectés d'interagir avec le système hormonal en bloquant, mimant ou altérant la signalisation hormonale, principalement pour les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. L'exposition à ces substances apparaît aussi comme associée à un risque augmenté de troubles du spectre autistique (Khan *et al*., 2014; de Cock *et al.*, 2012). Les hormones thyroïdiennes possèdent un rôle important dans le développement cérébral du fœtus et du nouveau-né, une altération du fonctionnement thyroïdien pourrait être associée aux troubles autistiques (Khan *et al.*, 2014 ; Román, 2007). Les hormones stéroïdiennes pourraient expliquer le dimorphisme sexuel observé, avec une fréquence plus importante des troubles autistiques observés chez les garçons, et pose la question du rôle de la

testostérone sur le développement cérébral et de l'impact potentiel des perturbateurs endocriniens.

L'un des autres axes de recherche concerne le rôle d'agents infectieux et plus particulièrement celui du microbiote, c'est-à-dire l'ensemble des micro-organismes intestinaux. Des travaux ont montré que le microbiote d'enfant présentant des troubles du spectre autistique était différent des autres enfants (Wang *et al*., 2013 ; Williams *et al*., 2011; Wang *et al*., 2013). Ceci est renforcé par la fréquence plus importante de trouble digestif chez les enfants autistes (diarrhée, constipation, douleurs abdominales chroniques…). Si cette hypothèse est vraie, la modification du microbiote intestinal des enfants autistes pourrait peut-être permettre une amélioration clinique. A ce jour, seuls des traitements visant à modifier le régime des enfants, ou à ajouter des probiotiques dans l'alimentation ont été réalisés (Grimaldi *et al*., 2018).

L'une des explications à la modification du microbiote chez les enfants autistes évoquée serait l'utilisation d'antibiotiques au cours des premiers mois de vie. Une récente étude sur une large cohorte d'enfants nés au Canada sur les 10 dernières années n'a pas montré d'association entre la prise d'antibiotiques pendant la première année de vie et le risque d'autisme (Hamad *et al.*, 2018). D'autres se sont intéressés à l'accouchement par césarienne, qui est de plus en plus fréquent dans le monde. Il n'expose pas l'enfant au microbiote vaginal de la mère contrairement à l'accouchement par voie basse et il pourrait ainsi expliquer la modification du microbiote intestinal de l'enfant. Une grande étude menée sur des enfants nés en Suède entre 1982 et 2010 a démontré une augmentation du risque de troubles du spectre autistique de 20 % chez les enfants nés par césarienne (Curran *et al*., 2015).

Une des questions qui anime le débat public ces dernières années concerne le rôle des vaccins sur la survenue des troubles autistiques et plus particulièrement celui du vaccin ROR protégeant de la rougeole, oreillons et rubéole. Ceci est sous-tendu par la description des troubles autistiques apparaissant après l'âge de 1 an, âge ou est effectué ce vaccin. Aucune association significative n'a été mise en évidence dans de larges études (Jain *et al.*, 2015). Plus largement, l'hypothèse d'un lien entre les vaccins et les troubles autistiques est sous-tendue par l'utilisation d'aluminium comme adjuvant dans beaucoup de vaccins ce qui pourrait entraîner des désordres neuro-immunologiques chez l'enfant. De la même façon,

l'effet du mercure par exposition *in utero* ou pendant l'enfance a également été évoqué. En effet, le mercure peut être contenu en très faible quantité dans le thiomersal, additif utilisé dans les vaccins. Il est présent en plus grande quantité dans l'environnement (amalgames dentaires, poissons, pollution atmosphérique). Les résultats des études restent à ce jour controversés concernant le rôle de l'exposition au mercure dans la survenue de troubles du spectre autistique (Jafari *et al*., 2017 ; Golding *et al*., 2018).

D'un point de vue clinique, les enfants ayant des troubles autistiques présentent plus fréquemment des troubles digestifs tels que des diarrhées, vomissements, douleurs abdominales et constipation. Certaines équipes se sont intéressées à la prévalence de la maladie cæliaque chez les enfants autistes. En effet, une auto-immunité plus importante vis-à-vis du gluten chez les enfants autistes a été décrite (Lau *et al.*, 2013). Cependant les résultats d'autres études à plus grandes échelles sont contradictoires (Lange *et al*., 2015 ; Ludvigsson *et al*., 2013). Devant cette hypothèse, de nombreuses familles ont mis en place un régime sans gluten chez leurs enfants autistes. Très peu d'études à grande échelle sont disponibles sur l'efficacité d'un tel régime sur les troubles autistiques *(*Lange *et al.*, 2015).

Sur le plan métabolique, un des grands axes de recherche concerne le rôle du stress oxydatif. Celui-ci pourrait être majoré chez les enfants autistes. Il résulte d'un déséquilibre entre la production de ROS (espèces réactives à l'oxygène) par des substances endogènes ou exogènes pro-oxydantes et les mécanismes de défenses anti-oxydantes.
Plusieurs travaux ont montré chez les enfants autistes des taux de glutathion peroxydase diminués, une déplétion en glutathion réduit, entraînant une augmentation du ratio redox (Chauhan et Chauhan, 2006). L'hyperhomocystéinémie peut être responsable d'un stress oxydatif par différents mécanismes : auto-oxydation de l'homocystéine formant des ROS, augmentation de la peroxydation des lipides, production réduite de glutathion peroxydase.

En résumé, il existe de nombreuses pistes d'identification de facteurs de risques de l'autisme, ce qui suggère de probables effets cumulatifs et multifactoriels faisant de chaque cas, un cas différent.

4. Prise en charge thérapeutique

D'un point de vue thérapeutique, aucun traitement curatif n'existe dans la pathologie autistique. Les traitements ayant montré le plus d'efficacité à ce jour sont des thérapies comportementales associant une prise en charge psychologique, orthophonique, psychomotrice et un soutien familial. Ces prises en charge sont souvent coordonnées par des Centres Ressources Autismes (CRA) ou des Centres Medico Psychologiques (CMP). Cette prise en charge est souvent lourde sur le plan familial, obligeant fréquemment l'un des deux parents à interrompre son activité professionnelle.

Les traitements médicamenteux reposent uniquement sur des traitements symptomatiques (traitement par Risperidone en cas d'agitation, de mélatonine en cas de troubles de sommeil) mais aucun traitement médicamenteux visant à améliorer les symptômes autistiques n'est disponible actuellement en pratique courante.

Néanmoins, de nombreux groupes de travail se sont intéressés à de nouvelles propositions thérapeutiques basées sur les hypothèses physiopathologiques évoquées pour les troubles autistiques tels que le régime sans gluten, les supplémentations vitaminiques, thérapie antioxydante (vitamine C, Zinc,…) ou encore les modifications du microbiote intestinal.

iii. Les anomalies de fermeture du tube neural

1. Embryologie du tube neural

La neurulation est le terme utilisé pour désigner le processus embryonnaire précoce de formation du tube neural qui donnera naissance au système nerveux central (structure encéphalique et corde spinale).

La neurulation primaire consiste en la formation du tube neural issu de la transformation de l'ectoderme de la région sus-chordale (Larsen *et al*.). La plaque neurale va se développer en avant de la ligne primitive sous forme d'un épaississement médio-sagittal de l'ectoblaste et va suivre un gradient cranio-caudal grâce au recrutement de cellules neuro-ectoblastiques. Le développement de la plaque neurale est plus rapide à l'extrémité crâniale, qui s'élargit en forme de raquette, à l'origine des structures encéphaliques. L'extrémité caudale reste étroite et deviendra la moelle épinière.

À partir de la 3ème semaine de grossesse, les bourrelets neuraux se forment grâce une surélévation des bords de la plaque neurale formant ainsi la gouttière neurale. Les bords de la gouttière neurale vont progressivement se rapprocher pour s'accoler vers le 28ème jour, délimitant ainsi le tube neural. La capacité d'adhésion des cellules neuro-ectodermiques est renforcée grâce à l'expression de N-cadhérines et des N-CAMs. Des amas cellulaires vont se détacher longitudinalement pour former les crêtes neurales. La fermeture de la gouttière neurale se fait selon un axe cranio-caudal à partir de différents points de fusion qui vont se fermer chacun avec des directions crâniales et caudales (fermeture du neuropore rostral au 29ème jour et du neuropore caudal au 30ème jour).

À l'opposé de la neurulation primaire, la neurulation secondaire concerne le développement de la partie terminale de la moelle épinière à la hauteur du 31ème somite (entre la 4ème et la 7^{ème}semaine) qui formera la région sacro-coccygienne.

La différenciation encéphalique et médullaire va pouvoir commencer avec dès la fin de la quatrième semaine l'apparition des principales structures encéphaliques (prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale).

Les anomalies de fermeture du tube neural en région rostrale entraîneront des anencéphalies, alors qu'en position caudale elles seront responsables de spina bifida. Une anomalie de fermeture tout au long du tube neural entraînera un craniorachischisis.

Tableau 1 : chronologie de la fermeture du tube neural (stade de Carnegie)

Les stades de Carnegie sont utilisés au cours des 8 premières semaines de grossesse pour caractériser les étapes clés du développement des différentes structures embryonnaires.

Stade de Carnegie	Développement embryonnaire
stade 7, env. 19 jours	plaque neurale
stade 8, env. 23 jours	bourrelets neuraux et gouttière neurale
stade 9, env. 25 jours	gouttière neurale toujours ouverte,
stade 10, env. 28 jours	fusion des bords de la gouttière neurale (formation du tube neural)
stade 11, env. 29 jours	fermeture du neuropore rostral
stade 12, env. 30 jours	fermeture du neuropore caudal (neurulation secondaire)
stade 13, env. 32 jours	fermeture complète du tube neural

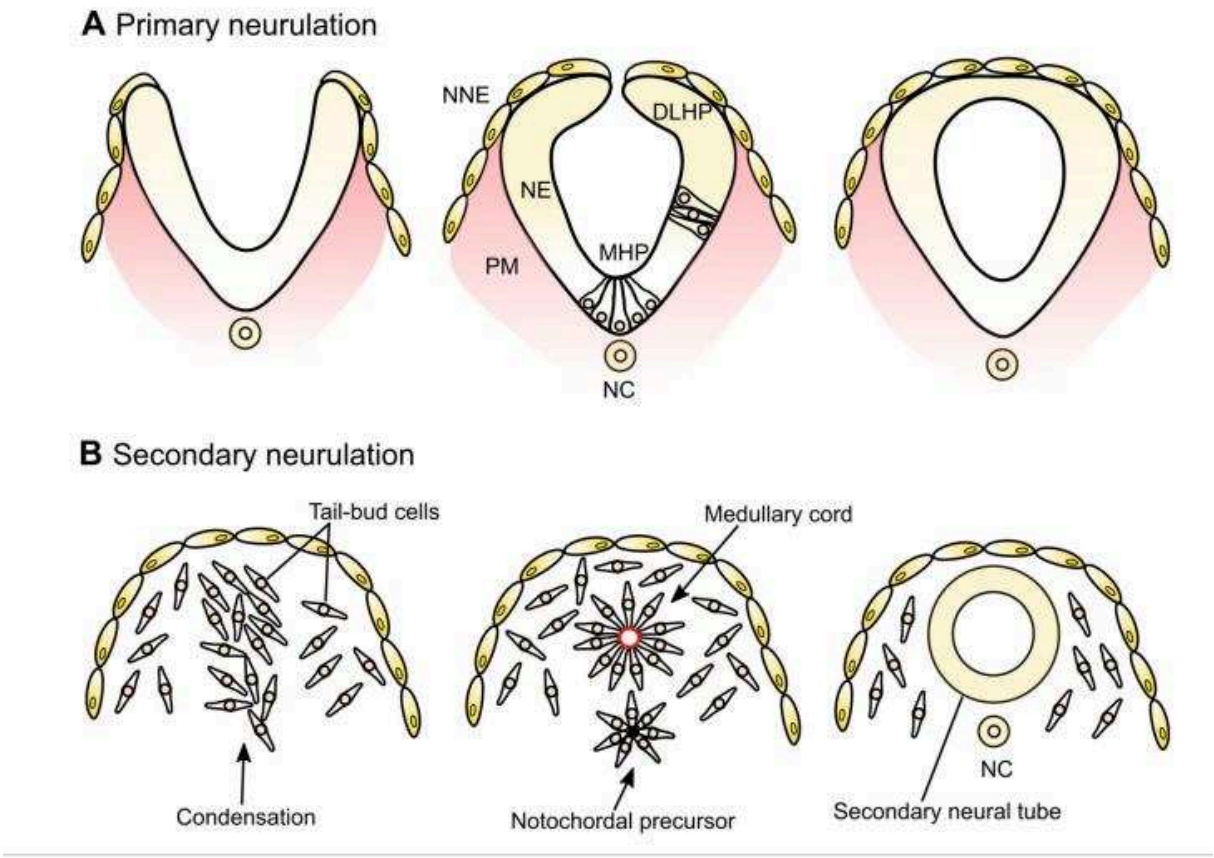


Figure 1 : Représentation des étapes clés de la neurulation primaire et secondaire (D'après Nikolopoulou et al., 2017)

Neurulation primaire : formation de la gouttière neurale, rapprochement des bords puis fusion pour former le tube neural.

Neurulation secondaire : Les cellules de la queue du bourgeon neural se condensent dans la ligne médiane pour former le cordon médullaire. Le cordon médullaire subit une épithélialisation autour d'une lumière (rouge) tandis que le précurseur notochordal reste solide, générant le tube neural secondaire et la notochorde

DLHP, dorsolateral hinge point; MHP, median hinge point; NC, notochord; NE, neuroepithelium; NNE, non-neural ectoderm; PM, paraxial mesoderm.

Une cascade de mécanismes de régulation cellulaire intervient dans la formation du tube neural, au cours de laquelle les cellules vont devoir migrer, modifier leur forme et se différencier (Nikolopoulou *et al*., 2017). Au cours de la gastrulation (période de développement au cours duquel se mettent en place les 3 feuillets embryonnaires ectoderme, mésoderme et endoderme), l'induction de la plaque neurale se fait grâce à la notochorde qui sécrète les substances (follistatine, chordin et noggin) inhibant la sécrétion de BMP4 (*Bone Morphogenic Protein 4*). BMP4 est un facteur de croissance de la famille des TGFβ (T*ransforming Growth Factorβ*) dont le rôle est d'inhiber la transformation des cellules ectodermiques en cellules neurales. D'autres facteurs sont impliqués comme les FGF (*Fibroblast Growth Factors*), la voie de signalisation WNT et le système des IGF (*Insulin-Like Growth Factor*).

Au cours de la formation de la plaque neurale, un mécanisme d'extension convergente et médio-latéral va permettre aux cellules de s'allonger médiolatéralement et longitudinalement et produire des protrusions cellulaires polarisées permettant d'orienter la direction des cellules voisines. Ce mouvement morphogénique des cellules permet un allongement longitudinal et un rétrécissement transversal. Ce mécanisme d'extension convergente est contrôlé par la voie non canonique Wnt/*Planar Cell Polarity* (PCP) (Nikolopoulou *et al.*, 2017).

L'implication de la voie PCP dans le mécanisme d'extension convergente de la plaque neurale a été décrite pour la première fois chez l'embryon de xénope (Goto et Keller, 2002 ; Wallingford et Harlet, 2002). Un défaut d'extension convergente secondaire à une dérégulation de la voie Wnt/PCP entraîne une plaque neurale trop large avec des bords trop éloignés pour qu'ils se rejoignent et fusionnent. Une altération de l'extension convergente est également observée chez la souris en cas de mutation de gènes de la PCP comme *Vangl2* (Greene *et al.*, 1998), responsable d'un craniorachischisis. Des mutations de la voie PCP ont déjà été décrites dans les AFTN chez l'homme (Juriloff et Harris, 2012).

Les mécanismes cellulaires impliqués dans le « pliage » de la plaque neurale pour former la gouttière neurale font intervenir des mécanismes de constriction apicale. Une dérégulation de cette constriction apicale peut également entraîner des AFTN. L'actomyosine semble également jouer un rôle puisque des filaments d'actine sont présents au niveau des jonctions apicales cellules neuroépithéliales du tube neural.

D’autres ont montré que Celsr1 était concentré au niveau de jonction adhérente, orientée selon un axe médio-latéral de la plaque neurale. Celsr1 coopère avec Disehvelled, DAMM1 et PDZRhoGEF pour activer Rho Kinase entraînant une activation de l’actomyosine selon une façon polarisée responsable d’une constriction apicale et d’une convergence vers le milieu de cellules neuro épithéliales (Murdoch et Copp, 2010 ; Nishimura *et al.*, 2012).

Une polarisation dorso-ventrale va se mettre en place secondairement. Cette polarisation est sous l’influence du notochorde qui définit le plancher du tube neural, région qui induira la différenciation précoce des neurones moteurs. Cette polarisation ventrale est sous l’influence d’une voie de signalisation, la voie Sonic Hedgehog (Shh). Shh est produit au niveau ventral du tube neural sous l’influence du notochorde et s’étend pour former un gradient dorso-ventral. Ce signal régule l’activité des facteurs de transcription GLI (GLI1, 2, et 3) afin d’augmenter leur fonction d’activateur de transcription. Cette activation contrôle l’expression d’autres facteurs de transcription au niveau des cellules progénitrices ventrales qui vont permettre la différenciation cellulaire neuronale en différents types de cellules neuronales selon un axe dorso-ventral (figure 2).

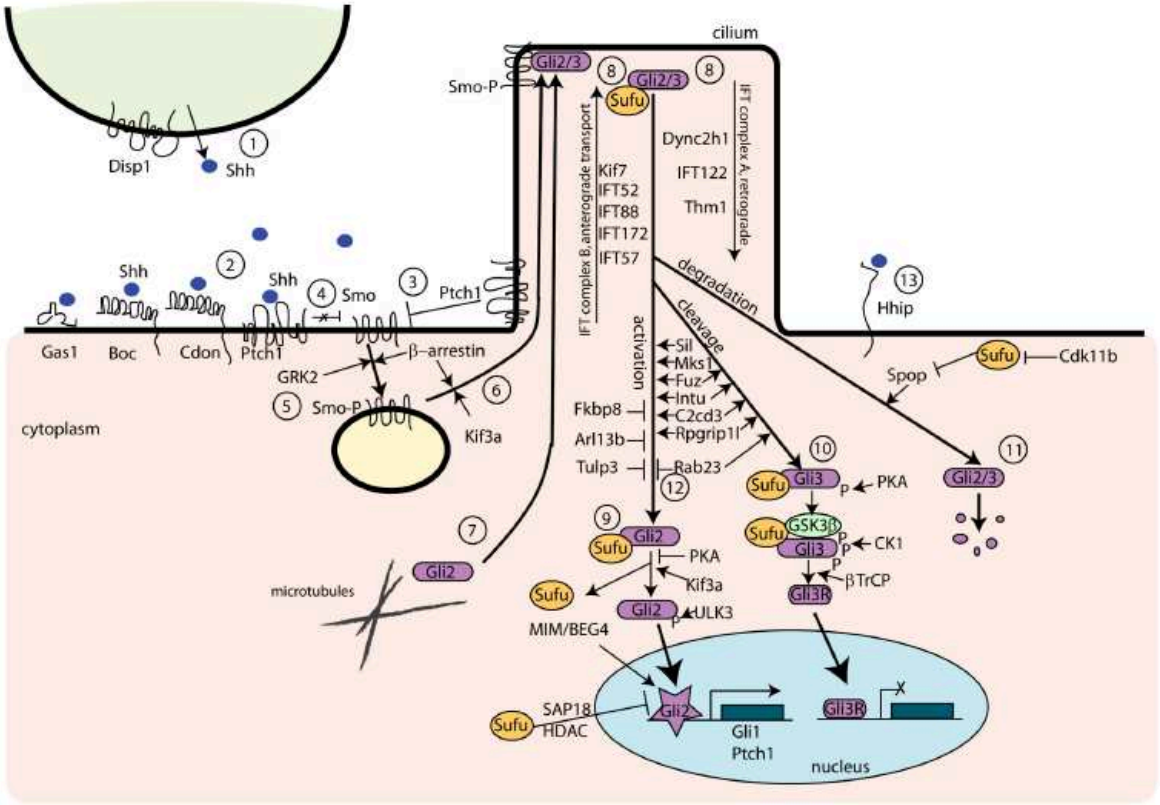


Figure 2 : Détail de la cascade signalisation de la voie Sonic Hedgehog

D'après Murdoch et Copp, 2010

La formation du tube neural est donc sous la dépendance de multiples facteurs interagissant dans un ordre précis. Toute altération dans cette cascade de développement et de signalisation est susceptible d'entraîner des anomalies de fermeture du tube neural.

2. Description clinique

Les anomalies de fermeture du tube neural sont des malformations congénitales liées à un défaut de fermeture du tube neural durant le développement embryonnaire.

Ces malformations sont classées en fonction de leur localisation. L'anomalie la plus fréquente est l'anencéphalie qui correspond à un défaut de fermeture du tube neural dans sa partie supérieure cérébrale se traduisant par une absence partielle ou totale d'encéphale. Le terme *spina bifida* désigne les anomalies de fermeture du tube neural dans la partie caudale (future région médullaire). On distingue les *spina bifida aperta*, également appelées dysraphismes ouverts, responsables d'une anomalie de fermeture postérieure des vertèbres avec protrusion des méninges seules (méningocèle) ou associée à la moelle épinière (myéloméningocèle). Les dysraphismes fermés, également appelés *spina bifida occulta* correspondent à une anomalie de fermeture de l'arc postérieur vertébral sans anomalie méningée ou médullaire sous-jacente, et donc sans retentissement clinique. Le craniorachischisis, malformation du tube neural plus rare, désigne le défaut de fermeture de l'ensemble du tube neural (région encéphalique et médullaire).

Sur le plan clinique, les anomalies de fermeture hautes ou encéphaliques du tube neural sont dans la majorité des cas non viables.
Les *spina bifida aperta* sont quant à elles source d'une morbidité importante. Les conséquences cliniques sont variables en fonction de la localisation de la lésion ainsi que le handicap qui en découle : déficit moteur plus ou moins sévère, troubles vésico-sphinctériens avec incontinence urinaire ou fécale, malformation d'Arnold Chiari, hydrocéphalie secondaire… De nombreuses interventions chirurgicales sont nécessaires dans l'enfance : geste de couverture rapide à la naissance, dérivation ventriculaire en cas d'hydrocéphalie, prise en charge des troubles vésico-sphinctériens…

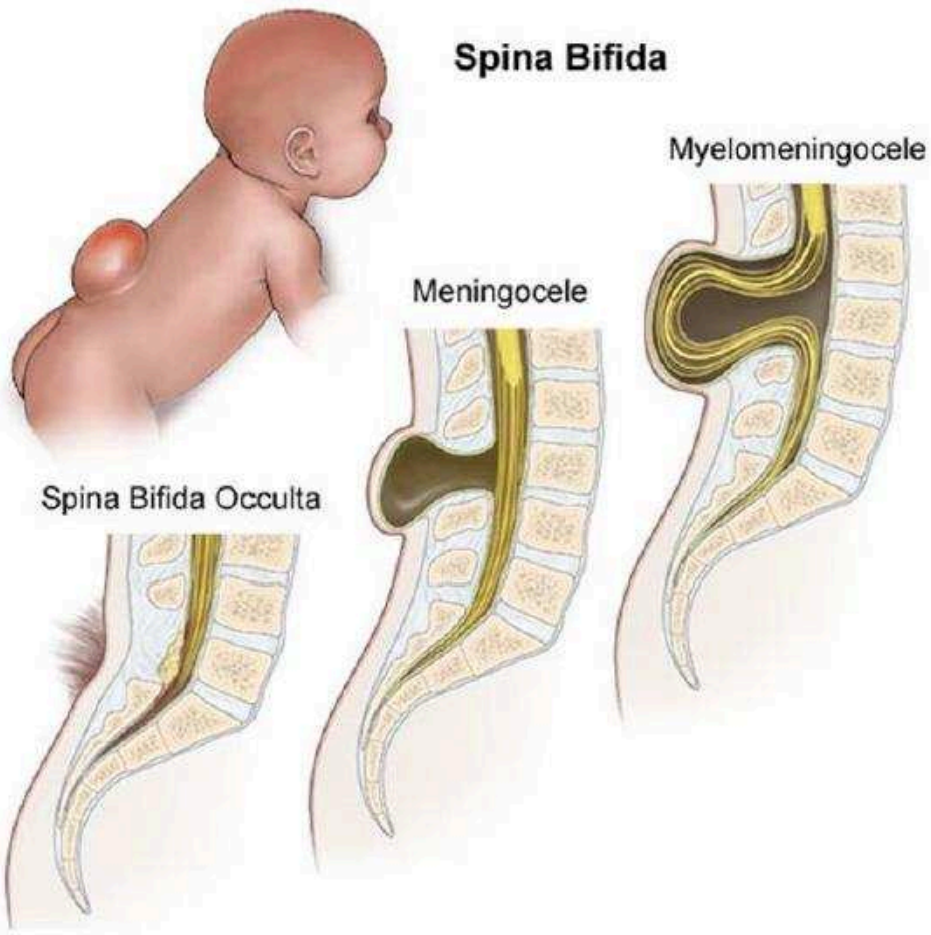


Figure 3 : Les différents types de spina bifida

Spina bifida aperta : Méningocèle avec une protrusion isolée de méninges et myéloéningocèle : protrusion de méninges et du cordon médullaire

Spina bifida occulta : défaut de fermeture uniquement au niveau osseux ou cutané

Le développement de la surveillance échographique des grossesses a permis de diagnostiquer de plus en plus tôt ces pathologies au cours de la grossesse. Un taux d'*alpha*-foeto protéine (αFP) augmenté au cours du 1er trimestre peut être un autre signe d'appel. Selon la gravité de la malformation, cette pathologie, si découverte en anténatal, est accessible en France à une interruption thérapeutique de grossesse (ITG) si les parents le demandent et après accord du Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prenatal (CPDP).

3. Données épidémiologiques

Chaque année, dans le monde, plus de 500 000 enfants naissent porteurs d'une *spina bifida aperta*, faisant de ces anomalies l'une des malformations congénitales les plus fréquentes après les cardiopathies avec une prévalence estimée entre 0,5 et 2 pour 1000 naissances (Copp *et al.*, 2015), celle de la *spina bifida* est estimée à 0,5/1000 naissances en France. La fréquence est variable en fonction de l'origine géographique avec dans notre pays, une fréquence plus importante dans le Nord-Pas de Calais et en Bretagne.

4. Etiologies

L'origine de ces malformations est multifactorielle, faisant intervenir des facteurs environnementaux (nutrionnels, socio-économiques), maternels et génétiques. Le facteur étiologique le mieux connu concerne les folates mais d'autres facteurs ont été à ce jour décrits.

a. Génétique

L'hypothèse d'une origine génétique a été suspectée devant la récurrence familiale de cas d'anomalies de fermeture du tube neural. On estime que le risque de récurrence familiale est de 2 à 5 % contre un risque de 0,1 % dans la population générale.

Les AFTN sont plus fréquentes en cas de trisomie 13 ou 18 soulignant le rôle potentiel de ces chromosomes dans la survenue de ces malformations, et également en cas de trisomie 21.

Les premiers gènes retrouvés impliqués dans ces anomalies sont ceux du métabolisme des folates.

Plus de 200 gènes intervenant dans différentes voies métaboliques ont été étudiés lors d'études cohortes de patients, d'étude cas-témoin et grâce à des modèles animaux d'anomalies de fermeture du tube neural (notamment chez la souris) (Greene *et al.*, 2009).

Certaines études épidémiologiques suggèrent que près de 70 % de la variance de la prévalence des anomalies de fermeture du tube neural pourrait être d'origine génétique (Au *et al.*, 2010 ; Leck I, 1974).

b. Folates et vitamine B12

Les folates (vitamine B9) et la vitamine B12 sont des acteurs majeurs intervenant dans le métabolisme des monocarbones et leurs métabolismes ont été très largement décrits dans les anomalies de fermeture du tube neural (cf infra).

c. Autres métabolismes

D'autres gènes sans lien avec le métabolisme des folates ont été évoqués comme intervenant dans la pathogénèse des AFTN (Au *et al*., 2010).

Les gènes du métabolisme du glucose ont été étudiés suite à la constatation d'une fréquence plus élevée d'AFTN chez les enfants de femmes diabétiques ou avec une intolérance au glucose. Des liens entre certains variants des gènes du transport intracellulaire du glucose comme *GLUT1* et *4* et la survenue d'AFTN ont été mis en évidence tout comme pour le gène de l'insuline (*INS*) ou de son récepteur (*INSR*), le gène de la leptine (*LEP*) et de son récepteur (*LEPR*).

Le rôle du stress oxydatif a été également évoqué, avec l'étude des gènes de la Catalase (*CAT*) ou Superoxyde Dismutase 2 (*SOD2*).

Le métabolisme rétinoïque, la réparation de l'ADN, l'adhésion cellulaire sont également suspectés d'intervenir dans cette pathologie.

Le métabolisme de l'inositol a également été très étudié dans la physiopathologie des anomalies de fermeture du tube neural. Plusieurs études ont démontré que l'inositol pouvait prévenir les AFTN chez la souris alors que la vitamine B9 était inefficace (Juriloff et Harris, 2012 ; Greene et Copp, 1997). D'autres études ce sont intéressées à l'effet d'une supplémentation en inositol chez l'homme sur la réduction du risque d'AFTN par analogie à l'acide folique. Une première étude randomisée a été réalisée en 2016 avec des résultats encourageants mais nécessitant des études à plus grande échelle (Greene *et al*., 2016).

Les études de modèles animaux et notamment chez la souris ont permis de mettre en évidence le rôle de la voie de signalisation de la polarisation cellulaire plane (*Planar Cell Polarity*, PCP) dans la pathogénèse des AFTN (Juriloff et Harris, 2012). Cette voie de signalisation non canonique à un rôle crucial dans le développement embryonnaire de nombreuses espèces dont l'espèce humaine. Celle-ci est responsable de l'orientation de diverses structures dans le plan des épithéliums, notamment par polarisation des cellules.

Les protéines PCP régulent le processus d'extension convergente pendant la gastrulation et la formation du tube neural. Celle-ci permet une convergence medio latérale des cellules et une extension de l'axe antéro-postérieur.
La mutation faux sens d'un des principaux gènes de cette voie, *VANGL2*, provoque le développement d'AFTN chez la souris (modèle animal appelé « *loop-tail* ») (De Marco *et al*., 2011).
Les principaux gènes impliqués dans cette voie étudiés sont : *VANGL1* et *2* ; *CELSR1 ; PRICKLE1* ; *PTK7* ; *SCRIB*.

Une des autres voies de signalisation récemment décrite est la voie Sonic Hedgehog (Shh). Cette voie est impliquée dans le développement du SNC, et plus particulièrement dans la polarisation dorso-ventrale du tube neural. L'absence de ligand Shh entraîne des anomalies de la ligne médiane telle que l'holoprosencéphalie. L'hyperactivation de cette voie par un excès de signalisation est suspectée d'entraîner des anomalies de fermeture du tube neural (Murdoch et Copp, 2010). Plusieurs gènes ont déjà été décrits dans la littérature principalement chez la souris comme *Ptch1* (régulateur négatif de Shh) (Goodrich *et al.*, 1997) , *Sufu*, *Rab23*, *Tulp3* …

d. Facteurs socio-économiques

De nombreux facteurs socio-économiques ont été étudiés dont certains ont montré un lien avec le risque de survenue d'anomalies de fermeture du tube neural (Au *et al*., 2010). Une augmentation de la fréquence des AFTN a été observée chez les mères de plus de 40 ans et de moins de 19 ans. Un bas niveau socio-économique des parents semblerait également être un facteur de risque d'AFTN. L'ordre des enfants à la naissance a également fait l'objet d'études épidémiologiques qui ont pu montrer un risque accru avec l'ordre de naissance. L'origine ethnique des mères a également été soulevée tout comme la profession parentale (notamment avec la question de l'impact de l'exposition aux pesticides chez les agriculteurs).

e. Facteurs environnementaux

Le principal facteur environnemental connu ayant un impact sur la survenue d'AFTN est une faible consommation de folates maternelle. Toutefois d'autres facteurs environnementaux ont été étudiés dans l'hypothèse notamment d'une origine multifactorielle (Au *et al.,* 2010). Un des mieux décrit concerne la prise de médicaments anticonvulsivants comme l'acide valproïque ou carbamazépine pendant la grossesse avec un risque augmenté de 10 fois si ce traitement est pris en début de grossesse. Une fièvre en début de grossesse a été également associée à une augmentation du risque d'AFTN ainsi que la consommation de caféine.

f. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge consiste uniquement en la prise en charge des complications liées à ces malformations. Cette prise en charge concerne uniquement les *spina bifida aperta*, les formes « hautes » plus sévères ne sont en général pas viables et les *spina bifida occulta* sont souvent asymptomatiques.

A la naissance, une prise en charge neurochirurgicale est nécessaire dans les 48 premières heures afin de protéger la zone ouverte (méninges et/ou cordon médullaire). Celle-ci doit être la plus rapide possible pour limiter le risque infectieux.

L'hydrocéphalie est une complication fréquemment observée dans cette pathologie et nécessite souvent la pose d'une valve de dérivation ventriculo-péritonéale par voie neurochirurgicale. La malformation d'Arnold Chiari est également fréquente chez ces patients.

L'un des autres axes de prise en charge concerne la prise en charge des séquelles neurologiques qui peuvent être associées à ces malformations : déficits sensitivo-moteurs plus ou moins sévères, les troubles vésico-sphinctériens…

Récemment, des techniques de chirurgie fœtale *in utero* ont été développées aux Etats-Unis dans les années 2000, une première intervention en France a été réalisée par l'équipe du Pr Jouannie à l'hôpital Trousseau à Paris en 2014. L'intérêt de la chirurgie *in utero* réside dans l'amélioration du pronostic neurologique chez ces enfants notamment sur le plan moteur (Farmer *et al*., 2018).

b. Métabolisme des folates et des monocarbones

i. Généralités

1. Folates

a. Origines

Les folates ou vitamines B9 sont des vitamines hydrosolubles essentielles c'est-à-dire non synthétisées par l'être humain mais apportées par l'alimentation. L'acide folique est formé par la liaison d'une molécule d'acide ptéroïque à une molécule d'acide glutamique : l'acide ptéroylmonoglutamique.

Deux formes sont distinguées : l'acide folique, forme oxydée et les formes réduites les tétrahydrofolates.

Tableau 2: Différentes formes de vitamines B9 et leur formules moléculaires (issu de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Formes vitaminiques	Abréviations usuelles	Formules moléculaires
Acide ptéroïque	Pte	C14H12N6O3
Acide ptéroylmonoglutamique	Pte-Glu (acide folique)	C14H12N6O4
Dihydrofolate	7,8-H2-Pte-Glu (DHF)	C14H12N6O5
Tétrahydrofolate	5,6,7,8-H4-Pte-Glu (THF)	C14H12N6O6
N5-méthyle-tétrahydrofolate	5-CH3-H4-Pte-Glu (CH3-THF ou méthylTHF)	C14H12N6O7
N5,N10-méthylène-tétrahydrofolate	5,10-CH2=H-Pte-Glu (CH2-THF ou méthylèneTHF)	C14H12N6O8
N10-formyl-tétrahydrofolate	10-CHO-H4-Pte-Glu ou (10-formylTHF)	C14H12N6O9
N5-formyl-tétrahydrofolate	5-CHO-H4-Pte-Glu (CHO-THF, acide folinique ou 5-formylTHF)	C14H12N6O10
N5,N10-méthényl-tétrahydrofolate	5,10-CH=H-Pte-Glu (CH-THF ou méthénylTHF)	C14H12N6O11
N5-formimino-tétrahydrofolate	5-CHNH-H4-Pte-Glu (CHNH-THF ou formiminoTHF)	C14H12N6O12

Ils sont présents dans l'alimentation sous forme de polyglutamates majoritairement dans les légumes à feuilles vertes (salade, épinards) et les légumes verts (haricots, brocolis…) mais également dans les abats car ils correspondent à des sites de stockages. Les folates sont des vitamines thermolabiles, c'est-à-dire dégradées par la cuisson. Les monoglutamates sont les formes biologiquement actives et les formes pharmaceutiques.

Les apports nutritionnels conseillés (ANC) varient en fonction des périodes de la vie, allant de 150 µg par jour pendant l'enfance, 300 µg par jour à l'adolescence et à l'âge adulte à 400 µg par jour chez la femme enceinte. Les réserves sont hépatiques et épuisables en quelques

mois en cas de carence (recommandation de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ANSES).

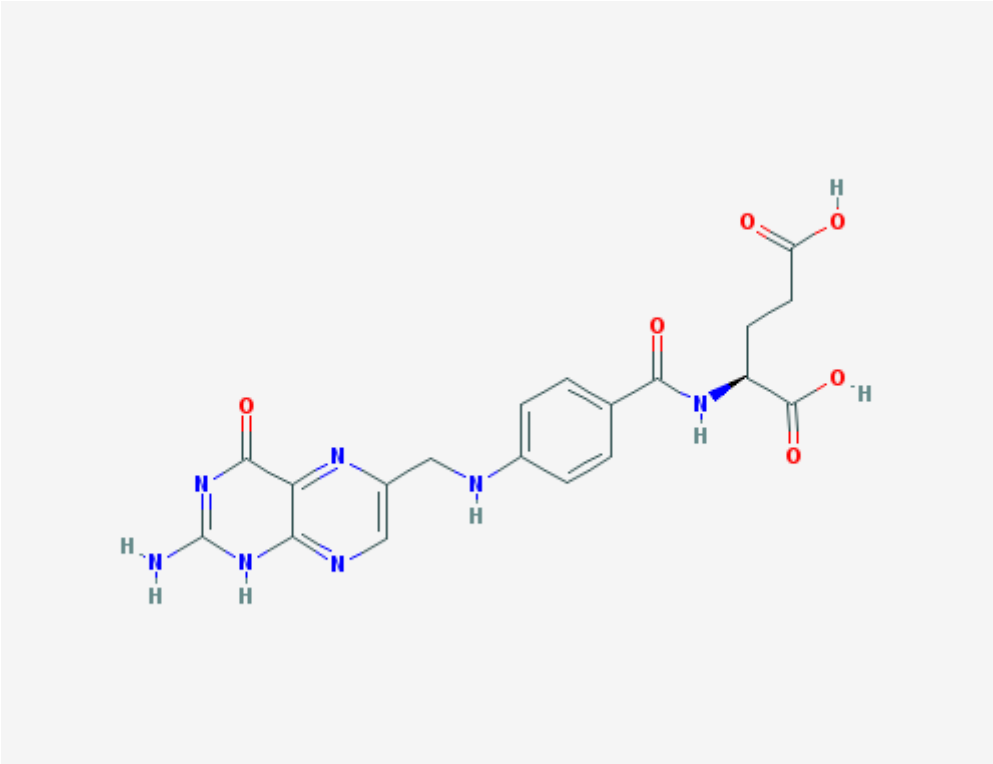


Figure 4 : Structure de l'acide folique $C_{19}H_{19}N_7O_6$ *(issu de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)*

L'absorption se fait au niveau de l'intestin grêle proximal. Après déconjugaison des polyglutamates grâce à la Folate Hydrolase (FOLH1) présente au niveau de la bordure en brosse de l'entérocyte, les monoglutamates sont absorbés au niveau du jéjunum. Trois mécanismes de transports sont décrits au niveau de la bordure en brosse : le premier est le *récepteur des folates réduits* (RFC) codé par le gène *Reduced Folate Carrier* (*RFC*), le second est le *folate receptor* (FR), codé par le gène *SLC19A1*, et le troisième est le *Proton-Coupled Folate Transporter* (PCFT) codé par le gène *SLC46A1.* Les monoglutamates sont ensuite réduits en N5-méthyltétrahydrofolates qui traversent la barrière intestinale pour passer dans le sang portal.

b. Transports des folates

Dans le sang, les folates circulent sous forme de monoglutamates et principalement de 5-méthyl-THF. Ils sont liés soit à des protéines de faible affinité telle que l'albumine, l'alpha macroglobuline ou la transferrine ou à un ligand de haute affinité le *Folate Binding Protein* (FBP). La concentration moyenne de folates sériques circulant dans le sang est estimée entre 5 et 15 µg/L, 20 fois supérieures à la concentration érythrocytaire.

Au niveau de la cellule, la captation et le transport intracellulaire des folates fait intervenir les trois transporteurs : RFC, FR et PCFT. Ces différents systèmes de transport possèdent des caractéristiques différentes quant à leur dépendance vis-à-vis de l'énergie, de la présence d'ions et du pH (Forges *et al.*, 2007 ; Guéant JL *et al.*, 2013).

Le RFC (*Reduced Folate Carrier*, famille des *solute carrier*) est exprimé dans tous les tissus : rein, intestin grêle, côlon, système nerveux central (plexus choroïde, axones, dentrites, cellules apicales bordant le canal rachidien)... Il possède une forte affinité pour les folates réduits, mais une faible affinité pour l'acide folique.

Le *Folate Receptor* (FR) présente une forte affinité pour l'acide folique, mais une faible affinité pour les folates réduits. Trois isoformes sont décrits : FR *alpha*, FR *beta* et FR *gamma*, codés respectivement par *FOLR1*, *FOLR2* et *FOLR3*. Ils sont présents dans de nombreux tissus, comme le rein, les plexus choroïdes pour FRα, les cellules hématopoïétiques ou placentaires pour FRβ. Au niveau des plexus choroïdes, le FRα est localisé du côté plasmatique ou il permet l'entrée des folates par un mécanisme d'endocytose.

Le PCFT appartient aussi à la famille des « *solute carrier ».* Il est principalement présent au niveau intestinal (Qiu *et al*., 2006).

c. Rôles biochimiques

Le rôle principal des folates est la participation aux échanges de groupements monocarbonés, dont les groupements méthyls. Cette vitamine possède donc une fonction essentielle de conversion de l'homocystéine en méthionine nécessaire aux réactions de méthylation, dans le métabolisme de l'histidine et de la glycine et dans la synthèse des nucléotides. Deux autres vitamines du groupe B sont essentielles dans le cycle des monocarbones et agissent comme des co-facteurs : la vitamine B12 et la vitamine B2.

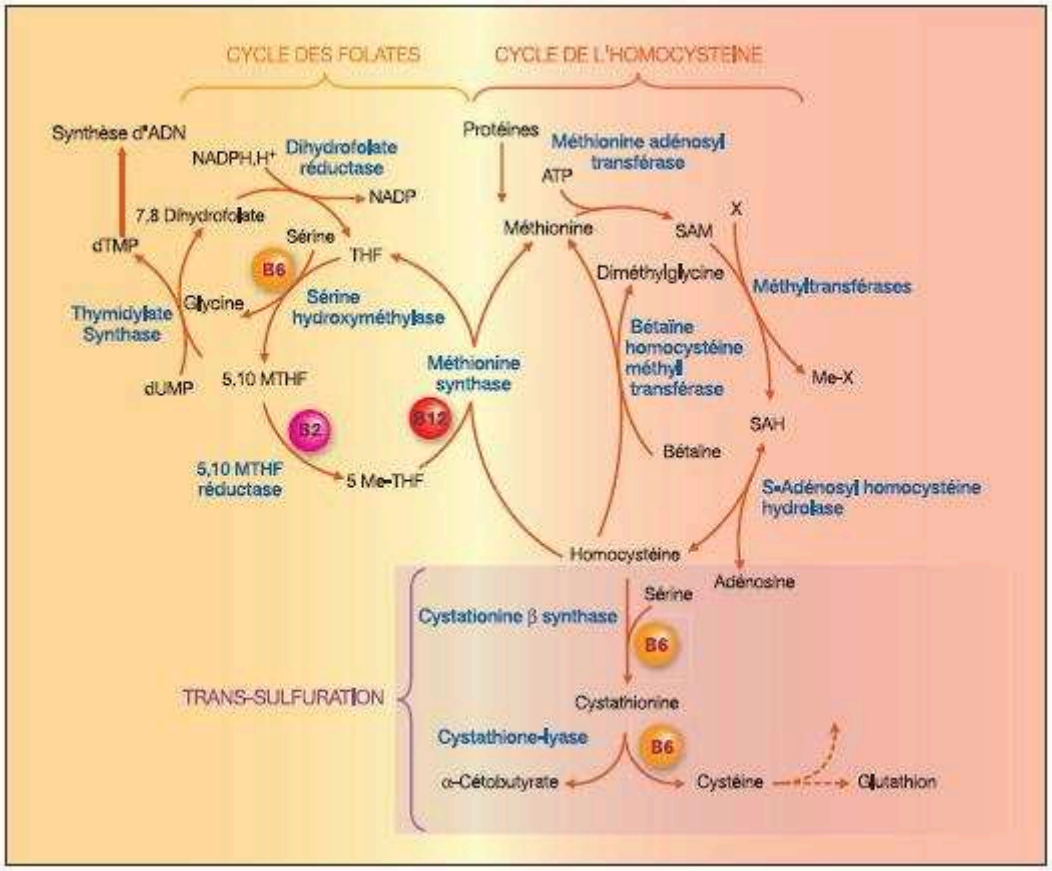


Figure 5 : Cycle des folates et métabolisme des monocarbones

Schéma issu de Cahier de formation biologie médicale n°38 : Les vitamines

d. Pathologies

Les pathologies liées à cette vitamine sont liées à leur carence ou à des anomalies génétiques de leur métabolisme. Dans de très rares cas, il peut s'agir d'un défaut d'absorption des folates d'origine congénitale comme par exemple en cas de mutation du gène codant pour le transporteur PCFT (*SLC46A1*) (Kronn et Goldman, 1993). Il n'existe pas de risque de surdosage ou de toxicité du fait d'une adaptation de l'excrétion rénale aux taux circulants.

Les carences restent relativement fréquentes et sont la conséquence d'une consommation insuffisante d'aliments riches en folates ou d'une cuisson trop importante des légumes. La seconde cause de carence est une mauvaise absorption digestive de ces vitamines (malabsorption, maladie inflammatoire chronique intestinale, alcoolisme chronique…).

En cas de carence en folates, des signes généraux sont fréquemment observés tels qu'une asthénie ou anorexie. L'anémie non régénérative macrocytaire est l'une des pathologies les mieux connues liée à une carence en vitamine B9. En effet, les folates étant nécessaires à la synthèse des purines et pyrimidines, leur carence induit une baisse de la division cellulaire des globules rouges nécessaire à leur régénération et donc une augmentation de leur taille responsable de la macrocytose. Si une carence en fer s'associe, le volume globulaire moyen des globules rouges peut être normal.

Des signes neuropsychologiques peuvent être présents en cas de carence avec des troubles de la mémoire, du sommeil et une irritabilité.

Parfois, les patients rapportent des signes digestifs avec des nausées, vomissements et diarrhées.

Enfin, le rôle des folates est important pendant l'embryogénèse, et la carence chez la maman est associée à un risque accru de malformations congénitales chez l'enfant à venir. Le lien le plus connu et le mieux décrit concerne les anomalies de fermeture du tube neural, dont la recommandation de supplémentation maternelle en période périconceptionnelle a permis de réduire le risque de malformation du tube neural (Czeizel et Dudás, 1992). D'autres liens sont suspectés comme avec les fentes labio-palatines (Wehby et Murray, 2010) ou les malformations cardiaques (Czeizel *et al.*, 2013).

2. Vitamine B12

La vitamine B12 également appelée cobalamine du fait de la présence d'un atome de Cobalt au centre du noyau corrine, est une coenzyme essentielle dans le cycle des monocarbones intervenant dans deux réactions: conversion de l'homocystéine en méthionine grâce à l'enzyme méthionine synthase (MS) et conversion du méthylmalonyl-CoA et succinyl-CoA par la méhylmalonyl-CoAmutase (MUT).

Cette vitamine est présente dans les aliments d'origine animale (principalement dans les abats, la viande rouge, la volaille) (Watanabe, 2007 ; Green *et al*., 2017).

Les apports recommandés sont faibles et varient en fonction de l'âge (maximum chez l'enfant et la femme enceinte), ils sont en moyenne d'environ 3 µg par jour (source ANSES).

L'absorption est complexe et fait intervenir plusieurs protéines de liaison : haptocorine, facteur intrinsèque (FI) et transcobalamine.

La cobalamine présente dans l'alimentation est liée à des protéines. Une fois dans l'estomac, la cobalamine est libérée des protéines grâce à la pepsine et à l'acidité gastrique. Elle se lie ensuite à l'haptocorine d'origine salivaire dans l'estomac. L'haptocorine est ensuite dégradée par les enzymes pancréatiques protéolytiques, qui vont permettre que les cobalamines se lient au facteur intrinsèque (FI).

Chez l'adulte, l'absorption du complexe FI-B12 est réalisée au niveau des entérocytes de l'iléon distal *via* un récepteur (chez l'embryon le récepteur est présent dans tout l'intestin). Le récepteur est un complexe de grande taille, appelé CUBAM constitué de la cubiline (une protéine multi-ligands) et de l'amnionless (protéine transmembranaire). Le facteur intrinsèque est ensuite dégradé au niveau de compartiment lysosomial.

La mégaline (LRP2), codée par le gène *LRP2*, présente un site d'interaction avec la cubiline, un site de fixation des facteurs « sonic hedgehog » (SHH) impliqué dans le développement et un site de fixation du récepteur FOLR1, récepteur à haute affinité, permettant l'internalisation intracellulaire des folates (Gelineau-van Waes *et al*., 2008).

Les cobalamines se lient ensuite à une autre protéine de transport, la transcobalamine (TCN2) synthétisée par les entérocytes. Le complexe ainsi formé passe ensuite dans la circulation sanguine. Environ 20 à 30 % de la cobalamine est liée à la transcobalamine dans la circulation, la majorité est liée à l'haptocorine.

Au niveau cellulaire, l'absorption du complexe Cobalamine-Transcobalamine se fait par endocytose grâce au récepteur de la transcobalamine (CD320) et à la mégaline, selon les organes et tissus. La transcobalamine est lysée au niveau du lysosome, la cobalamine est libérée puis transférée au travers de la membrane lysosomale grâce à la protéine lysosomale LMBRD1 (*protéine lysosomale LMBR domain containing-1*).

Chez l'homme, les deux formes métaboliquement actives de vitamine B12 sont la 5-désoxy-adénosylcobabalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl).

L'AdoCbl est la coenzyme de la Méthylcoenzyme A Mutase (MUT) qui catalyse la réaction qui convertit l'acide méthylmalonique en succinylco-enzyme A au niveau mitochondrial pour permettre ensuite l'utilisation du succunylco-enzyme A au niveau du cycle de Krebs.

Au niveau du cytoplasme, la forme MeCbl est la coenzyme de la méthionine synthase (MS) qui permet la production de Méthionine par trans-méthylation de l'homocystéine. Le 5-méthyl-tétrahydrofolate apporte le groupement méthyle qui sera transféré.

Le stockage de la vitamine B12 est principalement hépatique, il représente 2 à 3 mg et permet de couvrir les besoins pendant plusieurs mois en cas de carence.

Son élimination se fait par les urines, la bile et les selles.

La carence en vitamine B12 est plus fréquente dans les pays en voie de développement ou l'accès à la viande est difficile (Green *et al*., 2017). Dans les pays industrialisés, les cas de carence en vitamine B12 sont décrits chez les végétariens ou végétaliens. Une malabsorption digestive peut également avoir comme conséquence une carence en vitamine B12.

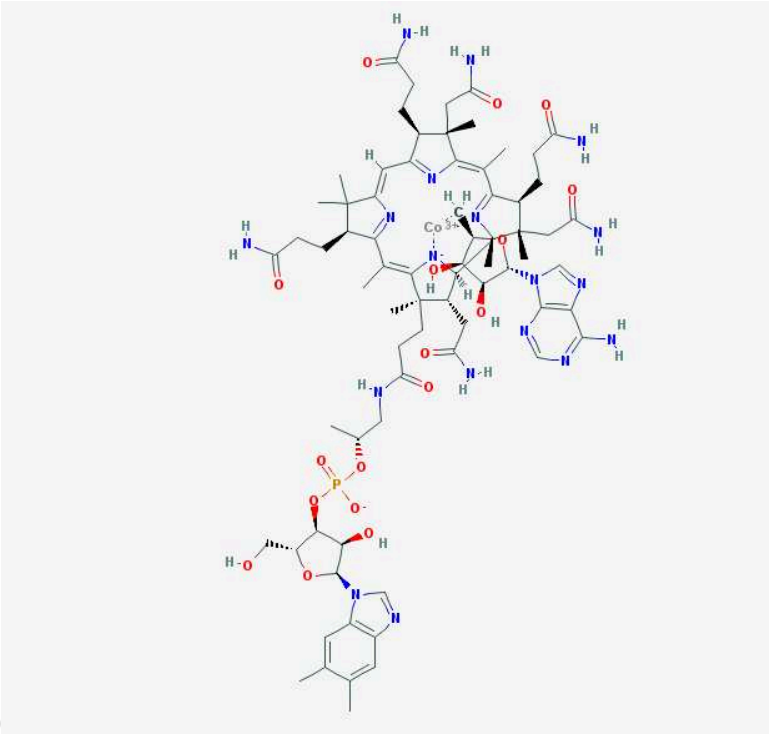
La maladie de Biermer est une maladie auto-immune liée à la production d'anticorps dirigés contre le facteur intrinsèque, l'absorption de la vitamine B12 est rendue impossible par défaut de liaison au facteur intrinsèque entraînant la carence.

La maladie de Gräsbeck-Imerslund est liée à un défaut d'absorption sélectif de la vitamine B12 dû à une anomalie du récépteur du complexe vitamine B12-FI, soit par mutation de la cubiline ou par mutation de l'amnionless.

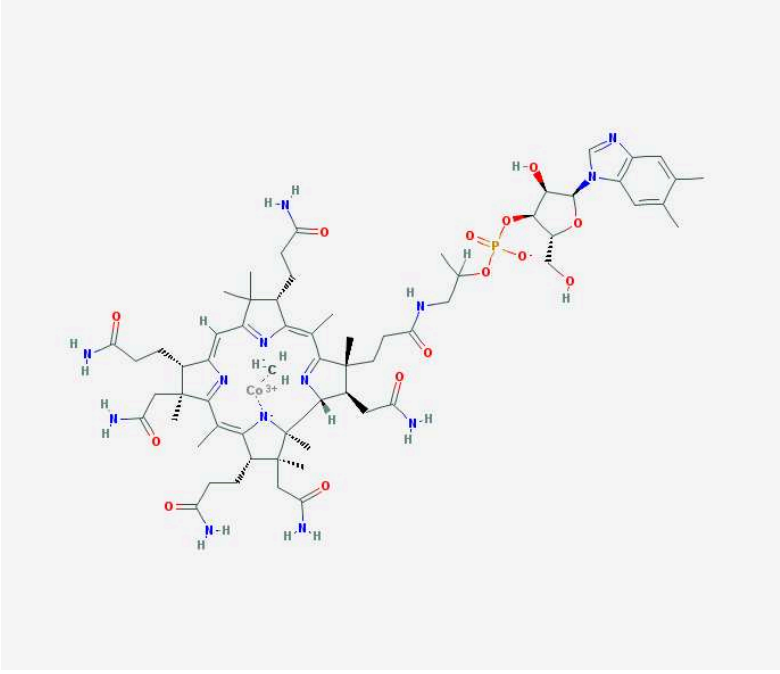
La principale conséquence d'une carence en vitamine B12 est l'anémie mégaloblastique similaire à celle observée en cas de carence en vitamine B9, secondaire à une diminution de l'hématopoïèse.

La vitamine B12 est aussi importante au niveau du système nerveux central et l'on peut observer en cas de carence une neuropathie périphérique sensitive bilatérale.

Au niveau muqueux, la carence en vitamine B12 peut s'accompagner d'une atrophie villositaire renforçant la malabsorption ou d'une glossite « de Hunter » avec une langue lisse et dépapillée.



a)



b)

Figure 6 : Représentation de la 5-désoxy-adénosylcobabalamine (a) et de la méthylcobalamine (MetCbl) (b)

3. Cycle de la méthionine et réaction de méthylation

La méthionine est synthétisée à partir de la reméthylation de l'homocystéine, grâce à la méthionine synthase dont la vitamine B12 est une co-enzyme. Elle est ensuite transformée en S-adénosyl-methionine (SAM), qui est le principal donneur de méthyl, puis convertie en S-adénosyl-homocystéine (SAH) (figure 5 : schéma cycles folates et monocarbones). Les groupements méthyls ainsi produits sont ensuite disponibles pour les réactions de méthylation (de l'ADN, des protéines, ….).

La méthylation de l'ADN fait partie des mécanismes de régulation épigénétique, c'est-à-dire des mécanismes qui permettent de modifier l'expression des gènes sans modification de la séquence codante d'ADN. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN se produit principalement sur les résidus de cytosine suivis d'une guanine (CpG). La méthylation est catalysée par les ADN Méthyltransférases (DNMT) qui transfèrent le groupement méthyl de la S-adényl-méthionine vers le 5ème carbone du résidu cytosine pour former la 5-méthylcytosine. La méthylation des régions promotrices des gènes est souvent associée à une répression de leur expression, l'absence de méthylation à une activation de l'expression. La méthylation de l'ADN s'accompagne fréquemment de modification de la structure de la chromatine, avec la méthylation des histones entraînant une condensation de la chromatine (appelée hétérochromatine), rendant impossible la transcription.

La méthylation de l'ADN est un phénomène dynamique et réversible, évoluant selon plusieurs phases au cours du développement. En effet, après la fécondation, au cours des premières phases de développement a lieu une vague de déméthylation complète du génome, rapidement suivie avant l'implantation d'une reméthylation des gènes dizygotes (Ladstätter et Tachibana, 2018). Les gènes soumis à empreinte (exprimés soit à partir de l'allèle maternel soit à partir de l'allèle paternel et régulés par méthylation) sont eux protégés de cette vague de déméthylation.

Les protéines peuvent également subir des réactions de méthylation, en général sur l'azote N-terminal ou sur un carbone de la chaîne carbonée des acides aminés. Un exemple de méthylation de protéine est l'histone qui peut être méthylé au niveau de leur portion N-terminale grâce des enzymes appelées histones méthyltransférase. Cette méthylation s'associe à une activation ou une répression de la transcription des gènes selon le nombre de

résidus méthylés et l'acide aminé méthylé. La méthylation des histones s'accompagne d'une modification de la structure de la chromatine, entraînant une condensation de la chromatine (appelée hétérochromatine), rendant impossible la transcription.

Les lipides sont un autre substrat pour les réactions de méthylation. Par exemple, les Phosphatidylcholines (PCs) (phospholipides constituant de nos membranes) sont synthétisés suite à plusieurs réactions de méthylation catalysées par les transméthylases SAM-dépendantes.

L'homocystéine formée à l'issue des réactions de méthylation est ensuite métabolisée par l'une des deux voies. La première est la trans-sulfuration, qui consiste en une conversion irréversible de l'homocystéine en cystéine avec un intermédiaire, la cysthathionine obtenue grâce à la CBS (cystathionine-béta-synthase). La cystéine permet la production de glutathion qui possède un rôle clé dans les réactions redox. La seconde implique la reméthylation de l'homocystéine en méthionine grâce à la méthionine synthase.

Le donneur de méthyl pour la méthionine synthase est le 5-MTHF qui est convertit en THF. Le THF est ensuite méthylé et devient le 5,10-MTHF à la suite d'une série de réactions catalysées par la MTHFD-1 (*methyl tetrahydrofolate dehydrogenase* de type 1). La plupart du 5,10-MTHF est métabolisé en 5-MTHF, la seule forme de folates réduits utilisée dans le système nerveux central et dans le sang. La portion restante est convertit en Dihydrofolate par la thymidine synthase aboutissant à la synthèse de Thymidilate qui est nécessaire pour la réplication de l'ADN et qui peut être reconvertit en THF par la dihydrofolate réductase (DHFR).

ii. Métabolisme des folates dans l'autisme

Parmi les facteurs nutritionnels impliqués dans l'autisme, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des folates dans l'autisme. En effet, le dysfonctionnement du métabolisme des folates et des monocarbones a été évoqué dans la physiopathologie de l'autisme.

Les taux de SAM (S-adénosyl méthionine), d'homocystéine, de cystéine et de glutathion ont été décrits significativement plus bas chez les enfants autistes comparés aux témoins, avec à l'inverse des taux de SAH (S-adenosylhomocystéine), d'adénosine et de glutathion oxydé significativement plus élevés (James *et al.*, 2004). Ce profil métabolique pourrait traduire une diminution des capacités de méthylation associée à un stress oxydatif (avec un ratio redox diminué) chez les enfants autistes.

Parallèlement, la supplémentation périconceptionnelle maternelle en folates a été décrite comme associée à une baisse du risque de survenue de trouble autistique chez l'enfant à venir (Surén *et al*., 2013; Schmidt *et al.*, 2012).

De plus, la présence maternelle de variant de gènes du métabolisme des monocarbones (tels que *MTHFR*, *CBS*, *BHMT*, *FOLR2*, …) associée à l'absence de supplémentation en folates en début de grossesse est corrélée à un risque accru de troubles du spectre autistique (Schmidt *et al*., 2011).

De précédentes études ont montré que la carence en folates au niveau cérébral peut se traduire par des troubles neurologiques auxquels s'ajoutent des troubles autistiques comme dans le syndrome de déficience en folates cérébral (Ramaekers et Blau, 2004). Ce syndrome est défini sur le plan biologique par un taux bas de 5-methyl tétrahydrofolate (métabolite actif de l'acide folique) dans le LCR, avec un taux plasmatique normal. Sur le plan clinique, les principales manifestations sont un retard mental, une ataxie cérébelleuse, une paraplégie spastique, une microcéphalie, auxquels peuvent s'ajouter des troubles autistiques (Ramaekers *et al.*, 2002).

Deux mécanismes mènent à cette carence (Ramaekers *et al*., 2013; Ramaekers *et al.*, 2007). Le premier est lié à une mutation du récepteur aux folates FRα, présent notamment au niveau de la barrière hémato-encéphalique rendant la liaison avec l'acide folique impossible et donc l'impossibilité de l'acide folique à passer la barrière hémato-encéphalique. Le second

et le plus fréquent est lié à la présence d'anticorps dirigés contre ce récepteur (Anticorps Anti-FRα ou FRA) qui empêchent la liaison avec l'acide folique en bloquant le récepteur, le passage de l'acide folique au travers la barrière hémato céphalique est altéré, responsable d'une carence en folates au niveau cérébral.

L'administration d'acide folinique, forme réduite d'acide folique peut corriger le déficit en folates cérébral puisque son passage au travers la barrière hémato-encéphalique peut être médié, lorsque sa concentration est élevée par un autre récepteur, le *Reduced Folate Carrier* (RFC) situé au niveau des plexus choroïdes et permet ensuite son utilisation «directe» par les cellules neuronales.

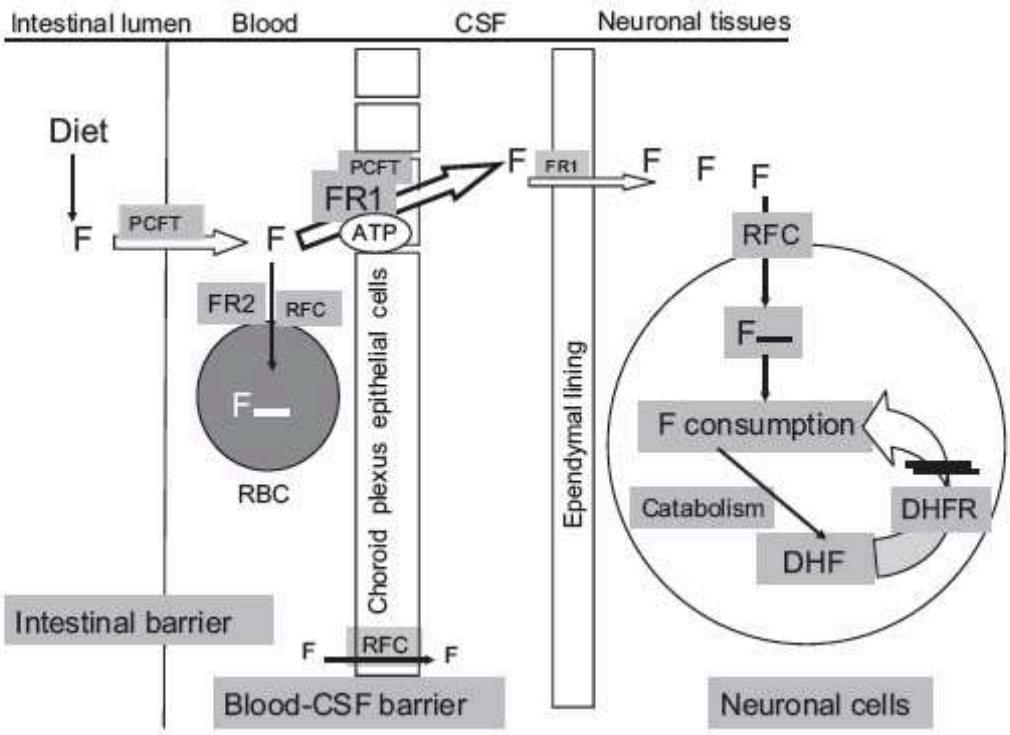


Figure 7: Passage de l'acide folique et acide folinique au niveau de la barrière hémato-encéphalique. D'après Sequeira et al., 2013

L'acide folinique est une forme réduite d'acide folique sous forme de dérivé 5-formyl d'acide tétrahydrofolique. L'acide folinique ne nécessite pas l'action de la dihydrofolate réductase pour sa conversion (enzyme inhibée par certains médicaments comme le méthotrexate). Son activité biologique est similaire à celle de l'acide folique. L'acide folinique est habituellement utilisé en thérapeutique en prévention ou en correction de l'hématotoxicité associée à certains médicaments comme letriméthoprime, la salazopyrine, la pyriméthamine, ou en prévention de la toxicité du méthotrexate.

L'administration d'acide folinique à hautes doses (0,5 à 1 mg/kg/j initialement, augmentée à 2 à 3 mg/kg/j en 2 prises égales selon la réponse clinique) permet de normaliser les taux de 5-MTHF dans le liquide céphalo-rachidien chez ces patients. L'amélioration clinique, notamment des symptômes autistiques, après un traitement par acide folinique a pu être évaluée chez quelques enfants présentant un syndrome de carence en folate cérébral (Ramaekers *et al.*, 2002).

Tout comme dans le syndrome de carence en folate cérébral, la présence d'anticorps anti-récepteurs aux folates cérébral (anti FRα ou FRA) a été mise en évidence chez des enfants présentant des troubles du spectre autistique (Frye *et al*., 2016). Deux types d'anticorps ont été décrits : les anticorps bloquants («*blocking FRA*») et liants («*binding FRA*»). Dans une de ces études, les anticorps anti-FRα ont été mis en évidence chez les enfants autistes : 60 % (56 sur 93 enfants) pour les « *blocking* FRA » et 44 % pour les « *binding* FRA » (41 sur 93), 29 % des enfants autistes avaient les deux types d'anticorps anti-FRα (Frye *et al.*, 2013). La présence de ces anticorps dans la population générale est estimée entre 4 et 15 % (variabilité selon les origines géographiques : estimée à 4 % pour les hispaniques (Berrocal-Zaragoza *et al*., 2009), 9 à 13 % pour les Irlandais (Molloy *et al.*, 2009a), entre 10 et 15 % dans la population américaine (données Edward Quadros non publiées).

Selon le même mécanisme que dans le syndrome de carence en folate cérébral, ces anticorps sont responsables d'une carence en folates au niveau cérébral (taux bas de 5 méthyl tétrahydrofolate) avec comme traduction clinique possible les troubles autistiques.

Le principal mécanisme expliquant la production d'auto-anticorps dirigés contre le FR-*alpha* apparaît être liée à une réaction immunitaire secondaire à la présence de FR

soluble dans le lait de vache. Du fait d'une homologie avec le FR humain, ces auto-anticorps ainsi produits se lient au FR présent au niveau des cellules épithéliales du plexus choroïde et bloquent le passage de l'acide folique et entraîne de cette façon la carence en folate cérébrale. Un régime d'éviction du lait de vache pendant 12 semaines permet une baisse du taux de ces anticorps (Ramaekers *et al*., 2008).

L'évaluation de l'efficacité de l'acide folinique chez les enfants présentant des troubles du spectre autistique a été très peu étudiée à grande échelle.

Une première étude a été réalisée aux Etats-Unis (Frye *et al.*, 2016) : 44 enfants autistes avec des anticorps anti-FRα positifs ont été traités par acide folinique sous forme de Leucovorine de calcium à doses progressives jusqu'à 2 mg/kg/jour en deux prises quotidiennes (maximum 50 mg/jour) sur une période de 16 semaines. Comparé au groupe contrôle, il a été noté une amélioration sur le plan de la communication verbale, du langage, de l'attention et du comportement. Chez un tiers de ces enfants traités, une amélioration modérée à importante a été notée. Une seconde étude a été menée sur 48 enfants traités pendant 12 semaines par acide folinique (2 mg/kg/jour) versus placebo pendant 12 semaines (Frye *et al*., 2018). Celle-ci a pu montrer une amélioration de la communication verbale significativement plus importante dans le groupe recevant de l'acide folinique, l'amélioration étant significativement associée à la présence des anticorps anti-FR *alpha*.

iii. Métabolisme des folates dans les anomalies de fermeture du tube neural

L'implication de ces vitamines dans la survenue d'anomalie de fermeture du tube neural (AFTN) a été évoquée dès les années 1970 avec la constatation de taux de folates plasmatiques abaissés avec des taux d'homocystéine augmentés chez les mères d'enfants avec AFTN. De premières études interventionnelles réalisées dans les années 1980 ont suggéré une baisse de l'incidence des anomalies de fermeture du tube neural chez des femmes ayant des antécédents de grossesse avec AFTN grâce à des supplémentations vitaminiques multiples (dont 0,36 mg d'acide folique par jour) ou par supplémentation en acide folique seul (4 mg/j). En 1991, une première étude contrôlée randomisée multicentrique a pu clairement démontrer le rôle d'une supplémentation en acide folinique (4 mg/jour) en période périconceptionnelle sur la réduction du risque de survenue d'AFTN (Vitamin Research Study, 1991; Crider *et al*., 2011 ; Czeizel et Dudás, 1992). Ceci a pu aboutir dès 1992 à des recommandations pour la supplémentation en acide folique en période pré-conceptionnelle en Grande Bretagne. En France, il faudra attendre 2001 pour que les premières recommandations concernant la supplémentation péri-conceptionnelle en acide folique soient émises : 0,4 mg par jour chez les femmes sans facteur de risque et 5 mg par jour chez les femmes à risque (ayant déjà un enfant avec une AFTN, ou exposé à un traitement à risque comme le valproate de sodium), 4 semaines avant la conception et jusqu'à 12 semaines d'aménorrhée (recommandations HAS 2010). La supplémentation en acide folique permettrait ainsi une baisse de 50 à 70 % du risque de survenue d'AFTN (Crider *et al*., 2011 ; Rosenthal *et al*., 2014).

De la même façon, la carence en vitamine B12 chez les femmes enceintes a été associée à un risque accru d'anomalie de fermeture du tube neural dans de nombreuses études (Molloy *et al.*, 2009b).

L'implication de ces deux vitamines dans les anomalies de fermeture du tube neural à amener à étudier le polymorphisme des gènes intervenant dans ce métabolisme.

Le premier gène étudié en lien avec la survenue d'AFTN est le gène *MHTFR* avec le variant c.665C>T (rs1801133) (Frosst *et al*., 1995). Ce gène codant pour l'enzyme 5,10 méthyltétrahydofolate réductase et se situe en position 1p36.3 sur le chromosome 1. Cette enzyme catalyse la réaction de transformation du 5,10-méthyltétrahydorofolate en 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF).

Le variant *MTHFR* c.665C>T a pour conséquence le remplacement d'une valine par une alanine au codon 222, ceci entraîne une diminution de l'activité de l'enzyme avec la température, c'est pourquoi il est également appelé « thermolabile », ce qui se traduit sur le plan biologique par une diminution du taux de folates et une augmentation modérée du taux d'homocystéine. Plusieurs études ont pu démontrer l'association entre la présence de ce variant à l'état homozygote ou hétérozygote chez l'enfant ou sa mère et l'augmentation du risque de survenue de *spina bifida* (van der Put *et al.*, 1997; Botto et Yang, 2000).
Un autre variant du gène *MTHFR* a été décrit : c.1286A>C (rs1801131) qui induit également une baisse de l'activité de l'enzyme associé à une augmentation du risque de survenue de AFTN à l'état homozygote (van der Put *et al*., 1998).

Le variant c.80A>G du gène *RFC* (*Reduced Folate Carrier-SLC19A1*) (rs1051266) a également été associé au risque de survenue d'AFTN s'il est présent chez la mère comme chez l'enfant (De Marco *et al*., 2003).

Deux gènes principaux intervenant dans le cycle de la méthionine et reméthylation de l'homocystéine ont été beaucoup étudiés : le gène de la méthionine synthase (*MTR*) et de la méthionine réductase (*MTRR*). La méthionine synthase est une enzyme qui catalyse la réaction de transfert du groupement méthyl du 5-méthyl-THF à l'homocystéine en utilisant la vitamine B12 comme cofacteur. Un variant du gène *MTR* c.2756A>G (rs1805087) a été évoqué comme associé au risque d'AFTN chez des cas italiens (Guéant-Rodriguez *et al*., 2003). Le variant du gène *MTRR* c.66A>G (rs1801394) a été également décrit comme associé au risqué de *spina bifida* si la mère en est porteuse à l'état homozygote (Candito *et al*., 2008 ; Guéant-Rodriguez *et al.*, 2003).

Les facteurs génétiques influençant l'absorption de la vitamine B12 sont également associés au risque d'AFTN. La présence du variant rs1907362 sur le gène de la cubuline (*CUBN*) semblerait être associé à une augmentation du taux sérique de vitamine B12 et une diminution du risque d'AFTN. La présence du variants c.776G>C sur le gène transcobalamine 2 (*TCN2*) a également été décrite comme associée au risque d'AFTN (Afman *et al*., 2002). *GIF*, qui code le facteur intrinsèque gastrique et *FUT2*, qui influence sa glycosylation, sont deux gènes associés à l'absorption et au taux sanguin de vitamine B12. *GIF* et *FUT2* sont associés au risque d'AFTN chez 183 fœtus avortés comparés à 375 nouveau-nés en bonne santé. La fréquence de l'allèle GIF290C a été estimée à 0,4 % chez les nouveau-nés en bonne santé et à 8,1 % chez les fœtus présentant une AFTN (odds ratio 17,8). Le génotype combiné

du variant hétérozygote GIF 290C et du variant *FUT2* rs601338 a été signalé chez 6 des 37 fœtus atteints d'AFTN, mais pas chez les autres fœtus et les nouveau-nés en bonne santé (P <0,0001) (Guéant-Rodriguez *et al.*, 2018).

Il existe à ce jour de nombreuses études concernant le lien entre les polymorphismes des gènes du métabolisme des monocarbones et la survenue d'AFTN avec parfois des résultats contradictoires. Malgré de nombreuses données bibliographiques, les mécanismes impliquant les folates et la vitamine B12 dans cette pathologie ne sont, à ce jour, toujours pas clairement élucidés mais le lien avec la méthylation est fortement suspecté.

Il existe également des cas d'AFTN dits «résistants aux folates», c'est-à-dire non prévenus par une supplémentation adéquate en acide folique en période périconceptionnelle suggérant l'implication d'autres voies métaboliques.

II. Etude EFFET : évaluation de l'efficacité de la vitamine B9 sur la réduction des troubles du spectre autistique

a. Bases scientifiques de l'étude

Notre projet entre dans le cadre d'une collaboration internationale avec le service de biochimie du Pr Quadros de New York afin d'évaluer la prévalence des anticorps anti-FRα en France et l'efficacité d'un traitement par acide folinique, à une dose moindre que celle précédemment testée aux Etats-Unis.

Cette étude s'appuie en partie surle protocole d'étude utilisé par le Pr Quadros et le Dr Rossignol aux Etats-Unis (Frye *et al.*, 2018) dans le but de répliquer les résultats au sein d'autres populations.

L'objectif est de réaliser une première étude pilote en France sur un faible nombre de sujets afin d'obtenir des premières estimations françaises dans le but de réaliser secondairement une étude sur un plus grand effectif (plusieurs dizaines d'enfants) dans l'interrégion Est.

b. Matériel et méthode

i. Descriptif de l'étude

Il s'agit d'une étude interventionnelle monocentrique randomisée en simple aveugle comparant un traitement par acide folinique 10 mg par jour (5 mg deux fois par jour) à un placebo sur une durée de 12 semaines chez des enfants présentant des troubles du spectre autistiques réalisée au CHU de Nancy.

La population concernée par l'étude est celle d'enfants présentant des troubles du spectre autistiques suivis au sein du service de génétique clinique à l'hôpital d'enfants ou au centre de ressources autisme de Lorraine.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de l'acide folinique, sous forme de folinate de calcium (FOLINORAL®) 5 mg 2 fois par jour pendant 12 semaines, sur la réduction des troubles autistiques en particulier sur la communication et les interactions sociales.

Les objectifs secondaires de l'étude sont :

- d'évaluer l'efficacité de l'acide folinique sur la réduction des symptômes autistiques perçus par les parents.
- d'évaluer la constance du taux des anticorps anti-récepteurs aux folates FRα chez les enfants autistes 12 semaines après le démarrage du traitement.
- d'étudier le lien entre la présence d'anticorps anti-récepteurs aux folates FRα au démarrage du traitement et la réponse au traitement par acide folique 12 semaines après son initiation.
- d'évaluer la tolérance de l'acide folinique au cours des 12 semaines de traitement et à l'issu de ce traitement.

Les critères d'inclusion de l'étude sont les suivants :

- Enfants souffrant de troubles du spectre autistique définis par : *Autism Diagnostic Observation Schedule* (ADOS), *Autism Diagnostic Interview* (ADI), *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) ou diagnostiqué par un médecin spécialisé (pédiatre, pédopsychiatre)
- Enfants âgés de 3 ans à 10 ans

- Poids supérieur à 10 kg
- Altération du langage (basée sur l'évaluation médicale)
- Possibilité de maintenir les autres thérapies débutées avant l'étude
- Pas de modifications de prise en charge thérapeutiques dans les 8 semaines précédant le début de l'étude

Les critères d'exclusion sont détaillés dans la fiche 1.

Le critère de jugement principal pour cette étude est la différence du score obtenu par l'échelle ADOS (*Autism Diagnosis Observation Schedule*) pour les parties «communication» et «interactions sociales réciproques» entre l'inclusion (T0) et après 12 semaines de traitement (S12) dans les deux groupes (acide folinique et placebo).
L'échelle ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*) est une échelle standardisée permettant d'évaluer les symptômes autistiques et plus particulièrement la communication, les interactions sociales réciproques, le jeu, les comportements stéréotypés et intérêts restreints (Lord *et al*., 1989 ; Constantino *et al*., 2003 ; Gotham*et al.*, 2009). Il s'agit d'un examen de référence utilisé régulièrement en France notamment pour le diagnostic de trouble du spectre autistique et lors du suivi grâce à une version française. Nous avons choisi d'utiliser les parties « interactions sociales réciproques » et « communication » car ce sont les symptômes autistiques les plus susceptibles de se modifier sur un temps de suivi court (Score détaillé dans la Fiche n°2).

Le résultat obtenu est un score permettant d'évaluer la sévérité des symptômes : plus le score est élevé plus la maladie autistique est sévère (score maximal à 26).

Les critères de jugement secondaires sont :

- L'efficacité de l'acide folinique à l'issue des 12 semaines de traitement sur la réduction des symptômes perçue par les parents sera évaluée par la différence de score obtenu par l'échelle d'hétéroévaluation SRS entre T0 et S12 dans les deux groupes (acide folinique versus placebo).

La *Social Responsiveness Scale* (SRS) est une échelle d'hétéroévaluation remplie par l'un des deux parents permettant d'évaluer les caractéristiques comportementales autistiques :

communication, relation sociale, comportements stéréotypés et intérêts restreints. Cette échelle comprend 65 items, avec des scores de 0 à 3 pour les items dits «positifs» et de 4 à 1 pour les items dits «inversés» (Constantino *et al*., 2003) (Score détaillé dans la fiche n°3).

Cette échelle permet une évaluation des troubles autistiques entre 2 ans et demi et l'âge adulte.

Le résultat est un score sur 260. Plus le score est élevé plus la maladie autistique est sévère. Un score supérieur ou égal à 75 est utilisé comme seuil pour définir des troubles autistiques. Un score entre 66 et 75 indique une déficience modérée dans les interactions sociales réciproques. Un score entre 60 et 65 signifie des déficits légers à modérés dans les interactions sociales réciproques. Un score inférieur à 59 est considéré dans les limites de la normale.

L'échelle SRS est rédigée en anglais, elle a été traduite en français pour notre étude avec l'aide de pédopsychiatre du Centre Ressource Autisme (CRA) Lorraine (Dr Romain Coutelle).

- La constance du taux des anticorps anti-FRα sera évaluée par la différence de dosage réalisé à l'inclusion et celui à l'issu de la 12ème semaine de traitement. Le traitement par acide folinique n'est pas censé modifier le taux de ces anticorps.

- La réponse au traitement sera évaluée par le score ADOS et SRS en fonction de la présence ou absence d'anticorps anti- FRα après 12 semaines de traitement.

Autorisation et éthique :

L'étude a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Est III le 09/04/2015 (n°15.04.06) et une autorisation de l'ANSM (n°150314A-31) le 01/05/2015. Elle est enregistrée sous le numéro EUDRACT : 2015-000955-25.

ii. Déroulement de l'étude

Deux visites au CHU de Nancy sont prévues dans le cadre de l'étude EFFET.

Visite d'inclusion à T0 :

À cette visite, l'investigateur vérifie si les critères d'inclusion sont remplis pour le patient. Le consentement parental signé (ou des titulaires de l'autorité parentale, le cas échéant) sera recueilli après information orale et remise d'une fiche d'information écrite. Une fois le consentement signé l'enfant pourra être inclus dans l'étude.
La randomisation pour l'attribution du groupe de traitement (acide folinique ou placebo) sera effectuée lors de cette visite d'inclusion. La randomisation sera faite à partir d'une liste de randomisation simple et un numéro de l'étude anonymisé sera attribué.

Lors de cette visite, l'enfant bénéficiera d'un examen clinique avec mesure du poids de la taille, du périmètre crânien et de l'IMC (indice de masse corporel) et d'une évaluation des symptômes autistiques avec les échelles ADOS et SRS.
Un bilan biologique est réalisé au cours de cette visite pour la réalisation de :
- dosage des anticorps anti-récepteur FRα (1 tube sec de 5ml de sang) (technique de dosage détaillée dans la fiche n°4)
- dosage des folates sériques, les isoformes et leurs marqueurs métaboliques (1 microtube tube, sec sans gel séparateur, de 1 ml de sang) (technique de dosage détaillée dans la fiche n°5)
- dosage des folates érythrocytaires, les isoformes et leurs marqueurs métaboliques (1 tube EDTA de 1,2 ml de sang) (technique de dosage détaillée dans la fiche n°5)
Les marqueurs métaboliques sont : homocystéine, acide méthylmalonique (MMA), S-adénosyl méthionine (SAM), S-adénosyl homocystéine, méthionine. (Techniques de dosage détaillées en annexe n°6).
Les isoformes des folates sont : 5 methyl-THF, THF, 5-10 méthényl-THF, et 5-Formyl-THF.

Les données recueillies seront consignées dans le cahier d'observation spécifique à cette étude. Ce cahier recueillera les diverses informations cliniques initiales (critères d'inclusion

et d'exclusion), les évaluations initiales avec les scores ADOS et SRS, le recueil des données du suivi et la collecte d'éventuel(s) effet(s) indésirable(s).

Les informations cliniques recueillies dans le dossier médical (dont les résultats du bilan génétique si celui-ci a été effectué avant l'inclusion dans l'étude) lors de la visite d'inclusion sont détaillées dans la fiche n°7.

Un calendrier de traitement sera remis aux parents avec, pour chaque jour noté, le traitement à administrer et la possibilité pour les parents d'y rapporter d'éventuel(s) effet(s) indésirable(s).

Intervention médicamenteuse :
Dans le groupe acide folinique, les enfants recevront de l'acide folinique sous forme de folinate de calcium en gélule (FOLINORAL®) à la posologie de 5 mg à raison de 2 fois par jour, pendant 12 semaines, soit 10 mg par jour.

Dans le groupe placebo, le traitement sous forme de gélule contenant du lactose sera donné en 2 prises par jour pendant 12 semaines afin de maintenir l'aveugle.

Suivi pendant le traitement :
Au cours des 12 semaines de traitement, deux contacts téléphoniques sont pris avec la famille (à 3 et 6 semaines) pour rechercher d'éventuels effets indésirables et pour évaluer l'observance du traitement. En cas de survenue d'effet indésirable grave, le traitement sera arrêté après évaluation médicale.

Visite à S12 :

Cette visite aura lieu après la 12ème semaine d'intervention. L'évaluation des symptômes autistiques réalisée à la visite d'inclusion sera répétée avec les mêmes échelles (ADOS et SRS). L'évaluation ADOS sera réalisée par la même personne que lors de l'évaluation à la visite d'inclusion. Le questionnaire SRS sera rempli par le même parent ayant répondu à cette évaluation à la visite d'inclusion.

L'observance des prises médicamenteuses sera évaluée par la pharmacie du CHRU de Nancy par le comptage d'éventuelles gélules retournées dans le flacon pilulier.
Un prélèvement sanguin sera réalisé au cours de cette visite pour le dosage des anticorps anti-récepteurs aux folates FRα.

Les effets indésirables possibles seront également relevés lors de cette visite.

Suivi après la fin du traitement :

Un contact téléphonique aura lieu 12 semaines après la fin de l'intervention (à la 24ème semaine après le début de l'étude). Un questionnaire sera rempli par téléphone afin de recueillir d'éventuels effets indésirables tardifs (fiche n°8). Ce questionnaire recueillera particulièrement les manifestations allergiques, digestives et comportementales.

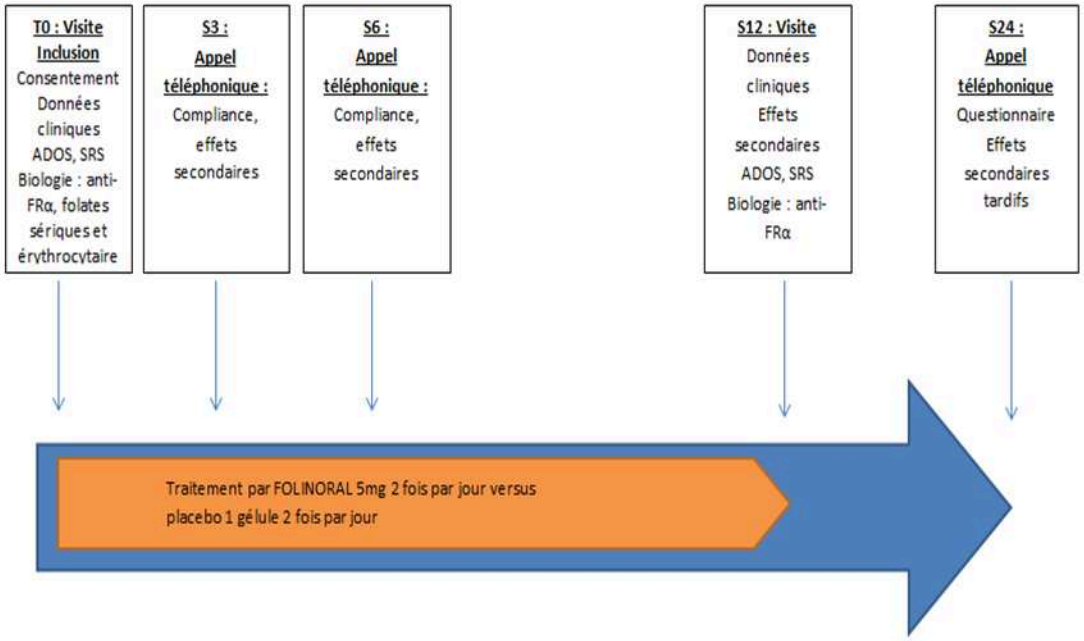


Figure 8 : Chronologie de l'étude EFFET

iii. Analyse statistique :

Les variables recueilles sont décrites globalement puis selon chaque sous-groupe de traitement. Les variables catégorielles seront décrites en pourcentage, les variables continues par la moyenne, l'écart-type, la médiane.

L'analyse des résultats est faite en intention de traiter. La comparaison des critères de jugement (scores ADOS et SRS) sera effectuée par un test t de Student après vérification des hypothèses de normalité ou Man et Withney le cas échéant. Le seuil de significativité statistique (p) est fixé à 0,05.

La corrélation de Spearman sera utilisée pour étudier le lien entre deux variables (coefficient de corrélation rho : r).

Un calcul de puissance *a posteriori* sera également effectué. Aucune analyse en sous-groupes ni intermédiaire n'est prévue.

Les analyses seront réalisées sous STATA.

c. Résultats

i. Description clinique de la population de l'étude

19 enfants ont été inclus dans l'étude : 4 filles et 15 garçons. La moyenne d'âge à l'inclusion est de 6 ans et 4 mois (écart-type 2 ans). L'ensemble des enfants inclus présentent un autisme infantile diagnostiqué par des pédopsychiatres et sont suivis soit au sein du centre ressource autisme lorraine ou de centres médico-psychologiques de proximité.

Les caractéristiques des enfants à l'inclusion sont résumées dans le tableau 3.

Un enfant a quitté l'étude au bout de 1 mois et 3 semaines de traitement, 18 enfants ont suivi les 12 semaines de traitement.

Tableau 3 : Données cliniques des patients inclus dans l'étude

	Moyenne	Médiane	Ecart type
Données néonatales			
Age gestationnel (SA)	39,42	39,00	0,96
Poids de naissance (kg)	3,40	3,38	0,59
DS du poids de naissance	-0,01	0,00	1,27
Taille de naissance (cm)	50,07	51,00	2,39
DS de la taille de naissance	-0,41	-0,10	1,14
Périmètre crânien de naissance (cm)	34,75	34,75	1,00
DS du périmètre crânien de naissance	0,02	-0,10	0,65
Données à l'inclusion			
Age	6 ans 4mois	5 ans 6mois	2 ans
Taille à T0 (cm)	117,53	116,00	13,28
DS de taille à T0	0,53	0,60	1,89
IMC à T0 (kg/m²)	15,48	15,40	1,10
DS de l'IMC à T0	-0,01	0,00	0,98
Périmètre crânien à T0 (cm)	52,40	52,05	1,70
DS du périmètre crânien à T0	0,53	0,50	1,06
Ecole (h/semaine)	16,61	18,00	7,86
Centre spécialisé (h/semaine)	4,58	3,00	5,41
Orthophonie (h/semaine)	0,63	0,50	0,52
Psychomotricité (h/semaine)	0,21	0,00	0,57
Psychologue (h/semaine)	0,20	0,00	0,69
Dose d'acide folinique (mg/kg/j)	0,50	0,07	0,50

Seulement 36 % des mères avaient reçu une supplémentation en acide folique en début de grossesse, seulement 10 % d'entre elles avaient bénéficié d'une supplémentation en pré-conceptionnel (21 % des mères ne souviennent plus si elles en ont reçu en périconceptionnel).

ii. Profil génétique de la population de l'étude

Le bilan génétique a été effectué chez 15 patients (74 %): la recherche d'anomalie du nombre de triplet CGG pour le locus *FMR1* a été effectuée chez 8 patients et est normale ; l'analyse chromosomique microréseau (ACM) a été réalisée chez 8 patients. Cette dernière analyse ne met pas en évidence de déséquilibre génomique susceptible d'expliquer la pathologie chez 7 patients sauf pour 1 où une délétion 5p15.2 est mise en évidence à l'état hétérozygote. Cette délétion de 33 kb est localisée dans la totalité de l'intron 3 du gène *CTNND2* pour lequel des variations ont été décrites dans l'autisme. Un patient a pu bénéficier d'un séquençage de l'exome qui n'a pas permis de mettre en évidence, dans l'état actuel des connaissances, une anomalie pouvant expliquer les troubles autistiques.

iii. Profil du métabolisme des folates et monocarbones

Les profils biologiques pour les folates sériques et érythrocytaires et les marqueurs du métabolisme des monocarbones sont détaillés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats biologiques des folates sériques et érythrocytaires et des marqueurs du métabolisme des monocarbones réalisé à l'inclusion.

	Moyenne	**Médiane**	**Ecart-type**
Folates sériques à T0 en nmol/L	20,0	13,8	12,58
Folates érythrocytaires à T0 en nmol/L	1087,0	759,5	362,8
Vitamine B12 à T0 en pmol/L	495,3	510	204
Homocystéine à T0 en µmol/L	5,5	5,7	1,7
Acide méthymalonique à T0en µmol/L	0,1	0,1	0,0
Méthionine à T0 en µmol/L	28,5	27,1	9,7
SAM à T0 en µmol/L	102,3	94,5	12,9
SAH à T0 en µmol/L	14,8	11,3	4,6

iv. Comparaison des groupes

9 patients ont été randomisés en simple aveugle dans le groupe acide folinique et 10 patients ont été randomisés dans le groupe placebo.

Les caractéristiques des deux groupes à l'étude sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques des patients randomisés au sein des groupes Folinoral et placebo.

	Groupe Folinoral	**Groupe placebo**	**P**
	n= 9	n= 10	
Age, ans mois, moyenne (DS)	6 ans 5 mois (2 ans 3 mois)	6 ans 5 mois (2 ans 4 mois)	0,69
Sexe, mâles N (%)	6 (67%)	9 (90%)	0,25
Paramètres de naissance			
Age gestationnel en SA, moyenne (DS)	39,4 (1)	39,4 (1)	0,79
Poids de naissance en DS, moyenne (DS)	-0,4 (1,2)	0,4 (1,3)	0,33
Taille de naissance en DS, moyenne (DS)	-0,7 (1,2)	-0,2 (1,1)	0,37
Périmètre crânien de naissance, moyenne (DS)	-0,2 (0,6)	0,3 (0,6)	0,11
Supplémentation maternelle en folates			
En début de grossesse, N (%)	3 (33%)	4 (40%)	0,57
En pré-conceptionnel et en début de grossesse, N (%)	1 (11%)	1 (10%)	0,74
Données auxologiques à l'admission			
DS_IMCT0	-0,4 (1)	0,3 (0,9)	
Prise en charge des troubles autistiques			
Ecole en heure par semaines, moyenne (SD)	15,8 (9,7)	17,4 (5,9)	0,93
Centre spécialisé en heure par semaines, moyenne (SD)	6,5 (6,1)	2,7 (4,1)	0,15
Orthophonie en heure par semaine, moyenne (SD)	0,5 (0,5)	0,8 (0,5)	0,16
Psychomotricité en heure par semaine, moyenne (SD)	0 (0)	0,5 (0,5)	0,08
Psychologue en heure par semaine, moyenne (SD)	0,3 (1)	0,1 (0,2)	0,7
Ergothérapeute en heure par semaine, moyenne (SD)	0,9 (2)	0,4 (0,5)	0,96
Consommation de produits laitiers			
Lait de vache en verre par jour, moyenne (SD)	2,2 (2,2)	0,5 (0,7)	0,05
Yaourt, nombre par jour, moyenne (SD)	0,9 (0,8)	1,5 (1,8)	0,3
Fromage en portion par jour (SD)	0,8 (0,7)	1,3 (1)	0,2
Autres produits laitiers en portion par jour, moyenne (SD)	0,2 (0,4)	0 (0,1)	0,4
Nombre de portions de produits laitiers par jour, moyenne (SD)	4,1 (2,2)	3 (2,05)	0,27
Traitement à l'inclusion			

Mélatonine N (%)	2 (22%)	1 (10%)	0,58
A visée digestive N (%)	1 (11%)	0	1
Vitamine D quotidienne N (%)	0	2 (20%)	1
Traitement de fond asthme N (%)	2 (22%)	1 (10%)	0,58
Traitement sédatif N (%)	1 (11%)	0	1
Anti-allergique N (%)	1 (11%)	0	1
Vitamine D N (%)	5 (55%)	4 (40%)	0,65
Autres vitamines N (%)	0	1 (10%)	1
Dosages biologiques à T0			
Folates sériques à T0 en nmol/L, moyenne (SD)	17,2(12.6)	17,1 (13,2)	0,98
Folates érythrocytaires à T0 en nmol/L, moyenne (SD)	706 (277,6)	853,9 (423,5)	0,8
Vitamine B12 à T0 en pmol/L, moyenne (SD)	523,1 (240,2)	432 (167,5)	0,95
Homocystéine à T0 en µmol/L, moyenne (SD)	5,3 (1,1)	6,5 (2)	0,2
Acide méthymalonique à T0 en µmol/L, moyenne (SD)	0,1 (0)	0,1 (0)	0,9
Méthionine à T0 en µmol/L, moyenne (SD)	29,5 (10,6)	26,6 (9,1)	0,9
SAM à T0 en µmol/L, moyenne (SD)	96,1 (14,8)	94,7 (11,7)	0,8
SAH à T0 en µmol/L, moyenne (SD)	9,7 (2,6)	13,8 (5,3)	0,8
Présence d'anticorps anti FRA à T0, N (%)	6 (66%)	5 (50%)	0,24
Anticorps anti FRA blocking à T0 en pmol/ml, moyenne (SD)	1 (2,2)	1,3 (2,1)	0,64
Anticorps anti FRA binding à T0 en pmol IgG/ml, moyenne (SD)	0,1 (0,1)	0,1 (0,2)	0,3
Evaluation à T0			
Score ADOS à T0, moyenne (SD)	16,8 (4,4)	16,3 (3,2)	0,48
Score SRS à T0, moyenne (SD)	92,2 (13,6)	93,4 (16)	0,54
Evaluation S12			
Score ADOS à S12, moyenne (SD)	14 (5)	15,9 (3,7)	0,48
Score SRS à S12, moyenne (SD)	83,9 (14,6)	85,5 (16,3)	0,77
Données biologiques à S12			
Anticorps anti FRA blocking à S12 en pmol/ml, moyenne (SD)	0 (0)	0 (0)	0,28
Anticorps anti FRA binding à S12 en pmol IgG/ml, moyenne (SD)	0,1 (0,2)	0 (0,1)	0,3
Nombres de gélules oubliés pendant le traitement (moyenne (SD)	3,8 (4,9)	5,3 (2,8)	0,35

Sur le plan biologique, à l'inclusion, 11 patients sur 19 (58 %) présentent des anticorps anti-FRA bloquants (*blocking* FRA) ou liants (*binding* FRA) : 7 patients (37 %) présentent des « *blocking* FRA » et 4 patients des « *binding* FRA » (21 %). Un patient présente les 2 types d'anticorps (5 %).

Au sein du groupe folinoral, à l'inclusion 6 patients sont positifs pour les FRA (66 %), 3/9 pour les *blocking* FRA (33 %), 3/9 pour les *binding* FRA (33 %). Au sein du groupe placebo, 5 patients sont positifs pour les FRA (50 %), 4 pour les *blocking* FRA (40 %) et 1 pour les *binding* FRA (10 %) (p=0,24).

Critère de jugement principal :

A l'issu des 12 semaines de traitement, l'évolution du score ADOS au sein de groupe folinoral est en moyenne de -2,8 points (écart type 2,2) contre -0,4 points (écart type 1.9) au sein du groupe placebo (p=0,02) (tableau n°6A).

Plus précisément pour le sous score « communication » de l'ADOS, l'évolution est de -1,22 points dans le groupe Folinoral versus -0,4 points dans le groupe placebo (p= 0,15). Et pour le sous score «interactions sociales réciproques», l'évolution est de -1,78 points dans le groupe Folinoral versus +0,2 points dans le groupe placebo (p= 0,019) (tableau n° 6B).

Tableau 6 : variation du score ADOS entre les groupe Folinoral et placebo à l'issu des 12 semaines de traitement

A. Variation du score ADOS après 12 semaines de traitement

	Variation ADOS S12		
	moyenne	médiane	écart-type
Groupe folinoral	-2,78	-2	1,92
Groupe placebo	-0,4	-1	2,17
	p=0,02		

B. Variation des sous-scores communication et interaction sociale réciproque après 12 semaines de traitement

	Variation ADOS communication			**Variation ADOS interaction sociale réciproque**		
	moyenne	écart type	médiane	moyenne	écart type	médiane
Groupe folinoral	-1,22	1,30	-2,00	-1,78	1,30	-1,00
Groupe placebo	-0,40	1,07	0,00	0,20	2,20	0,50
	p=0,15			p=0,019		

Critères de jugement secondaire

A l'issu des 12 semaines de traitement, l'évolution du score SRS est en moyenne de -8,3 points dans le groupe folinoral (écart-type 13,4) contre -7,9 points (écart-type 12,7) au sein du groupe placebo (p=0,94).

Au sein du groupe traité, la présence d'anticorps anti-FR *alpha* n'est pas associée à une amélioration significative des scores ADOS ou SRS (tableau 7).

Tableau 7 : Variation des scores ADOS et SRS après 12 semaines de traitement en fonction de la présence ou non d'anticorps anti-FRA dans le groupe traité par acide folinique.

	Variation ADOS S12			**Variation SRS S12**		
	Moyenne	Ecart type	Médiane	Moyenne	Ecart type	Médiane
Anticorps FRA +	-3	2,3	-3	-9,2	16,1	-5
Anticorps FRA -	-2,3	0,6	-2	-6,	8,1	-8
	p= 0,53			p=0,76		

Il n'y a pas de corrélation observée entre la quantité de produits laitiers consommés et la présence d'anticorps anti-FR *alpha* (pour les anticorps bloquants, r= 0,12 et p= 0,62 ; pour les anticorps liants r= -0,15 et p= 0,6).

Il n'y a pas de corrélation observée entre la variation du scores ADOS après 12 semaines de traitement et le taux d'anticorps anti-FR *alpha* avec respectivement pour les anticorps bloquants r= -0,11 p= 0,69 pour le score ADOS et r=-0,30 et p=0,22 pour les anticorps liants.

A l'issu des 12 semaines de traitement, 4 patients ont des anticorps anti-FR *alpha* positifs (soit 21 % du groupe de l'étude), aucun ne présentent des anticorps bloquants, les 4 possèdent des anticorps liants. Parmi ces 4 patients, 3 sont dans le groupe folinoral et 1 dans le groupe placebo.

Le taux moyen de folates sériques est de 123,1 nmol/L dans le groupe Folinoral versus 31.4 nmol/L dans le groupe placebo (p=0,04) à l'issue des 12 semaines de traitement.

Observance du traitement :

En moyenne, 3,3 gélules ont été oubliées au cours des 12 semaines de traitement (minimum 0, maximum 11 gélules) avec 3,8 gélules en moyennes dans le groupe Folinoral et 2,6 gélules dans le groupe placebo (p=0,52).

Tolérance du traitement :

Aucun effet secondaire grave n'a été rapporté au cours de l'étude. Il n'y a notamment pas eu de réaction allergique décrite pendant le traitement. Les parents d'un enfant ont souhaité quitté l'étude suite à une majoration des troubles du comportement après le début de l'étude.

Les effets secondaires rapportés sont détaillés dans les 2 groupes dans le tableau 8.

Tableau 8 : Détail des effets secondaires rapportés par les familles au cours des 12 semaines de traitement

	Groupe Folinoral	Groupe placebo	p
Troubles du comportement N (%)	2 (22 %)	2 (20 %)	1
Infection virale (ORL ou digestive) N (%)	6 (67 %)	7 (70 %)	1
Trouble du sommeil N (%)	1 (11 %)	0	1
Allergie N (%)	0	0	1
Troubles digestifs N (%)	0	1 (10 %)	1

d. Discussion

Bien que réalisée au sein d'un faible effectif d'enfants, cette étude conforte les données des premiers essais cliniques (Frye *et al*., 2018 ; Frye *et al*., 2013) en faveur d'une efficacité de l'acide folinique sur la réduction des troubles du spectre autistique. Elle montre en effet une amélioration significative du score ADOS dans le groupe traité par rapport au groupe non traité. Plus particulièrement, on note une amélioration significative de l'item « interactions sociales réciproques ». Il n'y a pas d'amélioration significative pour l'item « communication », mais une tendance est toutefois observée avec une amélioration plus importante dans le groupe traité. Ces résultats sont cohérents avec les résultats des études américaines (Frye *et al*., 2018; Frye *et al.*, 2013) à la différence que l'amélioration la plus significative concernait la communication verbale dans ces études. Notre résultat peut s'expliquer par le petit nombre d'enfant inclus mais aussi par l'utilisation d'une échelle d'évaluation différente (ADOS dans notre étude versus échelle d'évaluation spécifique de la communication CELF (*Clinical Evaluation of Language Fundamentals*)).

Pour le score SRS traduisant l'évaluation parentale, il n'y a pas d'amélioration significative retrouvée. Ceci peut s'expliquer par le faible effectif de notre groupe mais également par un certain degré d' « effet placebo » du traitement. En effet, les parents volontaires pour participer à l'étude ne savent pas dans quel groupe est leur enfant et peuvent avoir inconsciemment surestimé les progrès faits par l'enfant au cours de l'étude.

Il n'est pas observé d'association significative entre l'amélioration des troubles autistiques dans le groupe traité par acide folinique et la présence d'anticorps dirigés contre le FR *alpha*, toutefois on observe une tendance à une amélioration avec le score ADOS et aussi le score SRS plus importante si les anticorps sont positifs. L'absence de significativité peut être expliquée par le faible effectif (9 patients dans le groupe acide folinique). Le calcul de nombres de sujets nécessaires fait à *posteriori* objective un nombre minimum de 56 patients nécessaires dans le groupe acide folinique pour espérer obtenir un résultat significatif.

L'efficacité de l'acide folinique peut s'expliquer de plusieurs façons. La première est que le passage cérébral peut être médié par le RFC qui possède une affinité supérieure pour les folates réduits, notamment à hautes doses, et plus particulièrement si le FR *alpha* est bloqué

par les Anticorps anti-FR *alpha*. L'acide folinique ne nécessite pas l'action de la dihydrofolate réductase et peut directement entrer dans le cycle des folates.

Le deuxième résultat intéressant de cette étude est la fréquence des anticorps anti-FR *alpha* chez des enfants avec des troubles autistiques français qui s'élève à 58 % du groupe étudié. La fréquence de ces anticorps chez les enfants non autistes en France n'est pas connue mais elle a déjà été évaluée au sein d'autres populations : elle est estimée entre 4 et 7,2 % chez les femmes espagnoles (Berrocal-Zaragoza *et al.*, 2009), 9 à 13 % chez les femmes Irlandaises (Molloy *et al.*, 2009a) et entre 10 et 15 % au sein de la population américaine (données du Pr Quadros, non publiées). La fréquence importante des anticorps anti-FR *alpha* observée chez les enfants autistes dans notre étude est cohérente avec celles observées dans d'autres études (60 % (Frye *et al.*, 2013); 57 % (Frye *et al.*, 2016)). Ces données renforcent l'importance de pouvoir proposer ce dosage dans le cadre du bilan médical fait chez les enfants qui présentent des troubles du spectre autistique. Une des limites de ce résultat est la faible fréquence des anticorps et notamment des anticorps bloquants à la fin de l'étude. Les deux points de mesure de ces anticorps avaient été décidés en raison d'une fluctuation possible du taux d'anticorps ce que confirme notre étude. Le traitement par acide folinique n'est pas susceptible d'expliquer ce phénomène, qui observé dans les 2 groupes.

Dans notre étude, nous avons proposé un traitement par acide folinique à 5 mg 2 fois par jour à tout les enfants participant à l'étude soit une dose moyenne de 0,51 mg/kg/jour (écart type 0,09 mg/kg/jour), dose qui est inférieure à celle utilisée dans les études américaines à 2 mg/kg/jour (Frye *et al.*, 2018 ; Frye *et al.*, 2018) mais cohérente avec celle proposée dans le syndrome de carence en folates cérébral avec une efficacité décrite entre 0,5 et 1 mg/kg/jour (Ramaekers *et al.*, 2002). Un traitement par acide folinique dès 0,5 mg/kg/jour pourrait donc être efficace dans l'autisme. Cette dose apparait plus proche de celle actuellement utilisée chez l'enfant qui est de 5 mg tous les 2 à 4 jours en prévention de l'hématotoxicité de certains médicaments comme le Méthotrexate (données fiche Vidal).

Nous avons choisi 12 semaines pour la durée de traitement car c'est la durée qui est habituellement choisie pour évaluer spécifiquement l'efficacité d'un traitement chez les enfants autistes. Une durée plus longue de traitement poserait le problème de biais de confusion pouvant interférer dans l'évolution de la maladie autistique. Différentes études

réalisées dans le cadre d'évaluation thérapeutique dans l'autisme utilisent des périodes de traitement de 12 à 16 semaines, comme par exemple dans l'étude française évaluant l'efficacité du bumétanide (Lemonnier *et al.*, 2012) (12 semaines de traitement) ou dans les premières études visant à évaluer l'efficacité de l'acide folinique chez les enfants autistes (Frye *et al.*, 2016 ; Frye *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'action de l'acide folinique est rapide, en cas d'efficacité un effet est attendu dans les 12 semaines suivant le début.

L'un des principaux intérêts de ce traitement en comparaison aux autres traitements utilisés dans l'autisme réside dans la bonne tolérance et la rareté des effets secondaires. En effet, les médicaments antipsychotiques utilisés dans l'autisme tels que la rispéridone possèdent de lourds effets secondaires (hypotension, troubles digestifs, prise de poids, somnolence…). En comparaison avec les essais thérapeutiques récents dans l'autisme (cures d'antibiothérapie au long cours, diurétiques (Lemonnier *et al.*, 2012), ocytocine…) l'avantage de l'acide folinique réside dans sa bonne tolérance clinique, et l'absence d'effets secondaires. Sur la fiche Vidal du Folinoral® seul le risque allergique est rapporté mais décrit comme rare (en fait lié aux excipients utilisés : Fer jaune oxyde, Gélatine, Glycérol palmitostéarate, Lactose monohydrate, Titane dioxyde), l'allergie à l'acide folinique n'a jamais été décrite.

Dans notre groupe d'enfants traités par acide folinique, aucun effet secondaire grave n'a été rapporté pendant les 12 semaines de traitement. Deux familles ont rapporté une majoration de l'agressivité chez l'enfant au cours des premiers jours de traitement, qui s'est ensuite progressivement amendée (mais deux familles ont également rapporté ces mêmes troubles du comportement dans le groupe placebo). Il n'y a pas eu de réaction allergique, de troubles digestifs, ni de troubles du sommeil rapportés dans le groupe traité par acide folinique.

Le second avantage de ce traitement est son faible coût et sa facilité d'accès. En effet, actuellement la boîte de 28 comprimés de Folinoral® 5 mg est actuellement disponible en pharmacie de ville à un coût relativement faible (8,65 euros). Le traitement par acide folinique est commercialisé sous forme de gélules facilement ouvrable avec une poudre qui peut être mélangée avec de l'eau ou de l'alimentation sans être dénaturée, dans le cas ou les enfants ne sauraient pas avaler les gélules. Ce traitement est inodore et incolore ce qui

facilite également le traitement chez des enfants autistes souvent peu enclins à des modifications d'aspects ou de goût de leur alimentation.

Ces données de sécurité d'utilisation sont à nuancer par la durée de l'étude limitée à 12 semaines. Le maintien d'une efficacité de ce traitement sur les troubles autistiques en particulier sur le langage imposerait une utilisation au long cours. Des études complémentaires de tolérance sur le long terme de ce traitement (plusieurs mois ou années) sont donc nécessaires.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au traitement des enfants. La recherche de ces anticorps chez les femmes enceintes pourrait en cas de positivité faire poser la question de l'intérêt d'un traitement prénatal par acide folinique pour limiter le risque d'autisme chez l'enfant à venir, en particulier chez les femmes qui ont déjà un enfant autiste. Récemment, il a été montré que les parents et les frères et sœurs d'enfants autistes présentaient plus fréquemment des anticorps anti-FR *alpha* que la population générale (69 % chez les pères, 59 % chez les mères et 75 % chez les frères et sœurs) (Quadros *et al.*, 2018). La présence de ces anticorps chez les deux parents pourrait provoquer des altérations épigénétiques dès les stades précoces de développement. Le caractère familial de la présence des anticorps laisse supposer la possibilité d'une prédisposition génétique ou d'un lien avec l'environnement familial, mais souligne également que la présence d'anticorps n'explique pas à elle seule les troubles autistiques (puisque des membres de la famille ne présentant pas de trouble autistique ont des anticorps positifs). Ces données renforcent l'hypothèse d'une origine multifactorielle de la maladie autistique.

Notre étude possède quelques biais. Le premier est lié à l'absence de double aveugle, néanmoins l'évaluation des scores ADOS et SRS est effectuée à l'aveugle, c'est-à-dire que ni l'examinateur ni les parents ne connaissait le groupe de randomisation de l'enfant de façon à obtenir une évaluation la plus objective possible. Nous observons un fréquence nettement plus importante de garçons dans notre étude, ceci est cohérent avec les données de la littérature avec un sexe ratio plus fréquent chez les garçons (Elsabbagh *et al.*, 2012).

Cette étude a été effectuée sur un faible effectif d'enfants, pour pouvoir élargir les résultats et confirmer l'intérêt d'un tel traitement et généraliser l'accès au dosage des Anticorps anti-

FR alpha,une étude à plus grande échelle multicentrique sur une plus longue durée serait nécessaire.

III. Gènes candidats et anomalie de fermeture du tube neural

a. Bases de l'étude et objectifs

Le lien entre malformation du tube neural et le métabolisme des monocarbones en fait un thème de recherche de choix pour l'unité Inserm 1256 NGERE spécialisée particulièrement dans l'étude des vitamines B9 et B12 (donneurs de méthyls). L'unité a déjà coordonné plusieurs études portant sur des cohortes de patients atteints de *spina bifida* en France ou au cours de collaborations Européennes (Guéant-Rodriguez *et al*., 2003 ; Candito *et al*., 2008).

L'arrivée et la généralisation des techniques de séquençage haut débit (NGS, *Next Generation Sequencing*) offre de nouvelles possibilités d'études génétiques. À la différence du séquençage Sanger, le séquençage haut débit va permettre l'analyse de milliers gènes de façon simultanée et chez plusieurs patients à la fois en un temps relativement court. Cette technique est très intéressante dans les pathologies telles que les anomalies de fermetures du tube neural puisqu'il ne s'agit pas de maladies monogéniques mais de maladies multifactorielles avec de nombreuses voies métaboliques différentes potentiellement impliquées et donc la possibilité d'effets génétiques cumulatifs en cas d'anomalies génétiques sur des voies impliquées dans le développement embryonnaire.

De précédentes études ont identifié l'association d'un risque d'AFTN avec de nombreux variants fréquents du métabolisme des folates et des monocarbones tels que *MTHFR* c.665C>T… (van der Put *et al*., 1997 ; Botto et Yang, 2000). D'autres se sont intéressés aux gènes de voies métaboliques intervenant dans le développement embryonnaire précoce (comme PCP, WNT, SHH).

Grâce à des études cas/témoins, des études de cohorte ou familiales, des modèles animaux plus de 200 gènes candidats ont déjà été décrits comme associés au risque d'anomalie de fermeture du tube neural (Greene *et al*., 2009).

Néanmoins très peu d'études se sont intéressées à l'impact de variants rares détectés par NGS sur le risque d'anomalies de fermeture du tube neural, au potentiel effet cumulatif de ces variants et au lien que cela peut avoir avec la méthylation de gènes clés au cours du développement embryonnaire.

Une des hypothèses sous-tendant ce travail, serait qu'une dérégulation du métabolisme des monocarbones pourrait entraîner une diminution de la production de SAM, le donneur de méthyl universel, avec des conséquences sur la méthylation de l'ADN et ainsi une dérégulation épigénétique de gènes impliqués dans l'embryogénèse du tube neural.

L'objectif de cette étude est d'analyser par séquençage haut débit un large panel de gènes chez des patients vivants atteints de *spina bifida aperta* et de compléter l'étude par une analyse de méthylation pangénomique de façon à rechercher un lien entre la présence de variants rares et des anomalies de méthylation de gènes clés du développement embryonnaire.

b. Matériel et méthode

i. Population de l'étude

Des patients porteurs de *spina bifida aperta* (méningocèle et myéloméningocèle) ont été recrutés au sein de la consultation de neurochirurgie de l'hôpital d'enfants de Nancy entre 2007 et 2008. Le consentement parental oral et écrit a été obtenu des deux parents (ou titulaires de l'autorité parentale) après information orale et écrite. L'étude a obtenu l'avis favorable du comité de protection des personnes Est III (CPP) en 2007.

L'étude de réplication a été effectuée au sein d'une cohorte de 81 cas de patiens présentants des anomalies de fermeture du tube neural de type *spina bifida aperta* (14 cas français porteurs de myéloméningocèle et méningocèle, 40 cas italiens porteurs de myéloméningocèle) et 27 fœtus français porteurs de *spina bifida aperta* (méningocèle et myéloméningocèle) issus d'interruption thérapeutique de grossesse (ITG) dont l'ADN est conservé à l'unité Inserm avec un consentement pour l'utilisation de l'ADN à des fins de recherche signé et un avis favorable du comité protection des personnes.

ii. Profil biochimique

Les concentrations en vitamines B9 sériques et érythrocytaires sont déterminées dans le sérum/plasma obtenu après centrifugation de sang veineux prélevé sur tube (fiche n°5).

Les concentrations sériques/plasmatiques en homocystéine et acide méthylmalonique, SAM et SAH sont déterminées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS) (fiche n°6).

iii. Recherche de variants sur ADN génomique par séquençage haut débit

La recherche de variant de types SNVs et/ou petites insertions/délétions est réalisée sur l'ADN génomique extrait à partir de sang veineux total prélevé sur tube EDTA. Le kit d'extraction utilisé est le Nucléon Bacc3® (fiche n°9).

La concentration des échantillons d'ADN a été mesurée par dosage fluorométrique à l'aide du Picogreen® (Invitrogen). Ce dosage à l'aide d'un acide nucléique intercalant permet une

meilleure précision dans l'estimation de la concentration d'ADNg nécessaire au séquençage (Fiche n°10).

La préparation de la librairie est réalisée à l'aide du kit SureSelect Focused Exome Plus® (Agilent) (technique détaillée dans la fiche n° 11). Ce kit cible spécifiquement les régions exoniques de 6110 gènes (à l'exclusion des régions 5' et 3' UTR) ainsi que les jonctions introns-exons (correspondant à 16Mb, 23571 sondes). Les gènes sélectionnés sont ceux décrits comme associées à des maladies dans les bases de données génétiques telles que HGMD (*Human Gene Mutation Database*), OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man)* et ClinVar. Ce panel de gènes a été complété par 6 gènes dont l'implication dans la survenue de malformations du tube neural a été décrite chez l'homme ou la souris dans la littérature grâce à l'outil SureDesign® d'Agilent. Cet outil permet de dessiner les oligonucléotides des sondes de capture de façon à cibler les régions d'ADNg d'intérêt. Les gènes ajoutés sont: *DVL1* (chromosome 1), *FZD5* (chromosome 2), *DVL3* (chromosome 3), *SNAI2* (chromosome 8), *SHROOM2* (chromosome X), *TSPYL2* (chromosome X).

Le séquençage se fait de façon « pair-end » (sens-antisens) sur une longueur de « reads » de 100 nucléotides sur un séquenceur de type MiSeq (Illumina). L'analyse secondaire des résultats bruts d'appel de base (« *base calling* ») est effectuée par le programme MiSeq Reporter. Des scores de qualités sont générés par le programme *Real Time Analysis* (RTA v1.18.54). L'analyse secondaire de ces données brutes comporte plusieurs étapes : démultiplexage, alignement des séquences, identification des variants, annotation des variants et classification de ces variants. Celles-ci sont réalisées à l'aide d'un outil intégratif fourni par Agilent (SureCall® v.2.1.1.13).

iv. Validation des variants et étude de réplication

La présence des variants d'intérêts, identifiés par séquençage haut débit, a été systématiquement validée par séquençage classique de Sanger. Les études de réplications ont également été réalisées par cette méthode (Fiche n°12 et 13).

v. Analyse pangénomique de la méthylation de l'ADN

L'analyse pangénomique du niveau de méthylation de l'ADNg extrait du sang des patients à été réalisée sur la puce Human Methylation 450K (Illumina) après un traitement bisulfite de l'ADN (Fiches n°14 et 15). Cette puce permet de quantifier les niveaux de méthylation de plus de 480 000 sites CpG répartis sur l'ensemble du gènome.

vi. Analyse bioinformatique

1. Analyse des résultats de séquençage

a. Analyse pangénomique (phase #1)

La première phase de l'étude a consisté en une analyse sans *a priori* de tous les gènes présents dans le *SureSelect Focused Exome Plus* (Agilent®). L'ensemble des variants génétiques mis en évidence par le séquençage ont été importés pour chacun des 23 patients porteurs d'AFNT.

La stratégie de filtration et de priorisation des variants est la suivante:

- Etape #1: Importation de tous les variants génétiques retrouvés chez les 23 patients de l'étude;
- Etape #2: Exclusion des variants avec une fréquence allélique alternative (AAFc) supérieure à 5% dans les bases de données: *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), *Genome Aggregation Database* (gnomAD), ou *Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP 149)*;
- Etape #3: Exclusion des variants introniques ou synomymes;
- Etape #4: Exclusion des variants avec une faible prédiction de probabilité d'association avec le risque d'anomalie de fermeture du tube neural, sur la base d'un score Phevor1 inférieur à 0,02 (supérieur au 97ème percentile). Le score Phevor est calculé selon le *RefSeq Genes 105v2*, *NCBI gene source*, en utilisant les ontologies suivantes *Human Phenotype Ontology*, *Gene Ontology*, et *OMIM Phenotype Ontology*, et les termes suivants en lien avec le phénotype des AFTN: *"neural tube defect*", *"spina bifida"*, and *"abnormal neural tube morphology"*;
- Etape #5: Exclusion des variants avec une fréquence d'allèle mineur chez les cas AFTN (MAF_{NTD}) inférieure à 4% (soit au moins 2 allèles présents chez les 23 patients avec AFTN);

- Etape #6: Exclusion des variants avec une prédiction *"Benign"* ou "*Likely Benign"* selon la classification ACMG;
- Etape #7: Exclusion des variants avec un enrichissement inférieur à 3 (enrichissement = MAF_{NTD}/ AAFc).

b. Analyse par gènes d'intérêt (phase #2)

Deux panels de gènes *in silico* ont été définis, le premier contient les gènes sélectionnés du métabolisme des monocarbones (fiche n°16) et le second contient les gènes candidats impliqués dans l'embryogénèse du tube neural (fiche n°17).

Les *reads* de séquençage sont alignés sur GRCh37 hg19 avec le programme Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM), des dossiers SAM (*Sequence alignement / Map*) sont générés.

L'identification de SNVs (*Single nucleotide variant*) est réalisée avec le SNVPET SNV Caller. SureCall et Annovar sont utilisés pour l'annotation des SNVs. La qualification de l'effet du SNV a été prédite avec les outils de prédiction SIFT et PolyphenII : un score inférieur à 0,05 pour SIFT ou supérieure à 0,85 pour PolyphenII sont respectivement délétères ou dommageables.

Nous avons sélectionné des SNVs non synonymes des gènes inclus dans les 2 panels, ayant des prédictions délétères ou dommageables avec SIFT ou PolyphenII et avec une fréquence allélique dans la population générale inférieure à 5 % et avec une fréquence allélique dans la population AFTN étudiée au moins 1,5 fois supérieure (enrichissement). Les fréquences alléliques des SNVs identifiés dans l'étude sont comparées aux données de référence disponibles sur la base de données ExAC (http://exac.broadinstitute.org/) pour les Européens non finlandais.

Le test exact de Fischer est utilisé pour comparer les fréquences alléliques des SNV de la population d'AFTN à celle de la population de référence donnée dans ExAC.

c. Etude de réplication (phase #3)

L'étude de replication a concerné les variants identifiés dans la phase #1 et #2 qui présentaient une association significative avec le risque d'AFTN et une fréquence allélique alternative supérieure à 0,01 dans la population générale sur les données ExAC (uniquement pour les variants identifiés dans la phase #1).

Afin d'étudier la probabilité de réplication des variants génétiques retrouvés dans la phase #1, nous avons réalisé une étude de puissance. La puissance de l'étude a été évaluée en utilisant une fréquence d'allèle alternative hypothétique dans la population de référence (ExAC de 0,025, un risque ratio de 3 (fréquence d'allèle mineure chez les cas AFTN, MAF_{NTD} = 0,075)), un nombre de sujets de 40 et une erreur de type 1 associée au test exact de Fisher testée pour l'hypothèse nulle de 0,05 et une puissance de 0,80. Le nombre de sujets minimum pour atteindre une significativité est de 66 (132 allèles).

2. Analyse des résultats de méthylation

Les profils de méthylation ont été déterminés après un traitement bisulfite de l'ADN (fiche n°13), grâce à la puce Infinium Human Methylation 450Kp (Illumina®, Paris, France). Les champs ont été scannés sur Illumina iScan® system, et les données brutes de méthylation ont été extraites grâce au module Illumina's Genome Studio Methylation.

La méthylation est rapportée par une valeur β, allant de 0 (complètement non méthylé) à 1 (complètement méthylé). Une correction du bruit de fond et une normalisation des données à été effectuée grâce à la méthode SWAN (R Package Minfi) (Wu *et al*., 2014).

La comparaison du niveau de méthylation a été effectuée sur 3 sets de comparaison: Set #1: patient(s) avec le(s) variant(s) rare(s) identifié(s) du métabolisme des monocarbones, Set #2: patient(s) avec le(s) variant(s) rare(s) identifiés du métabolisme des folates, et Set #3: patient(s) avec le(s) variant(s) rare(s) identifiés du métabolisme de la vitamine B12. En pratique: Set #1: un patient avec les variants identifiés sur *BHMT-LRP2-MMAA* et *GLI3*; Set#2: un patient avec le variant identifié sur *FPGS* (rs41306702); Set #3: deux patients avec le variant identifié sur *TCN2* (rs35838082). Les données de méthylome issues des différents sets d'analyse sont comparées à des pseudo-contrôles qui sont les patients de la cohorte ne présentant les variants détaillés ci dessus. En raison d'un faible effectif et considérant

l'approche explorative, nous avons utilisé la transformation lissée de la *P-value* en convertissant les *P-value* nominales obtenues à partir du *t-test* en *P-value* lissées en utilisant un rayon de 3, comme indiqué précédemment (Guéant *et al*., 2018). Pour évaluer l'architecture du méthylome, nous avons réalisé une analyse des déséquilibres de liaison (*linkage disequilibrium*, LD) par paires sur tous les points CpG adjacents. *D' values* sont utilisées dans des *épi-LD* blocs. Toutes les analyses épi-LD blocs sont transformées après avoir transformé les valeurs β en variables catégorielles selon le projet ENCODE comme précédemment décrit (Guéant *et al.*, 2018) (ENCODE Project Consortium, 2012).

Les fréquences haplotypiques sont estimées en utilisant un algorithme *expectation/maximization (EM)* (Gabriel *et al*., 2002; Remington *et al.*, 2001). Les paramètres suivants sont utilisés pour la définition des blocs haplotypiques: limites de confiance: 0,7 à 0,98 ; seuil de critère de rejet (D'): 0,9 ; seuil de fréquence de l'épi-allèle mineure: 0,05 ; "*Max # Markers in a Block"*: 30 ; longueur maximale d'un bloc: 160 ; "*display threshold"*: 0,01. Les analyses statistiques sont effectuées avec SNP & Variation Suite (v8.8.1; Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA).

c. Résultats

i. Population de l'étude

23 patients atteints de *spina bifida aperta* recrutés dans l'étude initiale sont âgés entre 14 et 35 ans. Les caractéristiques cliniques et biologiques des 23 patients de l'étude initiale sont détaillées dans le tableau n°9.

Tableau 9 : Description clinique (a) et biologique (b) de la cohorte de l'étude initiale

a) Description des caractéristiques cliniques de la cohorte de patients de l'étude initiale

Clinique	**N**
Sexe	
- Féminin	13
- Masculin	10
Niveau vertébral de la malformation	
- Lombaire	12
- Sacré	3
- Non documenté	8
Valve de dérivation ventriculo-péritonéale	18
Autres signes cliniques	
- Epilepsie	2
- Malformation d'Arnold Chiari	3

N : nombres d'observations

b) Description des caractéristiques biologiques de la cohorte de patients de l'étude initiale

	Moyenne	**SD**	**Minimum**	**Maximum**
Homocystéine (µmol/L)	13,9	7,75	7	23,6
Folates plasmatiques (nmol/L)	16,42	8,47	6,2	40,4
Folates érythrocytaires (nmol/L)	601,39	143,91	410,7	886,1

SD : déviations standarts

81 patients (14 cas de *spina bifida* français, 40 cas de spina bifida italiens et 27 fœtus issus d'ITG) ont été inclus dans l'étude de réplication et sont âgés entre 5 et 21 ans. Parmi les 14 cas français, 1 patient présente un myéloméningocèle et 13 un méningocèle, 10 ont un défaut de fermeture lombaire (4 ne sont pas détaillés). Les 40 cas italiens présentent un myéloméningocèle. Dans le groupe de 27 fœtus issus d'ITG, tous présentent des *spina bifida aperta* (7 myeloméningocèles, 1 méningocèle, les autres ne sont pas détaillés).

ii. Identification de variants par NGS

Le design de l'étude avec les 3 phases est résumé dans la figure 9.

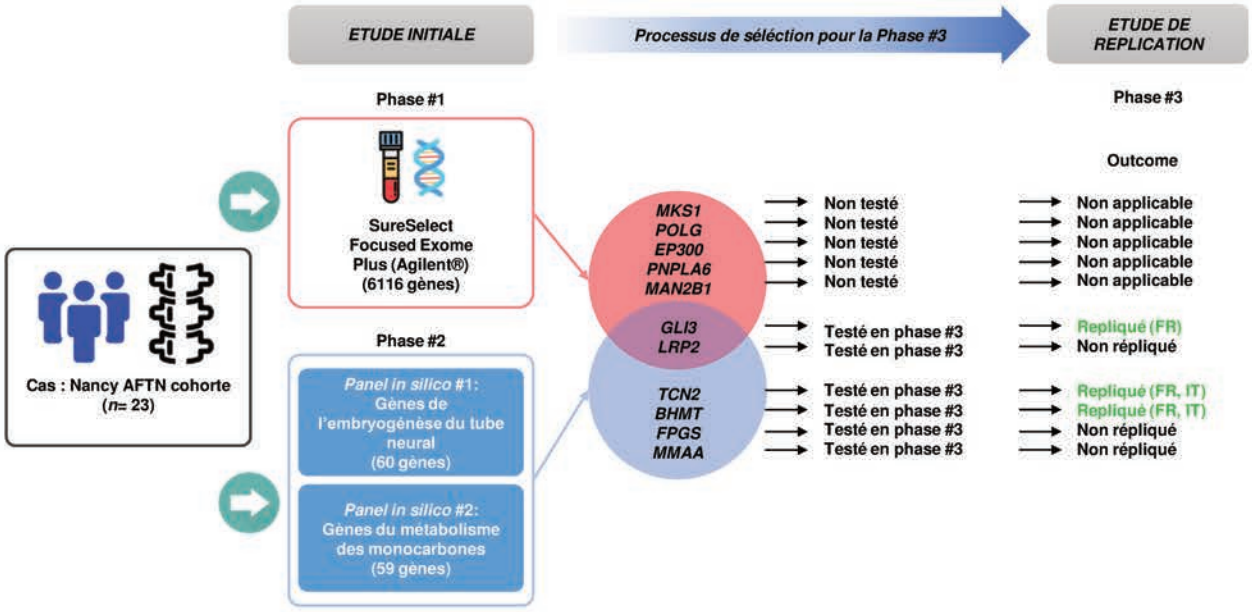


Figure 9: Détails des résultats obtenus pour les différentes phases de l'analyse des données de séquençage

1. Phase #1

L'analyse génétiques chez les 23 cas d'AFTN a mis en évidence 55798 variants génétiques. Parmi eux, 35233 présentent une fréquence allélique supérieure à 5% et ont été exclus. (Figure 10). Parmi les variants rares retenus, 15015 sont annotés comme introniques ou synomymes et donc exclus. Le score Phevor a été calculé pour les 5541 variants restants et nous a permis d'exclure les variants présentants une faible probabilité d'association avec le phenotype AFTN (score Phevor < 0,02; < 97ème percentile). Parmi les 178 variants restants, 42 ont été retenus avec une MAF_{NTD} > 4%. Après exclusion des variants avec une prédiction *"Benign"* ou *"Likely Benign"* selon les classifications ACMG et ceux présentant un enrichissement inférieur à 3, 3 variants de 2 gènes ont été retenus pour l'étude de réplication (Tableau 10). Ces gènes sont impliqués dans le neurodéveloppement et les ciliopathies en relation avec les AFTN (*GLI3*) et dans le métabolisme des monocarbones (*LRP2*).

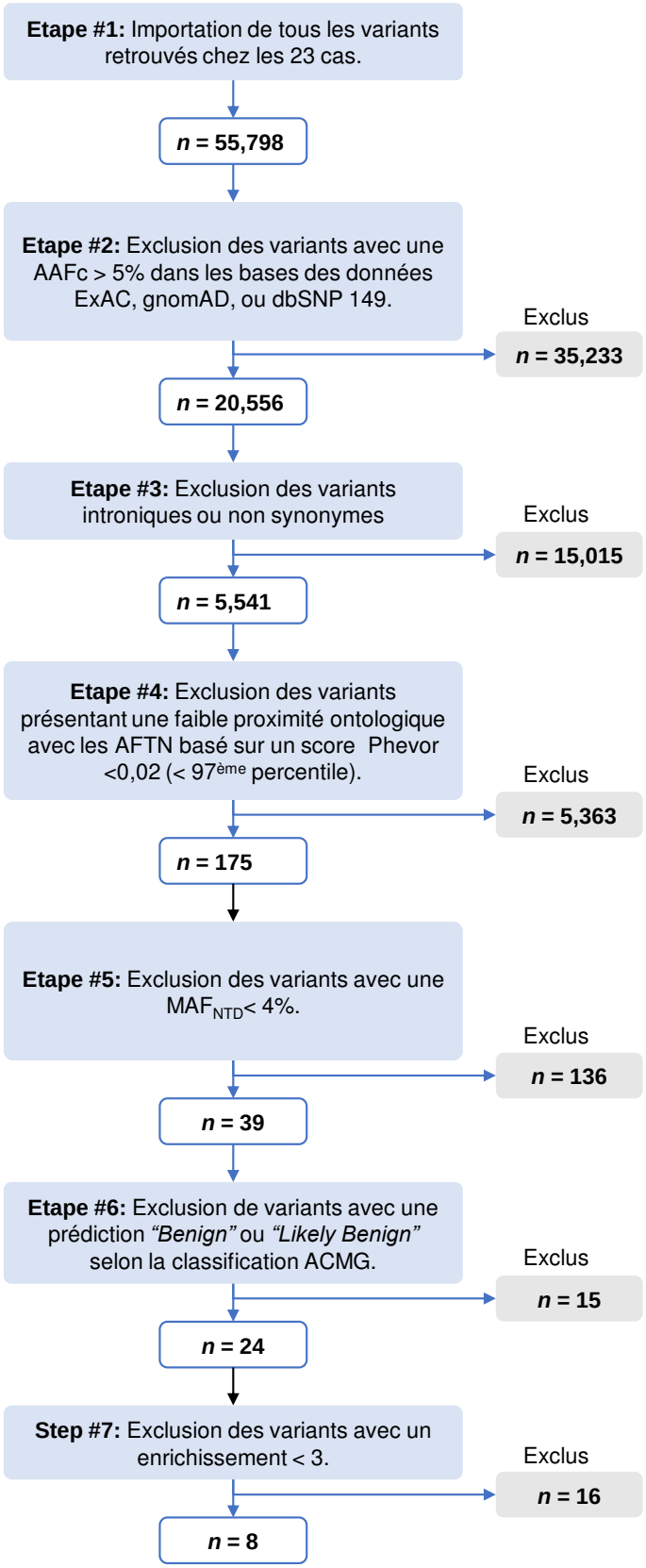


Figure 10: détails de la selection des variants pour la phase #1 de l'étude

Tableau 10 : Variants retrouvés dans l'analyse pangénomique chez les 23 cas d'AFTN (phase #1)

Variant génétique	[Ref/Alt]	Gène	HGVS nomenclature	Sequence Ontologie	MAF_{NTD}	AAFc	Enrichissement (MAF_{NTD} /AAFc)	Consideré pour la Phase #2
7:42004062-SNV	G/A	*GLI3*	NM_000168.5:c.4609C>T NP_000159.3:p.Arg1537Cys	missense	0.152	0.05	3.0	Yes
7:42003898-SNV	C/A	*GLI3*	NM_000168.5:c.*30G>T —	3_prime_UTR	0.152	0.05	3.0	Yes
2:170097707-SNV	T/G	*LRP2*	NM_004525.2:c.3836A>C NP_004516.2:p.Asp1279Ala	missense	0.065	0.022	3.0	Yes
17:56290344-SNV	T/C	*MKS1*	NM_017777.3:c.857A>G NP_060247.2:p.Asp286Gly	missense	0.043	0.0009	48.3	No
15:89873364-SNV	C/G	*POLG*	NM_002693.2:c.803G>C NP_002684.1:p.Gly268Ala	missense	0.043	0.004	10.9	No
22:41546158-SNV	C/A	*EP300*	NM_001429.3:c.2773C>A NP_001420.2:p.Pro925Thr	missense	0.043	0.006	7.2	No
19:7626428-SNV	G/A	*PNPLA6*	NM_001166111.1:c.4108G>A NP_001159583.1:p.Gly1370Ser	missense	0.043	0.008	5.4	No
19:12757392-SNV	C/T	*MAN2B1*	NM_000528.3:c.*42G>A —	3_prime_UTR	0.043	0.009	4.8	No

HGVS: *Human genome variation society*; **MAF_{NTD}**: fréquence d'allèle mineur chez les AFTN; **AAFc**: fréquence allélique alternative issues des bases de données pour la population de référence (ExAC, gnomAD, or dbSNP 149).

2. Phase #2

16 SNVs du panel de gènes du métabolisme des monocarbones et 5 SNV de gènes du panel de gènes impliqués durant l'embryogénèse du tube neural, avec une fréquence allélique dans la population générale inférieure à 5 % dans la base de données ExAC et une fréquence allélique dans le groupe AFTN au moins 1,5 fois supérieurs ont été identifiés (figure 11).

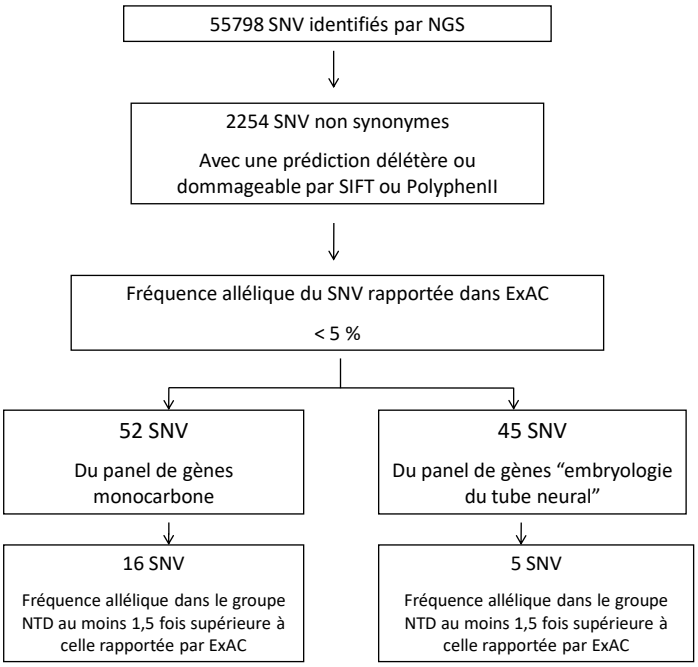


Figure 11 : Flow chart reportant la méthode de sélection des variants d'intérêt parmi les SNVs non synonymes avec une prédiction délétère ou dommageable par les logiciels de prédiction SIFT et PolyphenII identifiés par NGS

Parmi les SNVs du panel de gènes du métabolisme des monocarbones, cinq apparaissent significativement associés avec le risque d'anomalie de fermeture neural (tableau 11), en comparant la fréquence allélique de ces SNVs dans le groupe des 23 cas à la fréquence allélique de référence rapportée dans la base de données ExAC (données *European non-Finnish*) (p< 0,05). Parmi ces gènes, trois sont impliqués dans le métabolisme de la vitamine B12: *LRP2* (rs137983840, p=0,005), *MMAA* (rs148142853, p= 0,005) et *TCN2* (rs35838082, p=0,044); un dans le métabolisme cellulaire des folates *FPGS* (rs41306702, p=0,0012) et un

dans le métabolisme de la choline *BHMT* (rs763726268, p= 0,011). La fréquence allélique du SNV du gène *CBS* rs11768768 est à la limite du seuil de significativité (p=0,06).

Les fréquences alléliques alternatives des SNVs rs763726268, rs41306702, rs137983840, rs148142853, rs35838082 et rs117687681 sont respectivement enrichies par 208,7-, 11,9-, 209,7, 333,8-, 5,9- et 17,6- fois dans la population d'AFTN étudiée en comparaison aux données de référence.

Les fréquences alléliques des 5 SNVs de gènes de la liste "embryologie du tube neural" sont détaillées dans le tableau 12.

Parmi ces gènes, une association significative est mise en évidence avec le risque d'AFTN pour le SNV du gène *GLI3* (c.4609C>T, rs35364414), gène impliqué dans la voie Sonic hedgehog (Shh). Ce SNV est rapporté chez 6 patients, incluant un patient homozygote et 5 patients hétérozygotes. La fréquence allélique de ce SNV est à 15,2 % dans le groupe AFTN, significativement plus élevé que celle rapportée par ExAC dans la population générale (4,7 % chez les Européens non Finlandais ; p=0,012). Ce SNV est prédit délétère et dommageable par les logiciels de prédiction SIFT et PolyphenII. Il est en déséquilibre de liaison avec un autre SNV du même gène (c.4007G>A, rs35280470).

Un patient est porteur à l'état hétérozygote des 4 SNV rares identifiés dans notre étude (sur *BHMT*, *LRP2*, MMAA et *GLI3*).

Tableau 11: Variants issus du panel de gènes du métabolisme des monocarbones avec une fréquence allélique rapportée dans ExAC (European non Finnish) inférieure à 5 % et avec une fréquence allélique dans le groupe AFTN au moins 1,5 fois supérieure

Gene	Variant	HGVS, cDNA	HGVS, Prot	AFTN, AAC	MAF_{NTD}	AAFc	Enrichissement (AFTN vs. ExAC)	SIFT	Polyphen2	*P*-value
AHCY	rs41301825	c.367G>A	p.Gly123Arg	1	0,022	$6,24\times10^{-3}$	3,5	D	B	0,25
BHMT	rs763726268	c.1196delA	p.Lys400AsnfsTer15	1	0,043	$2,38\times10^{-4}$*	180,7	—	—	0,011
CBS	rs117687681	c.1105C>T	p.Arg369Cys	2	0,043	$2,44\times10^{-3}$	17,6	D	P	0,06
DNMT1	Not reported	c.3830G>A	p.Arg1277Gln	1	0,022	Not reported	—	D	D	—
FPGS	rs41306702	c.253C>T	p.Arg85Trp	2	0,043	$3,61\times10^{-3}$	11,9	D	P	0,0012
GIF	rs150884181	c.290T>C	p.Met97Thr	1	0,022	1.12×10^{-2}	2,0	D	P	0,4
LRP2	rs149469954	c.5209C>T	p.Leu1737Phe	1	0,022	$1,70\times10^{-3}$	13,0	D	B	0,07
LRP2	rs137983840	c.10030G>A	p.Ala3344Thr	1	0,022	$1,05\times10^{-4}$	209,7	D	P	0,005
MMAA	rs148142853	c.941G>A	p.Arg314His	1	0,022	$1,05\times10^{-4}$	209,7	D	B	0,005
MTFMT	rs199599204	c.16C>T	p.Arg6Trp	1	0,022	$1,32\times10^{-2}$	1,7	D	B	0,46
MTHFD1	Not reported	c.1745T>G	p.Met582Arg	2	0,043	Not reported	—	D	P	—
MTR	rs116836001	c.3079C>T	p.Arg1027Trp	1	0,022	$3,60\times10^{-3}$	6,1	D	B	0,15
MTR	rs12749581	c.155G>A	p.Arg52Gln	1	0,022	$5,90\times10^{-3}$	3,7	D	B	0,23
MTRR	rs41283145	c.1549A>G	p.Thr517Ala	1	0,022	$6,46\times10^{-3}$	3,4	D	P	0,26
PEMT	Not reported	c.311G>A	p.Arg104His	1	0,022	Not reported	—	D	P	—
TCN2	rs35838082	c.643C>T	p.Arg215Trp	2	0,043	$7,24\times10^{-3}$	5,9	D	D	0,044

AAC: Compte allélique alternatif; MAF_{NTD} : fréquence de l'allèle mineure dans le groupe AFTN ; AAFc: fréquence de l'allèle alternative issue de la base de données ExAC; D: Deleterious; T : Tolerated; B: Benign; P: Probably damaging; D: Damaging

* donnée à partir de gnomAD database

Tableau 12 : Variants issus du panel de gènes de l'embryologie du tube neural avec une fréquence allélique rapportée dans ExAC (European non-Finnish) inférieure à 5 % et avec une fréquence allélique dans le groupe AFTN au moins 1,5 fois supérieure

Gene	**Variant**	**HGVS, cDNA**	**HGVS, Prot**	**AFTN, AAC**	**MAF_{NTD}**	**AAFc**	**Enrichissement (AFTN vs. ExAC)**	**SIFT**	**Polyphen2**	***P*-value**
BRCA1	rs1800744	c.4598G>T	p.Ser1533Ile	1	0,022	$3{,}18\times10^{-3}$	6,9	D	B	0,14
GLI2	rs114814747	c.4558G>A	p.Asp1520Asn	1	0,022	$1{,}41\times10^{-2}$	1,6	D	D	1
GLI3	rs35364414	c.4609C>T	p.Arg1537Cys	7	0,152	$4{,}73\times10^{-2}$	3,2	D	D	0,012
HK2	rs146476722	c.2207C>T	p.Pro736Leu	1	0,022	$1{,}96\times10^{-3}$	11,2	D	D	0,09
XRCC1	Not reported	c.632A>G	p.Tyr211Cys	1	0,022	Not reported		T	P	

AAC: Compte allèlique alternatif; MAF_{NTD} : fréquence de l'allèle mineure dans le groupe AFTN AAFc: fréquence de l'allèle alternative issue de la base de données ExAC; D: Deleterious; T : Tolerated; B: Benign; P: Probably damaging; D: Damaging

iii. Etude de réplication

Les données de l'étude de réplication sont détaillées dans le tableau 13.

Nous avons répliqué l'association du variant *BHMT* (rs763726268) et de *TCN2* (rs35838082) avec le risque d'AFTN dans la population de réplication constituée de 81 cas. Le variant *BHMT* (rs763726268) a été identifié à une fréquence allélique de 1,2 % versus 0,02 % dans la base de données ExAC (p=0,0008). Un patient issu de la population de réplication est homozygote pour le SNV identifié sur *BHMT* rs763726268.

Concernant le SNV identifié sur le gène *GLI3* (rs35364414), il n'est pas répliqué chez les 81 cas à cause d'une très faible fréquence observée chez les cas italiens (2,5% versus 4.7% sur ExAC, p=0,59). Chez les français (cas et fœtus), il est identifié à une fréquence allélique de 12,2 % versus 4,7 % rapportée dans la base de données ExAC (p=0,005).

Au sein des cas vivants français, la fréquence allélique de ce variant *GLI3* est de 10,7 % (p =0,14), similaire à celle observée chez les fœtus de 11,1 %.

Tableau 13 : Résultats de l'étude de réplication et comparaison de la fréquence allélique dans la population de réplication (MAF_{NTDR}) avec les données de référence issues de la base de donnée ExAC (AFFc) (européens non finlandais)

	MAF_{NTDR}	**AAFc**	***P*-value**
***BHMT* rs763726268**	0,012	0,007	0,0008
***TCN2* rs35838082**	0,037	0,007	0,001
***MMAA* rs148142853**	0,000	0,000	1
***LRP2* rs137983840**	0,000	0,000	1
***FPGS* rs41306702**	0,000	0,004	1
***GLI3* rs35364414**	0,068	0,047	0,195

iv. Description des variants du métabolisme des monocarbones

De nombreux variants du métabolisme des monocarbones ont déjà été décrits dans la littérature comme associés au risque d'anomalie de fermeture du tube neural.

Le tableau 14 résume les données concernant ces variants fréquemment décrits dans littérature et identifiés dans le groupe AFTN par NGS.

Tableau 14 : Comparaison des fréquences alléliques identifiées dans le groupe AFTN à celle de la population de référence pour les SNV des gènes monocarbones fréquemment décrits dans la littérature des AFTN

Gène	cDNA	SNP	MAF_{NTD}	AAFc	*P*-value
MTHFR	c.1286A>C	rs1801131	0,15	0,32	0,016
MTHFR	c.665C>T	rs1801133	0,48	0,345	0,06
TCN2	c.776G>C	rs1801198	0,63	0,57	0,46
SLC19A1	c.80A>G	rs1051266	0,17	0,59	$6,72\ 10^{-9}$

MAF_{NTD} : fréquence de l'allèle mineure dans le groupe AFTN AAFc: fréquence de l'allèle alternative issue de la base de données ExAC

La mauvaise couverture en NGS des gènes *MTR* et *MTRR* n'a pas permis d'identifier les SNVs précédemment décrits dans la littérature. L'analyse de ces gènes a nécessité un séquençage par la méthode Sanger. Le SNV rs1805087 de *MTR* (c.2756A>G) est mis en évidence à une fréquence allélique de 15,2 % versus une fréquence allélique rapportée à 19 % sur ExAC (p = 0,57). Le SNV rs1801394 de *MTRR* (c.66A>G) est retrouvé au sein du groupe AFTN à une fréquence allélique de 41 % versus 55 % sur ExAC (p= 0,075).

v. Résultats de l'analyse de méthylation

L'analyse de méthylation a pu être réalisée chez 22 des 23 cas de l'étude initiale (12 de sexe féminin et 10 de sexe masculin). La qualité de l'ADN était insuffisante pour un patient.

Un patient (ID: S27) présente les différents variants (à l'état hétérozygote) avec des prédictions délétères identifiés sur les gènes suivants (*BHMT* rs763726268, *LRP2* rs137983840, *MMAA* rs148142853, et*GLI3* rs35364414). Parmi ces gènes, 3 sont impliqués dans le métabolisme des monocarbones (*BHMT*, *LRP2*, et *MMAA*). Afin d'évaluer l'effet potentiel des ces variants sur le profil de méthylation de ce patient (S27), nous avons comparé les données du méthylome avec sept patients du groupe AFTN qui ne sont pas porteurs de ces variants.

La puissance statistique est faible à cause du faible effectif, cependant nous avons mis en évidence un signal significatif dans les environs du gène *CFAP46* (alias *TTC40*) (figure 12). Ce locus comprend le gène *CFAP46* (*TTC40*) et deux « *long intergenic non-protein RNA »*: *LINC01166* (alias, *LOC101927590*), et *LINC01168* (alias, LOC399829) (Figure 12, A). Les sondes CpG associées aux *P*-values significatives sont cg01263624, cg00912926, cg23987897, et cg17693826 et sont hémiméthylées chez le cas S27 alors qu'elles sont complètement non méthylées chez les contrôles (figure 12, C). Les détails des comparaisons des valeurs β entre S27 et les contrôles sont détaillés dans la fiche n°18.

Une approche épi-haplotypique est réalisée pour estimer l'architecture de la méthylation de ce locus et nous avons mis en évidence un modèle de co-méthylation relativement structuré incluant *CFAP46, LINC01166*, et *LINC01168* (Figure 12, B).

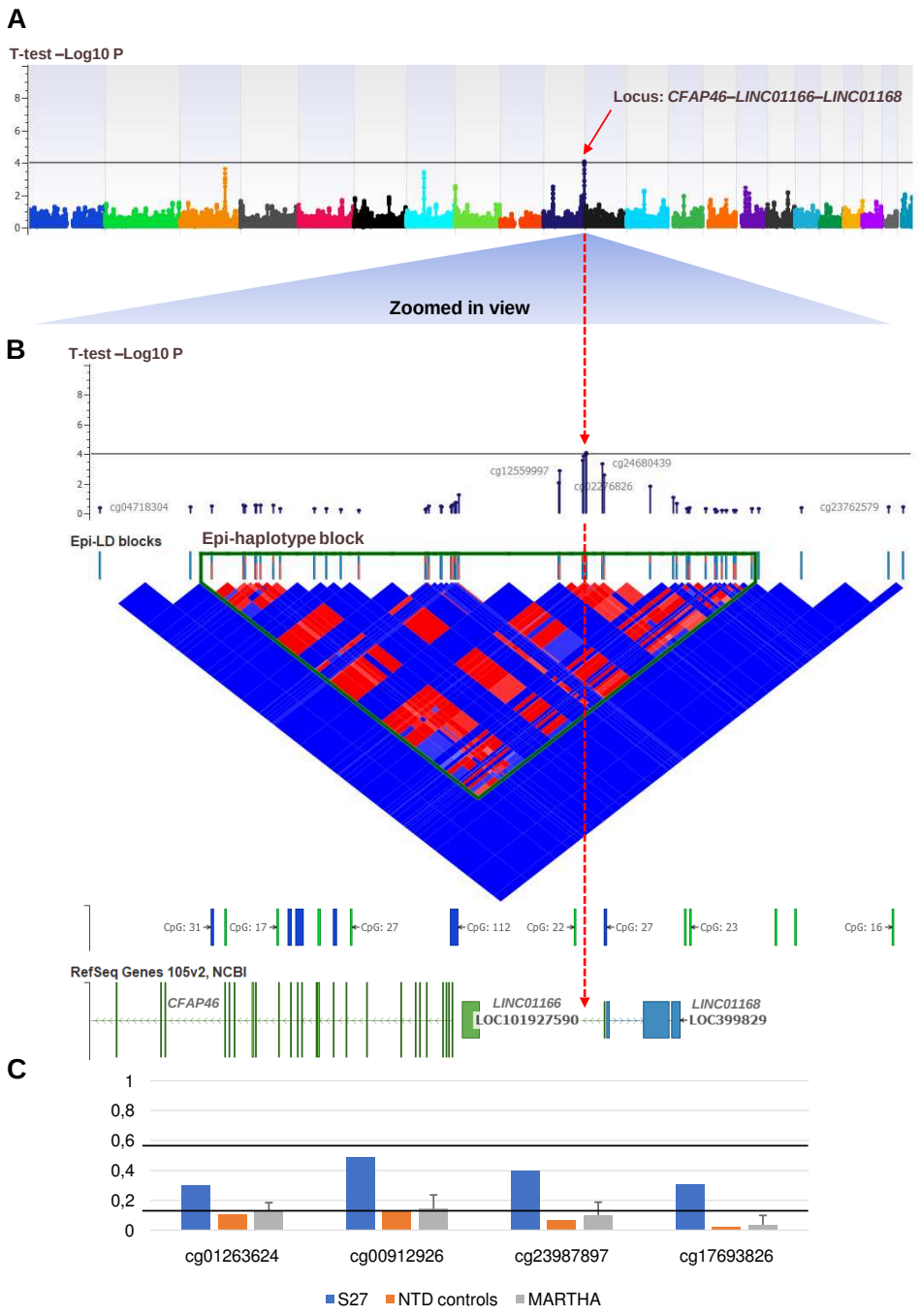


Figure 12 : Résultats de l'analyse bioinformatique des données de méthylation (comparaison entre S27 et sept patients pseudo-contrôles). Panel A : signal significatif pour le locus CFAP46 (alias TTC40) LINC01166 (alias, LOC101927590), et LINC01168 (alias, LOC399829). Panel B : approche épi-haplotypique mettant en évidence un motif de co-méthylation incluant CFAP46, LINC01166, et LINC01168. Panel C : Valeurs β des 4 sondes CpG associées à un signal significatif entre le patient S27 et les pseudo-contrôles. Le statut de méthylation de ces sondes à partir de cohorts adultes (cohorte MARTHA) est aussi rapportée (Dick et al., 2014).

d. Discussion

Cette étude par séquençage haut débit d'un large panel de gènes a permis d'identifier de nouveaux SNVs de gènes impliqués dans le métabolisme des folates et des monocarbones mais également dans la voie Sonic Hedgehog, deux voies métaboliques impliquées dans le développement du tube neural.

Un SNV très rare du métabolisme de la choline, sur le gène *BHMT* a été décrit dans notre étude. Ce gène code pour la bétaïne homocystéine S-méthyltransférase, une protéine qui catalyse la transformation d'homocystéine et bétaïne en méthionine. Cette protéine est exprimée au niveau hépatique et rénal, mais chez la souris une expression au cours du développement embryonnaire précoce (stade morula et blastocyte) est décrite (Lee *et al.*, 2012b). Ce SNV est rare et a été décrit pour la première fois grâce à notre étude. Il est maintenant référencé par le rs763726268 et possède une fréquence allélique très rare dans la population générale (donnée GnomAD : 0,02 % avec aucun patient homozygote rapporté sur plus de 120000 allèles testés). Au sein de l'étude de réplication ce SNV a été décrit à l'état homozygote pour un patient. Sur le plan biochimique, la délétion a pour conséquence la perte d'un codon stop, entraînant une élongation de la protéine. D'autres SNVs du gène *BHMT* ont déjà été rapportés dans la littérature comme associé au risque d'anomalie de fermeture du tube neural *(*rs3733890, Cao *et al*., 2018 ; Morin *et al.*, 2003). De plus, un taux maternel bas de choline a été précédemment évoqué comme un potentiel facteur de risque d'AFTN (Shaw *et al.*, 2009; Mills *et al.*, 2014).

Trois SNVs de gènes du métabolisme de la vitamine B12 non précédemment décrits, avec une fréquence allélique rare ont été mis en évidence au sein du groupe de patients avec anomalie de fermeture du tube neural (*LRP2*, *MMAA* et *TCN2).*

LRP2 (*low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein*, aussi appelée mégaline) est un récepteur endocytaire multifonctionnel exprimé tôt pendant le développement embryonnaire à la surface apicale du neuroépithélium (Willnow *et al.*, 2007). D'autres SNVs du gène *LRP2* ont déjà été décrits dans le cadre d'anomalie de fermeture du tube neural (K *et al.*, 2018). Le défaut d'expression de LRP2 au cours du développement du système nerveux central chez la souris entraîne un défaut de fermeture du tube neural dans sa partie rostrale (Kur *et al*., 2014). D'autre part, LRP2 est un récepteur nécessaire à la bonne

absorption des folates pendant la fermeture du tube neural en se liant à *FOLR1* (Kur *et al*., 2014).

Une fréquence allélique élevée du SNV rs35838082 de *TCN2* a été mise en évidence dans notre population d'AFTN, et répliquée au sein de la cohorte de réplication de 81 cas. D'autres SNVs de *TCN2* ont déjà été précédemment décrits comme associés au risque d'anomalie de fermeture du tube neural comme par exemple le SNV c.776C>G, et en particulier au sein de la population indienne ou la carence en vitamine B12 est fréquente *(Godbole et al.*, 2011). De la même façon, la carence en vitamine B12 et un taux augmenté d'homocystéine et d'acide méthylmalonique sont associés au risque d'AFTN (Senousy *et al.*, 2018).

Les variants déjà décrits dans la littérature sur les gènes des folates et monocarbones sont décrits dans notre cohorte avec des résultats parfois discordants par rapport à la littérature. Ceci peut être expliqué par le faible effectif du groupe. Le variant c.665C>T de *MTHFR* apparait toutefois plus fréquent dans le groupe d'AFTN avec un résultat proche de la significativité.

Nous avons identifié un variant du gène *GLI3* de la voie Sonic Hedgehog avec une fréquence allélique plus importante chez les patients avec AFTN (rs35364414). L'association observée est répliquée uniquement au sein de la population de réplication française avec une fréquence similaire chez les cas « vivants » et les fœtus. Ce résultat n'est toutefois pas répliqué chez les patients AFTN d'origine italienne.

GLI3 est un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH). Cette voie de signalisation est essentielle au cours du développement embryonnaire et particulièrement pendant la formation du tube neural. Le défaut de signalisation de cette voie, (en cas de mutation perte de fonction par exemple) est associé à des malformations cérébrales touchant la ligne médiane comme l'holoprosencéphalie. Inversement, l'hyperactivation de cette voie est évoquée comme possiblement associée à un risque d'anomalie de fermeture du tube neural. Ceci est illustré par les variants de *Ptch1* qui sont responsables d'une perte de l'inhibition de la voie et dans lesquels des AFTN sont observés (Murdoch et Copp, 2010).

Le SNV de *GLI3* identifié dans notre étude est situé sur la portion terminale du gène, région qui est riche en motifs phosphorylés par la Protéine Kinase A (PKA) pour obtenir la forme dite “tronquée” répressive de GLI3. Des variants de *Gli2* (autre facteur de transcription de SHH) au niveau des sites PKA chez la souris, ont été décrits avec des malformations de type AFTN (Pan *et al.*, 2009).

D’autres ont montré que le niveau de méthylation de *Gli2* était plus élevé en cas d’anomalie de fermeture du tube neural, avec une expression aberrante de *Gli2* et aussi une corrélation négative entre le taux de folates au niveau cérébral et le niveau de méthylation de *Gli2* (Lu *et al.*, 2016).

Des liens entre la voie SHH et le métabolisme des monocarbones ont été décrits chez des souris mutées *Gli3Xtj* (hétérozygotes) qui présentaient des taux d’homocystéine augmentés en comparaison avec des souris *wild-type* (Ernest *et al*., 2002). Dans notre groupe de patients avec AFTN, le taux d’homocystéine chez les patients porteurs du SNV *GLI3* c.4609C>T était de 13,5 µmol/L versus 10,5 µmol/L chez les patients qui ne sont pas porteurs du SNV (p=0,14).

Plus récemment, une autre équipe a montré que la méthylation de la protéine Setpine2, qui gouverne la ciliogénèse pendant la fermeture du tube neural, est folates-dépendante (Toriyama *et al*., 2017). La Septine2 est une protéine du cytosquelette impliquée dans la ciliogénèse et la voie SHH est abondante dans le cil primaire. Cette même équipe a montré que Septine2 est méthylée au niveau de deux résidus (lysine 183 et arginine 300) et que cette méthylation régule la fonction de cette protéine dans des modèles animaux. De plus, ils ont démontré que le niveau de méthylation de Septine2 régulait la voie SHH, en démontrant qu’une déplétion en folates entraînait une diminution du taux de Gli3R (forme protéique tronquée répressive) et donc une hyperactivation de la voie SHH.

Grâce à ces données de la littérature, nous pouvons émettre l’hypothèse que la présence du SNV identifié sur *GLI3* entraîne une diminution de la formation de GLI3R par altération de la phosphorylisation de GLI3 par les PKA (par analogie aux données de *GLI2*) et que cela pourrait avoir pour conséquence une hyperactivation de la voie SHH. Cet effet pourrait être amplifié par la présence de SNV sur des gènes clés du métabolisme des monocarbones avec une diminution des capacités de méthylation. L’ensemble de ces anomalies pourrait avoir

pour conséquence une hyperactivation de la voie SHH comme cela est évoqué dans les AFTN (Murdoch et Copp, 2010).

Ce mécanisme appelé épistasie, traduit le fait que l'effet « phénotypique » d'un SNV dépend du génotype d'un second SNV pour affecter un trait phénotypique (Mackay et Moore, 2014).

Chez un patient, nous avons observé plusieurs des SNVs rares identifiés dans l'étude (*LRP2*, *BHMT*, *MMAA*, *GLI3*). La présence de ces SNVs chez ce patient est associée à la présence à l'état hétérozygote des SNV c.1286A>C du gène *MTHFR*, c.2756A>G du gène *MTR*, suggérant un possible effet cumulatif. LRP2 est décrit comme un composant de SHH pendant le développement du tube neural, capable de se lier à la protéine SHH et contrôler l'internalisation et le transport cellulaire du complexe SHH/Patched 1 (Christ *et al*., 2012; McCarthy *et al.*, 2002).

De plus, ce même patient présente une différence significative de méthylation au niveau d'une zone incluant *CFAP46, LINC01166* (alias, *LOC101927590*), et *LINC01168* (alias, *LOC399829*) (avec une hémiméthylation versus une absence de méthylation dans le groupe contrôle). *LINC01166 et LINC01168* codent pour des« *long intergenic non-protein RNA »*, et sont localisés à proximité du gène *CFAP46* (*Cilia and Flagella Associated Protein 46*). Ce dernier code pour une protéine située au niveau de l'axonème du cil et qui est impliquée dans le mouvement ciliaire. Le cil primaire est abondant dans le tube neural et la plupart des composants de la voie SHH comme PTCH1 (Goodrich *et al*., 1997), Gli2 et Gli3 (Haycraft *et al*., 2005) sont localisés dans le cil primaire (Pal et Mukhopadhyay, 2015). Des variants de protéines impliquées dans la fonction ciliaire ont été décrits comme entraînant une dysfonction de SHH et des anomalies de fermeture du tube neural (Murdoch et Copp, 2010). Le gène *CFAP46* a été décrit dans la littérature comme un possible gène candidat dans les hétérotaxies (Liu *et al.*, 2018) et des AFTN ont déjà été observées dans des cas d'hétérotaxies (Loomba *et al.*, 2015). De plus, les données d'expression *Genotype-Tissue Expression Project* (GTEx) (gtexportal.org) des deux LINC décrits indiquent une expression au niveau cérébral et testiculaire quasi-exclusivement (fiche n°19).

Notre étude présente plusieurs biais. Le premier est l'absence d'analyse de données parentales (séquençage et statut maternel en folates et B12 pendant la grossesse). Le

second est l'absence de groupe témoin de patients sans anomalie de fermeture du tube neural apparié pour l'âge et le sexe pour l'analyse en NGS et l'analyse de méthylation.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement à des cas vivants d'AFTN, probablement les moins sévères. Une étude sur fœtus issus d'ITG avec des malformations plus sévères comme l'anencéphalie ou le craniorachischisis serait intéressante, notamment à la recherche des variants retrouvés dans notre étude.

L'analyse de méthylation a été effectuée sur de l'ADN extrait sur leucocytes circulants à partir d'un prélèvement sanguin, prélèvement fait pendant l'enfance ou chez l'adulte jeune. Toutefois, il est maintenant bien admis que la méthylation est un processus dynamique important pendant les premières étapes de développement embryonnaire et que les marques de méthylation peuvent être tissu dépendants. Idéalement, il aurait fallu pouvoir étudier le niveau de méthylation sur du tissu neurologique embryonnaire ou foetal de cas d'AFTN.

Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer les résultats de cette étude : analyse fonctionnelle, analyse de méthylation sur du tissu cérébral embryonnaire, modèles animaux…

En conclusion, cette étude a permis d'identifier de nouveaux variants rares associés au risque d'AFTN. Ces variants concernent des gènes interagissants entre eux, qui peuvent refléter l'influence d'une dérégulation du métabolisme des monocarbones et de la voie Sonic Hedgehog dans la pathogénèse des AFTN. Un nouveau gène candidat *GLI3* est décrit dans cette étude qui pourrait avoir un effet synergique avec certaines signatures de méthylation et entraîner une hyperactivation de la voie Sonic Hedgehog.

IV. Discussion générale et conclusion

L'autisme et les anomalies de fermeture du tube neural sont deux pathologies du neurodéveloppement dans lesquels les folates sont impliqués avec des mécanismes différents. Les AFTN sont prévenus par l'acide folique, tandis que dans l'autisme l'effet est spécifiquement observé pour les folates réduits (acide folinique).

L'effet des folates sur la prévention des AFTN est probablement lié aux gènes du développement embryonnaire impliqués dans la fermeture du tube neural, possiblement en lien avec la méthylation. Dans le cas de l'autisme, un rôle des folates sur l'expression de certains gènes du développement fonctionnel du cerveau, plus tard pendant la grossesse et après la naissance, peut être suspecté.

Récemment, une équipe a réalisé une analyse de méthylation pangénomique au sein d'un large groupe d'enfants autistes et de contrôles sur de l'ADN extrait sur sang à la naissance (Hannon *et al.*, 2018). Ces derniers n'ont pas montré de différence significative en ce qui concerne la méthylation globale chez les enfants autistes mais il existe une variation du niveau de méthylation au niveau de certains loci (particulièrement sur le chromosome 8).

Dans les deux cas, l'environnement agit comme un facteur de risque associé. En effet, la prise maternelle de certains médicaments tels que le valproate de sodium peut entraîner des anomalies de fermeture du tube neural, mais elle n'a pas d'effets connus sur le risque d'autisme. Dans l'autisme, la présence des anticorps anti-FR *alpha* apparait associée à la consommation de lait de vache des enfants (Ramaekers *et al*., 2008). Cependant la présence d'anticorps anti-FR *alpha* chez les mères d'enfants nés avec anomalies de fermeture du tube neural (Molloy *et al.*, 2009a) n'a pas montré d'association significative avec le risque de AFTN.

Néanmoins, il existe quelques similitudes dans les liens entre la vitamine B9 et ces deux pathologies. Les variants de gènes impliqués dans les métabolismes des folates tel que *MTHFR* c.665C>T apparaissent dans les deux cas comme associés au risque d'autisme et de AFTN (Schmidt *et al.*, 2011 ; Frosst *et al*., 1995).

Dans le cadre de l'autisme, l'intérêt d'une supplémentation des mères en acide folinique pourrait se discuter pendant la grossesse chez une femme ayant déjà un enfant avec des

troubles autistiques. L'intérêt de cette supplémentation serait à conditionner à la présence d'anticorps anti-FR *alpha* chez la mère et à l'évaluation de l'acide folinique dans la prévention des AFTN.

L'importance d'une supplémentation en folates en début de grossesse est désormais bien admise mais peu de données existent sur la sécurité et le potentiel impact d'une supplémentation inutile en folates en début de grossesse. La question pourrait être : pour prévenir un cas d'anomalie de fermeture du tube neural, combien de grossesses doivent être exposées à de l'acide folique et quelles pourraient être les conséquences d'une supplémentation inutile en début de grossesse? En effet, la généralisation de la supplémentation en folates en début de grossesse entraîne une augmentation du taux plasmatique d'acide folique non métabolisé. L'acide folique utilisé dans le cadre de la supplémentation que ce soit sous forme de médicaments comme utilisés en France ou dans la fortification des farines et céréales dans d'autres pays est une forme oxydée et possèdent un résidu glutamate conjugué, alors que la vitamine B9 «naturelle» présente dans l'alimentation est sous forme de polyglutamate réduit. Une revue de la littérature s'est intéressée au risque d'une supplémentation en acide folique « excessive » et pose la question des risques en terme cardiovasculaire, cancéreux, d'impact sur la méthylation (Smith *et al.*, 2008).

D'autres se sont intéressés à l'impact de cette supplémentation sur le neurodéveloppement de l'enfant et en particulier sur le développement de troubles autistiques. Bien que de nombreuses études aient montré une baisse du risque de TSA avec la supplémentation en acide folique, certaines études sur de plus petits effectifs ont conclu à un risque majoré de TSA avec cette supplémentation (Raghavan *et al.*, 2018).

Chez la souris, l'exposition maternelle à des doses importantes d'acide folique entraîne des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le développement neurologique et s'associe à des troubles du comportement (anxiété, hyperactivité…) chez les sourriceaux (Barua *et al.*, 2014). Plus récemment, l'exposition maternelle à l'acide folique, toujours chez la souris, a été associée à une altération du métabolisme de la choline, une baisse de l'activité de MTHFR, un retard de croissance et des troubles de la mémoire chez les sourriceaux (Bahous *et al.*, 2017).

Chez l'homme, la supplémentation en acide folinique maternelle a été associée à un risque accru de maladie asthmatique chez les enfants (Veeranki *et al*., 2015).

Ces données sont à nuancer avec d'autres données soulignant un bénéfice d'une supplémentation en acide folique maternelle sur la croissance fœtale en diminuant le risque de retard de croissance intra-utérin (Timmermans *et al.*, 2009).

Par analogie avec la supplémentation en vitamine B9, l'intérêt d'une supplémentation en vitamine B12 de la femme enceinte pourrait également se poser. La vitamine B12 est aussi une vitamine essentielle et importante dans le développement neurologique (Thomas *et al*., 2018; Black, 2008) et également possiblement impliquée dans ces deux pathologies du neurodéveloppement. Peu de données existent sur l'efficacité d'une supplémentation en vitamine B12 en prévention des AFTN. Sur le plan cognitif, une étude contrôlée randomisée a été réalisée en Inde, pays dans lequel la carence en vitamine B12 est fréquente, pour évaluer l'impact d'une telle supplémentation pendant la grossesse sur le développement cognitif de l'enfant. Celle-ci est en faveur d'une amélioration des scores de langage de l'enfant à l'âge de 30 mois (Thomas *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces données doit être nuancé par le fait qu'une anomalie du métabolisme des folates ne peut expliquer tous les cas d'anomalies de fermeture du tube neural ni tous les tableaux d'autisme infantile. De même, toutes les AFTN ne sont pas prévenues par un traitement périconceptionnel par acide folique et tous les enfants autistes ne sont pas améliorés par l'acide folinique. Ces maladies sont des maladies complexes, avec des origines multifactorielles possiblement différentes pour chaque cas.

V. Références

Afman, L.A., Lievers, K.J.A., van der Put, N.M.J., Trijbels, F.J.M., and Blom, H.J. (2002). Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *10*, 433–438.

Au, K.S., Ashley-Koch, A., and Northrup, H. (2010). Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. Dev. Disabil. Res. Rev. *16*, 6–15.

Bahous, R.H., Jadavji, N.M., Deng, L., Cosín-Tomás, M., Lu, J., Malysheva, O., Leung, K.-Y., Ho, M.-K., Pallàs, M., Kaliman, P., et al. (2017). High dietary folate in pregnant mice leads to pseudo-MTHFR deficiency and altered methyl metabolism, with embryonic growth delay and short-term memory impairment in offspring. Hum. Mol. Genet. *26*, 888–900.

Barker, D.J., and Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet Lond. Engl. *1*, 1077–1081.

Barua, S., Chadman, K.K., Kuizon, S., Buenaventura, D., Stapley, N.W., Ruocco, F., Begum, U., Guariglia, S.R., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2014). Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. PloS One *9*, e101674.

Becerra TA, Wilhelm M, Olsen J, Cockburn M, Ritz B (2013). Ambient air pollution and autism in Los Angeles county, California. Env. Heal. *121*, 380–386.

Berrocal-Zaragoza, M.I., Fernandez-Ballart, J.D., Murphy, M.M., Cavallé-Busquets, P., Sequeira, J.M., and Quadros, E.V. (2009). Association between blocking folate receptor autoantibodies and subfertility. Fertil. Steril. *91*, 1518–1521.

Black MM (2008). Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. Food Nutr Bull *29*, 126–131.

de Boo, H.A., and Harding, J.E. (2006). The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. *46*, 4–14.

Botto, L.D., and Yang, Q. (2000). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am. J. Epidemiol. *151*, 862–877.

Candito, M., Rivet, R., Herbeth, B., Boisson, C., Rudigoz, R.-C., Luton, D., Journel, H., Oury, J.-F., Roux, F., Saura, R., et al. (2008). Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. Am. J. Med. Genet. A. *146A*, 1128–1133.

Cao, L., Wang, Y., Zhang, R., Dong, L., Cui, H., Fang, Y., Zhao, L., Shi, O., and Cai, C. (2018). Association of neural tube defects with gene polymorphisms in one-carbon metabolic pathway. Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg. *34*, 277–284.

Chabrol B, Dulac O, Mancini J, Ponsot G, and Arthuis M (2010). Neurologie pédiatrique (Médecine Science Flammarion).

Chauhan, A., and Chauhan, V. (2006). Oxidative stress in autism. Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol. *13*, 171–181.

Christ, A., Christa, A., Kur, E., Lioubinski, O., Bachmann, S., Willnow, T.E., and Hammes, A. (2012). LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. Dev. Cell *22*, 268–278.

de Cock, M., Maas, Y.G.H., and van de Bor, M. (2012). Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 *101*, 811–818.

Constantino, J.N., Davis, S.A., Todd, R.D., Schindler, M.K., Gross, M.M., Brophy, S.L., Metzger, L.M., Shoushtari, C.S., Splinter, R., and Reich, W. (2003). Validation of a brief quantitative measure of autistic traits: comparison of the social responsiveness scale with the autism diagnostic interview-revised. J. Autism Dev. Disord. *33*, 427–433.

Copp Aj, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, and Shaw GM (2015). Spina bifida. - PubMed - NCBI. Nat. Rev. Dis. Primer *30*.

Crider, K.S., Bailey, L.B., and Berry, R.J. (2011). Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. Nutrients *3*, 370–384.

Curran, E.A., Dalman, C., Kearney, P.M., Kenny, L.C., Cryan, J.F., Dinan, T.G., and Khashan, A.S. (2015). Association Between Obstetric Mode of Delivery and Autism Spectrum Disorder: A Population-Based Sibling Design Study. JAMA Psychiatry *72*, 935–942.

Czeizel, A.E., and Dudás, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. N. Engl. J. Med. *327*, 1832–1835.

Czeizel, Dudás, Vereczkey, and Bánhidy (2013). Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. Nutrients *21*, 4760–4775.

De Marco, P., Calevo, M.G., Moroni, A., Merello, E., Raso, A., Finnell, R.H., Zhu, H., Andreussi, L., Cama, A., and Capra, V. (2003). Reduced folate carrier polymorphism (80A-->G) and neural tube defects. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *11*, 245–252.

De Marco, P., Merello, E., Cama, A., Kibar, Z., and Capra, V. (2011). Human neural tube defects: genetic causes and prevention. BioFactors Oxf. Engl. *37*, 261–268.

Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, Meduri E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, et al. (2014). DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. - PubMed - NCBI. Lancet Lond. Engl. *7*, 1990–1998.

Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, Montiel-Nava C, and Patel V, Paula CS, Wang C, Yasamy MT, Fombonne E. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. - PubMed - NCBI. Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res. *5*, 160–179.

ENCODE Project Consortium (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature *489*, 57–74.

Ernest, S., Christensen, B., Gilfix, B.M., Mamer, O.A., Hosack, A., Rodier, M., Colmenares, C., McGrath, J., Bale, A., Balling, R., et al. (2002). Genetic and molecular control of folate-homocysteine metabolism in mutant mice. Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc. *13*, 259–267.

Farmer, D.L., Thom, E.A., Brock, J.W., Burrows, P.K., Johnson, M.P., Howell, L.J., Farrell, J.A., Gupta, N., Adzick, N.S., and Management of Myelomeningocele Study Investigators (2018). The

Management of Myelomeningocele Study: full cohort 30-month pediatric outcomes. Am. J. Obstet. Gynecol. *218*, 256.e1-256.e13.

Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, J.M., Guéant-Rodriguez, R.M., Daval, J.L., and Guéant, J.L. (2007). Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. Hum. Reprod. Update *13*, 225–238.

Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., and van den Heuvel, L.P. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat. Genet. *10*, 111–113.

Frye, R.E., Delhey, L., Slattery, J., Tippett, M., Wynne, R., Rose, S., Kahler, S.G., Bennuri, S.C., Melnyk, S., Sequeira, J.M., et al. (2016). Blocking and Binding Folate Receptor Alpha Autoantibodies Identify Novel Autism Spectrum Disorder Subgroups. Front. Neurosci. *10*, 80.

Frye, R.E., Slattery, J., Delhey, L., Furgerson, B., Strickland, T., Tippett, M., Sailey, A., Wynne, R., Rose, S., Melnyk, S., et al. (2018). Folinic acid improves verbal communication in children with autism and language impairment: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Mol. Psychiatry *23*, 247–256.

Frye RE, Sequeira JM, Quadros EV, James SJ, and Rossignol DA (2013). Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder. Mol. Psychiatry *18*, 369–381.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. - PubMed - NCBI. Science 2225–2229.

Gelineau-van Waes, J., Maddox, J.R., Smith, L.M., van Waes, M., Wilberding, J., Eudy, J.D., Bauer, L.K., and Finnell, R.H. (2008). Microarray analysis of E9.5 reduced folate carrier (RFC1; Slc19a1) knockout embryos reveals altered expression of genes in the cubilin-megalin multiligand endocytic receptor complex. BMC Genomics *9*, 156.

Godbole, K., Gayathri, P., Ghule, S., Sasirekha, B.V., Kanitkar-Damle, A., Memane, N., Suresh, S., Sheth, J., Chandak, G.R., and Yajnik, C.S. (2011). Maternal one-carbon metabolism, MTHFR and TCN2 genotypes and neural tube defects in India. Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. *91*, 848–856.

Golding, J., Rai, D., Gregory, S., Ellis, G., Emond, A., Iles-Caven, Y., Hibbeln, J., and Taylor, C. (2018). Prenatal mercury exposure and features of autism: a prospective population study. Mol. Autism *9*, 30.

Goodrich, L.V., Milenković, L., Higgins, K.M., and Scott, M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. Science *277*, 1109–1113.

Gotham K, Pickles A, and Lord C (2009). Standardizing ADOS scores for a measure of severity in autism spectrum disorders. J Autism Dev Disord *39*, 693–705.

Goto, T., and Keller, R. (2002). The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in Xenopus. Dev. Biol. *247*, 165–181.

Grant, W.B., and Soles, C.M. (2009). Epidemiologic evidence supporting the role of maternal vitamin D deficiency as a risk factor for the development of infantile autism. Dermatoendocrinol. *1*, 223–228.

Green, R., Allen, L.H., Bjørke-Monsen, A.-L., Brito, A., Guéant, J.-L., Miller, J.W., Molloy, A.M., Nexo, E., Stabler, S., Toh, B.-H., et al. (2017). Vitamin B12 deficiency. Nat. Rev. Dis. Primer *3*, 17040.

Greene, N.D., Gerrelli, D., Van Straaten, H.W., and Copp, A.J. (1998). Abnormalities of floor plate, notochord and somite differentiation in the loop-tail (Lp) mouse: a model of severe neural tube defects. Mech. Dev. *73*, 59–72.

Greene, N.D.E., Stanier, P., and Copp, A.J. (2009). Genetics of human neural tube defects. Hum. Mol. Genet. *18*, R113-129.

Greene NDE, and Copp AJ (1997). Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. Nat. Med *3*, 60–66.

Greene NDE, Leung KY, Gay V, Burren K, Mills K, Chitty LS, and Copp AJ (2016). Inositol for the prevention of neural tube defects: a pilot randomised controlled trial. Br J Nutr *28*, 974–983.

Grimaldi, R., Gibson, G.R., Vulevic, J., Giallourou, N., Castro-Mejía, J.L., Hansen, L.H., Leigh Gibson, E., Nielsen, D.S., and Costabile, A. (2018). A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). Microbiome *6*, 133.

Guéant, J.-L., Chéry, C., Oussalah, A., Nadaf, J., Coelho, D., Josse, T., Flayac, J., Robert, A., Koscinski, I., Gastin, I., et al. (2018). APRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. Nat. Commun. *9*, 67.

Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, and Daval JL (2013). Folate and fetal programming: a play in epigenomics? - PubMed - NCBI. Trends Endocrinol Metabl *24*, 279–289.

Guéant-Rodriguez, R.M., Rendeli, C., Namour, B., Venuti, L., Romano, A., Anello, G., Bosco, P., Debard, R., Gérard, P., Viola, M., et al. (2003). Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. Neurosci. Lett. *344*, 189–192.

Guéant-Rodriguez, R.M., Chery, C., Caillierez-Fofou, B.-M., Voirin, J., Foliguet, B., Josse, T., Tramoy, D., Feillet, F., and Guéant, J.-L. (2018). Association of combined GIF290T>C heterozygous mutation/FUT2 secretor variant with neural tube defects. Clin. Genet. *93*, 191–193.

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., et al. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. Arch. Gen. Psychiatry *68*, 1095–1102.

Hamad, A.F., Alessi-Severini, S., Mahmud, S.M., Brownell, M., and Kuo, I.F. (2018). Early childhood antibiotics use and autism spectrum disorders: a population-based cohort study. Int. J. Epidemiol.

Hannon, E., Schendel, D., Ladd-Acosta, C., Grove, J., iPSYCH-Broad ASD Group, Hansen, C.S., Andrews, S.V., Hougaard, D.M., Bresnahan, M., Mors, O., et al. (2018). Elevated polygenic burden for autism is associated with differential DNA methylation at birth. Genome Med. *10*, 19.

Haycraft, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., and Yoder, B.K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. PLoS Genet. *1*, e53.

Jafari, T., Rostampour, N., Fallah, A.A., and Hesami, A. (2017). The association between mercury levels and autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS *44*, 289–297.

Jain, A., Marshall, J., Buikema, A., Bancroft, T., Kelly, J.P., and Newschaffer, C.J. (2015). Autism occurrence by MMR vaccine status among US children with older siblings with and without autism. JAMA *313*, 1534–1540.

James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, and Neubrander JA (2004). Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. Am J Clin Nutr *80*, 1611–1617.

Jia F, and Wang B (2015). Core symptoms of autism improved after vitamin D supplementation. - PubMed - NCBI. Pediatrics *135*, 196–198.

Juriloff, D.M., and Harris, M.J. (2012). A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects. Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. *94*, 824–840.

K, R.P., T, S., B, S., T, M.K., and A, J. (2018). LRP2 gene variants and their haplotypes strongly influence the risk of developing neural tube defects in the fetus: a family-triad study from South India. Metab. Brain Dis. *33*, 1343–1352.

Kalkbrenner, A.E., Schmidt, R.J., and Penlesky, A.C. (2014). Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care *44*, 277–318.

Khan, A., Harney, J.W., Zavacki, A.M., and Sajdel-Sulkowska, E.M. (2014). Disrupted brain thyroid hormone homeostasis and altered thyroid hormone-dependent brain gene expression in autism spectrum disorders. J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc. *65*, 257–272.

Kronn, D., and Goldman, I.D. (1993). Hereditary Folate Malabsorption. In GeneReviews®, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Kur, E., Mecklenburg, N., Cabrera, R.M., Willnow, T.E., and Hammes, A. (2014). LRP2 mediates folate uptake in the developing neural tube. J. Cell Sci. *127*, 2261–2268.

Ladstätter, S., and Tachibana, K. (2018). Genomic insights into chromatin reprogramming to totipotency in embryos. J. Cell Biol.

Lai, M.-C., Lombardo, M.V., and Baron-Cohen, S. (2014). Autism. Lancet Lond. Engl. *383*, 896–910.

Lange, K.W., Hauser, J., and Reissmann, A. (2015). Gluten-free and casein-free diets in the therapy of autism. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care *18*, 572–575.

Larsen WJ, Schoenwolf GC, Brauer PR, Francis-West, and Bleyl SB Embryologie humaine de Larsen.

Lau, N.M., Green, P.H.R., Taylor, A.K., Hellberg, D., Ajamian, M., Tan, C.Z., Kosofsky, B.E., Higgins, J.J., Rajadhyaksha, A.M., and Alaedini, A. (2013). Markers of Celiac Disease and Gluten Sensitivity in Children with Autism. PloS One *8*, e66155.

Leck I (1974). Causation of neural tube defects: clues from epidemiology. Br Med Bull 158–163.

Lee, B.K., Gardner, R.M., Dal, H., Svensson, A., Galanti, M.R., Rai, D., Dalman, C., and Magnusson, C. (2012a). Brief report: maternal smoking during pregnancy and autism spectrum disorders. J. Autism Dev. Disord. *42*, 2000–2005.

Lee, M.B., Kooistra, M., Zhang, B., Slow, S., Fortier, A.L., Garrow, T.A., Lever, M., Trasler, J.M., and Baltz, J.M. (2012b). Betaine homocysteine methyltransferase is active in the mouse blastocyst and promotes inner cell mass development. J. Biol. Chem. *287*, 33094–33103.

Lemonnier E, Degrez C, Phelep M, Tyzio R, Josse F, Grandgeorge M, Hadjikhani N, and Ben-Ari Y (2012). A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. Transl Psychiatry *11*.

Liu, C., Cao, R., Xu, Y., Li, T., Li, F., Chen, S., Xu, R., and Sun, K. (2018). Rare copy number variants analysis identifies novel candidate genes in heterotaxy syndrome patients with congenital heart defects. Genome Med. *10*, 40.

Loomba, R., Shah, P.H., and Anderson, R.H. (2015). Fetal Magnetic Resonance Imaging of Malformations Associated with Heterotaxy. Cureus *7*, e269.

Lord, C., Rutter, M., Goode, S., Heemsbergen, J., Jordan, H., Mawhood, L., and Schopler, E. (1989). Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. J. Autism Dev. Disord. *19*, 185–212.

Lu, X.-L., Wang, L., Chang, S.-Y., Shangguan, S.-F., Wang, Z., Wu, L.-H., Zou, J.-Z., Xiao, P., Li, R., Bao, Y.-H., et al. (2016). Sonic Hedgehog Signaling Affected by Promoter Hypermethylation Induces Aberrant Gli2 Expression in Spina Bifida. Mol. Neurobiol. *53*, 5413–5424.

Ludvigsson, J.F., Reichenberg, A., Hultman, C.M., and Murray, J.A. (2013). A nationwide study of the association between celiac disease and the risk of autistic spectrum disorders. JAMA Psychiatry *70*, 1224–1230.

Mackay, T.F., and Moore, J.H. (2014). Why epistasis is important for tackling complex human disease genetics. Genome Med. *6*, 124.

McCarthy, R.A., Barth, J.L., Chintalapudi, M.R., Knaak, C., and Argraves, W.S. (2002). Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. J. Biol. Chem. *277*, 25660–25667.

Mills, J.L., Fan, R., Brody, L.C., Liu, A., Ueland, P.M., Wang, Y., Kirke, P.N., Shane, B., and Molloy, A.M. (2014). Maternal choline concentrations during pregnancy and choline-related genetic variants as risk factors for neural tube defects. Am. J. Clin. Nutr. *100*, 1069–1074.

Molloy, A.M., Quadros, E.V., Sequeira, J.M., Troendle, J.F., Scott, J.M., Kirke, P.N., and Mills, J.L. (2009a). Lack of association between folate-receptor autoantibodies and neural-tube defects. N. Engl. J. Med. *361*, 152–160.

Molloy, A.M., Brody, L.C., Mills, J.L., Scott, J.M., and Kirke, P.N. (2009b). The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. *85*, 285–294.

Morin, I., Platt, R., Weisberg, I., Sabbaghian, N., Wu, Q., Garrow, T.A., and Rozen, R. (2003). Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. Am. J. Med. Genet. A. *119A*, 172–176.

Muhle, R., Trentacoste, S.V., and Rapin, I. (2004). The genetics of autism. Pediatrics *113*, e472-486.

Murdoch, J.N., and Copp, A.J. (2010). The relationship between sonic Hedgehog signaling, cilia, and neural tube defects. Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol. *88*, 633–652.

Nikolopoulou, E., Galea, G.L., Rolo, A., Greene, N.D.E., and Copp, A.J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. Dev. Camb. Engl. *144*, 552–566.

Nishimura, T., Honda, H., and Takeichi, M. (2012). Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. Cell *149*, 1084–1097.

Oken, E., and Bellinger, D.C. (2008). Fish consumption, methylmercury and child neurodevelopment. Curr. Opin. Pediatr. *20*, 178–183.

Pal, K., and Mukhopadhyay, S. (2015). Primary cilium and sonic hedgehog signaling during neural tube patterning: role of GPCRs and second messengers. Dev. Neurobiol. *75*, 337–348.

Pan et al. (2009). Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. - PubMed - NCBI. Dev. Biol. *1*, 177–189.

van der Put, N.M., Eskes, T.K., and Blom, H.J. (1997). Is the common 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. QJM Mon. J. Assoc. Physicians *90*, 111–115.

van der Put, N.M., Gabreëls, F., Stevens, E.M., Smeitink, J.A., Trijbels, F.J., Eskes, T.K., van den Heuvel, L.P., and Blom, H.J. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? Am. J. Hum. Genet. *62*, 1044–1051.

Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. Cell *127*, 917–928.

Quadros, E.V., Sequeira, J.M., Brown, W.T., Mevs, C., Marchi, E., Flory, M., Jenkins, E.C., Velinov, M.T., and Cohen, I.L. (2018). Folate receptor autoantibodies are prevalent in children diagnosed with autism spectrum disorder, their normal siblings and parents. Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res. *11*, 707–712.

Raghavan, R., Riley, A.W., Volk, H., Caruso, D., Hironaka, L., Sices, L., Hong, X., Wang, G., Ji, Y., Brucato, M., et al. (2018). Maternal Multivitamin Intake, Plasma Folate and Vitamin B12 Levels and Autism Spectrum Disorder Risk in Offspring. Paediatr. Perinat. Epidemiol. *32*, 100–111.

Ramaekers, V.T., and Blau, N. (2004). Cerebral folate deficiency. Dev. Med. Child Neurol. *46*, 843–851.

Ramaekers, V.T., Häusler, M., Opladen, T., Heimann, G., and Blau, N. (2002). Psychomotor retardation, spastic paraplegia, cerebellar ataxia and dyskinesia associated with low 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid: a novel neurometabolic condition responding to folinic acid substitution. Neuropediatrics *33*, 301–308.

Ramaekers, V.T., Blau, N., Sequeira, J.M., Nassogne, M.-C., and Quadros, E.V. (2007). Folate receptor autoimmunity and cerebral folate deficiency in low-functioning autism with neurological deficits. Neuropediatrics *38*, 276–281.

Ramaekers, V.T., Sequeira, J.M., Blau, N., and Quadros, E.V. (2008). A milk-free diet downregulates folate receptor autoimmunity in cerebral folate deficiency syndrome. Dev. Med. Child Neurol. *50*, 346–352.

Remington, D.L., Thornsberry, J.M., Matsuoka, Y., Wilson, L.M., Whitt, S.R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M.M., and Buckler, E.S. (2001). Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 11479–11484.

Richardson, A.J., and Ross, M.A. (2000). Fatty acid metabolism in neurodevelopmental disorder: a new perspective on associations between attention-deficit/hyperactivity disorder, dyslexia, dyspraxia and the autistic spectrum. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *63*, 1–9.

Román, G.C. (2007). Autism: transient in utero hypothyroxinemia related to maternal flavonoid ingestion during pregnancy and to other environmental antithyroid agents. J. Neurol. Sci. *262*, 15–26.

Rosenthal, J., Casas, J., Taren, D., Alverson, C.J., Flores, A., and Frias, J. (2014). Neural tube defects in Latin America and the impact of fortification: a literature review. Public Health Nutr. *17*, 537–550.

Schmidt, R.J., Hansen, R.L., Hartiala, J., Allayee, H., Schmidt, L.C., Tancredi, D.J., Tassone, F., and Hertz-Picciotto, I. (2011). Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. Epidemiol. Camb. Mass *22*, 476–485.

Schmidt, R.J., Tancredi, D.J., Ozonoff, S., Hansen, R.L., Hartiala, J., Allayee, H., Schmidt, L.C., Tassone, F., and Hertz-Picciotto, I. (2012). Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. Am. J. Clin. Nutr. *96*, 80–89.

Schuchardt, J.P., Huss, M., Stauss-Grabo, M., and Hahn, A. (2010). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. Eur. J. Pediatr. *169*, 149–164.

Senousy, S.M., Farag, M.K., Gouda, A.S., El Noury, M.A., Dabbous, O.A., and Gaber, K.R. (2018). Association between biomarkers of vitamin B12 status and the risk of neural tube defects. J. Obstet. Gynaecol. Res. *44*, 1902–1908.

Sequeira, J.M., Ramaekers, V.T., and Quadros, E.V. (2013). The diagnostic utility of folate receptor autoantibodies in blood. Clin. Chem. Lab. Med. *51*, 545–554.

Shaw, G.M., Finnell, R.H., Blom, H.J., Carmichael, S.L., Vollset, S.E., Yang, W., and Ueland, P.M. (2009). Choline and risk of neural tube defects in a folate-fortified population. Epidemiol. Camb. Mass *20*, 714–719.

Smith, A.D., Kim, Y.-I., and Refsum, H. (2008). Is folic acid good for everyone? Am. J. Clin. Nutr. *87*, 517–533.

Stokowski, L.A. (2004). Fetal alcohol syndrome: new guidelines for referral and diagnosis. Adv. Neonatal Care Off. J. Natl. Assoc. Neonatal Nurses *4*, 324.

Thomas, S., Thomas, T., Bosch, R.J., Ramthal, A., Bellinger, D.C., Kurpad, A.V., Duggan, C.P., and Srinivasan, K. (2018). Effect of Maternal Vitamin B12 Supplementation on Cognitive Outcomes in South Indian Children: A Randomized Controlled Clinical Trial. Matern. Child Health J.

Timmermans, S., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Steegers-Theunissen, R.P.M., and Steegers, E.A.P. (2009). Periconception folic acid supplementation, fetal growth and the risks of low birth weight and preterm birth: the Generation R Study. Br. J. Nutr. *102*, 777–785.

Toriyama, M., Toriyama, M., Wallingford, J.B., and Finnell, R.H. (2017). Folate-dependent methylation of septins governs ciliogenesis during neural tube closure. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *31*, 3622–3635.

Tran, P.L., Lehti, V., Lampi, K.M., Helenius, H., Suominen, A., Gissler, M., Brown, A.S., and Sourander, A. (2013). Smoking during pregnancy and risk of autism spectrum disorder in a Finnish National Birth Cohort. Paediatr. Perinat. Epidemiol. *27*, 266–274.

Veeranki, S.P., Gebretsadik, T., Mitchel, E.F., Tylavsky, F.A., Hartert, T.V., Cooper, W.O., Dupont, W.D., Dorris, S.L., Hartman, T.J., and Carroll, K.N. (2015). Maternal Folic Acid Supplementation During Pregnancy and Early Childhood Asthma. Epidemiol. Camb. Mass *26*, 934–941.

Wallingford, J.B., and Harland, R.M. (2002). Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. Dev. Camb. Engl. *129*, 5815–5825.

Wang, L., Christophersen, C.T., Sorich, M.J., Gerber, J.P., Angley, M.T., and Conlon, M.A. (2013). Increased abundance of Sutterella spp. and Ruminococcus torques in feces of children with autism spectrum disorder. Mol. Autism *4*, 42.

Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability. Exp. Biol. Med. Maywood NJ *232*, 1266–1274.

Wehby, G.L., and Murray, J.C. (2010). Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. Oral Dis. *16*, 11–19.

Williams BL, Hornig M, Buie T, Bauman ML, Cho Paik M, Wick I, et al (2011). Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. PloS One *6*.

Willnow, T.E., Hammes, A., and Eaton, S. (2007). Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. Dev. Camb. Engl. *134*, 3239–3249.

Windham GC, Zhang L, Gunier R, Croen LA, Grether JK (2006). Autism spectrum disorders in relation to distribution of hazardous air pollutants in the san francisco bay area. Env. Heal. *114*, 1438–1444.

Wu, M.C., Joubert, B.R., Kuan, P., Håberg, S.E., Nystad, W., Peddada, S.D., and London, S.J. (2014). A systematic assessment of normalization approaches for the Infinium 450K methylation platform. Epigenetics *9*, 318–329.

(1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. Lancet Lond. Engl. *338*, 131–137.

VI. Fiches annexes

Fiche n°1 : Critères d'exclusion de l'étude EFFET

Si un de ces critères est présent l'enfant ne peut pas être inclus dans l'étude

- Traitement pouvant altérer le métabolisme des folates (methotrexate, anticonvuslivants : valproate de sodium phénobarbital, phénytoine, primidone, carbamazépine, acide valproïque, divalproex , antibiotiques : tétracycline, triméthoprime, pyriméthamine, inhibiteurs de la pompe à protons, inhibiteurs de l'histamine-2)
- Traitement antipsychotique (dont traitement par Rispéridone)
- Supplémentation vitaminique ou minérale excédant les recommandations
- Enfant présentant une irritabilité sévère (*Aberrant Behavior Checklist*>17)
- Reflux gastro-oesophagien
- Toute pathologie rénale ou hépatique connue
- Enfant né prématuré (<37SA)
- Intolérance connue au lactose
- Hypersensibilité/ allergie connue aufolinate de calcium
- Enfants, avec troubles du spectre autistique, de la même fratrie
- Interdiction de participer simultanément à toute autre recherche.

Fiche n°2 : Score d'évaluation ADOS (Autism Diagnosis Observation Schedule)

ADOS Module 1

Préverbal/Mots isolés

N° inclusion : _____

Date : _____

Age : _____

Examinateur : _____

Cotation

L'ensemble des cotations ci-dessous devra être fait sur la base du comportement de l'enfant durant toute l'évaluation. Si le comportement de l'enfant change en qualité après une période d'adaptation, les cotations devront être basées sur la période suivant la stabilisation du comportement. La cotation doit être effectuée immédiatement après l'évaluation. Les cotations sont organisées en cinq domaines principaux : "A. Langage et Communication", "B. Interaction Sociale Réciproque", "C. Jeu", "D. Comportements Stéréotypés et Intérêts Restreints", "E. Autres Comportements Anormaux".

A LANGAGE ET COMMUNICATION.

Sauf consignes spécifiques, coter en fonction des attentes relatives à l'âge chronologique et non par rapport au niveau de développement ou par rapport à l'estimation des capacités de langage expressif.

1. Niveau général de langage non écholalique.

Cet item est coté par rapport à la complexité du langage expressif spontané produit au cours de la séance. La cotation doit refléter la majorité des productions, pas les plus complexes.

☐

0 = Utilisation régulière de productions comprenant deux mots ou plus.

1 = Phrases occasionnelles seulement ; mots isolés la plupart du temps.

2 = Uniquement des mots isolés reconnaissables ; doit utiliser au moins cinq mots différents au cours de la séance.

3 = Au moins un mot ou un mot approximatif, mais moins de 5 mots utilisés durant la séance.

8 = Absence de mots ou mots approximatifs.

2. Fréquence des vocalisations dirigées vers les autres.

Cet item est coté par rapport à la quantité de vocalisations socialement orientées.

☐

0 = Vocalisations dirigées vers le parent ou l'examinateur dans des contextes variés. Doit inclure le bavardage ou les vocalisations amicales, aussi bien que les vocalisations exprimant un intérêt ou un besoin.

1 = Vocalisations constantes dirigées vers le parent ou l'examinateur dans un contexte spécifique, OU vocalisations peu fréquentes dirigées vers le parent ou l'examinateur dans différents contextes.

2 = Vocalisations occasionnelles dirigées vers le parent ou l'examinateur de manière irrégulière dans un nombre limité de contextes. Inclut les geignements ou les pleurs dus à la frustration.

3 = Vocalisations qui ne semblent presque jamais orientées vers le parent ou l'examinateur, OU vocalisations peu fréquentes ou absentes.

3. Intonation des vocalisations ou des verbalisations.

Il s'agit d'un item général qui s'applique à toutes les vocalisations ou verbalisations, y compris les pleurs et les geignements.

☐

0 = Intonation normale, variant de manière appropriée, sans intonation particulière ou étrange.

1 = Petite variation dans le ton et le timbre ; plutôt plat ou exagéré, ou intonation occasionnellement particulière.

2 = Intonation étrange ou ton et accent inappropriés ET/OU vocalisations "mécaniques" particulièrement plates et atones OU pleurs étranges et peu de vocalisations d'un autre type.

8 = N/A (vocalisations insuffisantes pour évaluer l'intonation ; comprend la présence de pleurs normaux et peu de vocalisations d'un autre type).

4. Echolalie immédiate.

Cet item concerne la répétition immédiate par l'enfant du dernier énoncé ou de séries d'énoncés produits par le parent ou l'examinateur. Lors de la cotation, ne pas inclure les répétitions qui sont une amorce de réponse à l'examinateur ou qui sont utilisées comme moyen mnésique dans des tâches spécifiques.

☐

0 = Répète rarement ou jamais le discours des autres.

1 = Enoncé occasionnellement écholalique.

2 = Répète des mots et des phrases régulièrement, mais utilise du langage spontané (celui-ci peut être stéréotypé).

3 = Le langage consiste largement en écholalie immédiate.

8 = Langage trop limité pour juger.

Suite...

5. Utilisation stéréotypée/idiosyncrasique de mots ou de phrases.

La cotation pour cet item comprend l'écholalie différée ou d'autres phrases fortement répétitives, avec des schémas d'intonation constants. Ces mots ou ces phrases peuvent avoir une signification intentionnelle et peuvent être appropriés à la conversation à un certain niveau. L'item est centré sur la qualité stéréotypée ou idiosyncrasique de la formulation, sur l'utilisation inhabituelle de mots et/ou sur leur association arbitraire avec une signification particulière. Les néologismes doivent être cotés ici. La cotation est liée au niveau du langage expressif de l'enfant.

0 = Utilise rarement ou jamais de mots ou de phrases stéréotypés ou idiosyncrasiques.

1 = L'utilisation des mots ou des phrases tend à être plus répétitive que celle de la plupart des sujets, à un même niveau de complexité, mais elle n'est pas bizarre de manière évidente, OU productions stéréotypées occasionnelles ou utilisation de mots bizarres, OU utilisation de phrases d'une manière inhabituelle, coexistant avec un langage spontané flexible.

2 = Utilise souvent des productions stéréotypées ou des mots ou phrases bizarres avec également un autre langage.

3 = S'exprime presqu'exclusivement par des productions bizarres ou stéréotypées.

8 = N/A (par exemple, pas de discours par-phrases).

6. Utilisation du corps de l'autre pour communiquer.

Cet item se centre sur l'utilisation du corps d'une autre personne comme d'un outil. Ceci implique le mouvement d'un membre ou d'une partie du corps d'une autre personne en l'absence de tentative préalable ou simultanée pour attirer son attention par le regard.

0 = Pas d'utilisation du corps d'un adulte pour communiquer, excepté dans des situations où les autres stratégies n'ont pas fonctionné (par exemple, quand les autres discutent et que l'enfant ne peut pas obtenir leur attention) et en conjonction avec un regard coordonné.

1 = Prend la main d'une autre personne et la conduit à sa place, sans regard coordonné, mais sans placer la main sur les objets, et sans l'utiliser comme un outil ou pour pointer du doigt.

2 = Placement de la main ou d'une partie du corps d'une autre personne sur un objet, OU mouvement avec la main de cette personne quand elle tient un objet, OU utilisation de la main ou d'une partie du corps de l'autre comme outil ou pour effectuer le geste "pour" l'enfant (tel que pointé du doigt).

8 = Peu ou pas de communication spontanée.

7. Pointé du doigt.

Cet item cerne le pointé du doigt socialement dirigé, dans le but de demander et/ou de partager l'attention. Le terme *distant* fait référence à un pointé et non à un contact par le toucher (par exemple, à plus de cinq centimètres environ).

0 = Pointe avec son index pour faire une référence visuelle (regard coordonné vers l'objet et la personne) à des objets distants dans au moins deux contextes.

1 = Utilise le pointé pour faire référence aux objets, mais sans flexibilité ou fréquence suffisante pour correspondre aux critères de la cotation "0" (par exemple : seulement un cas de pointé du doigt qui correspond à la description pour une cotation "0", ou absence de regard coordonné accompagnant le pointé du doigt, bien que l'enfant puisse vocaliser) ; OU produit une approximation du pointé plutôt qu'un pointé de l'index ; OU coordonne seulement le pointé du doigt qui inclut le fait de toucher une image ou un autre objet proche avec le regard ou des vocalisations ; OU pointe seulement vers une personne ou vers lui-même.

2 = Pointe seulement de près ou en touchant effectivement un objet, sans regard ou vocalisation coordonnés.

3 = Ne pointe en aucune manière les objets.

8. Gestes.

Cet item renvoie à l'utilisation de tout geste émotionnel ou descriptif autre que le pointé du doigt. Les gestes peuvent être conventionnels ou idiosyncratiques mais ils doivent être communicatifs et ne peuvent pas inclure la mobilisation du corps d'une autre personne; ils n'incluent pas les maniérismes. La production de routines motrices peut être cotée ici si elles sont réalisées d'une manière communicative, spontanée et appropriée. Les gestes bizarres ne doivent pas être inclus dans cette cotation, à moins qu'ils ne soient les seuls gestes appropriés à être produits.

0 = Utilisation spontanée d'au moins deux gestes différents de n'importe quel type (descriptif, conventionnel, émotionnel ou instrumental excluant le pointé du doigt), au moins l'un de ces gestes est utilisé plus d'une fois.

1 = Utilisation spontanée de gestes descriptifs, conventionnels, instrumentaux ou émotionnels, mais exagérés ou limités en diversité et/ou en contexte (par exemple : seulement un geste ou bien chacun n'est utilisé qu'une fois).

2 = Pas d'utilisation spontanée de gestes descriptifs, conventionnels, instrumentaux ou émotionnels, OU seulement une utilisation inappropriée.

8 = N/A (par exemple, limité par des difficultés motrices sévères).

5. Plaisir partagé dans l'interaction.

Coter la réponse sociale de l'enfant au cours de toute activité ou sollicitation. Cette cotation ne doit pas être employée pour indiquer l'état émotionnel général de l'enfant durant l'entretien. L'évaluation est centrée sur la capacité de l'enfant à signifier son plaisir à l'examinateur, et non simplement à interagir ou à répondre.

☐

0 = Manifeste un plaisir évident et approprié à l'examinateur dans plus d'une activité. Doit inclure le plaisir dans au moins une activité qui n'est pas de nature purement physique (par exemple, les chatouilles).

1 = Manifeste un certain plaisir approprié pour les actions de l'examinateur dans plus d'une activité, OU manifeste un plaisir évident dirigé vers l'examinateur durant une interaction (qui peut être de nature physique).

2 = Exprime peu ou pas de plaisir dans l'interaction avec l'examinateur. Peut manifester du plaisir dans ses propres actions, dans l'interaction avec un parent ou pour les jouets disponibles.

6. Réponse à l'appel de son prénom.

Cette évaluation cote la réponse de l'enfant à l'appel de son prénom au cours d'une sollicitation spécifique. Une réponse complète se définit par une orientation *et l'établissement d'un contact visuel avec* la personne qui l'appelle par son prénom. Le nombre de sollicitations est précisé car la probabilité que l'enfant regarde augmente lorsque plusieurs occasions lui sont offertes.

☐

0 = Regarde vers l'examinateur et établit immédiatement un contact visuel pour au moins l'un des deux premiers appels évidents produits par l'examinateur (seul le prénom est appelé).

1 = Regarde vers le parent et établit immédiatement un contact visuel pour le premier ou le second appel de son seul prénom, OU établit un contact visuel avec l'examinateur au troisième ou quatrième appel du seul prénom.

2 = N'établit pas de contact visuel avec l'examinateur ou le parent au bout de six appels de son prénom, mais modifie brièvement l'orientation de son regard (pas de contact visuel) OU regarde au moins une fois quand une vocalisation intéressante ou familière ou une verbalisation est produite (par exemple : faire claquer la langue, *"Je vais t'attraper"*).

3 = Ne regarde pas vers l'examinateur ou le parent après toute tentative uniquement verbale ou vocale pour attirer son attention.

7. Demande.

La *demande* se définit comme une indication conventionnelle – par geste, vocalisation, expression faciale ou par d'autres moyens – du désir de l'enfant pour une action ou un objet particulier. Cela peut inclure des demandes pour une routine sociale, un ballon, le lapin, les bulles et ainsi de suite, tant qu'elles ne font pas partie d'une routine de la maison et qu'elles sont rattachées à un événement ou à un objet spécifique. Cela n'inclut pas un désir général d'être porté. Si l'enfant utilise plus d'une stratégie pour demander différents objets ou activités, coter la demande qui correspond au niveau le plus élevé (le plus proche de 0). En attribuant une cotation, exclure la demande pour des éléments du goûter ou pour quitter la pièce.

☐

0 = Présente une intégration appropriée du contact visuel avec au moins un comportement (par exemple : vocalisation, geste ou tendre un objet à l'examinateur ou au parent) pour demander des bulles, l'animal mécanique, une routine avec objet ou une routine sociale. Doit inclure le contact visuel et une indication évidente de la volonté que l'autre personne fasse ou donne quelque chose (par exemple : en persistant dans la demande si l'adulte marque un temps d'arrêt avant de répondre). Ceci n'inclut pas le fait de tirer physiquement la main de l'examinateur ou de la placer sur un objet ou de la diriger vers lui-même.

1 = Utilise un comportement ou plus parmi ceux qui sont répertoriés ci-dessus pour demander l'animal, des bulles et/ou une routine sans intégrer le contact visuel avec un (d') autre(s) comportement(s) tels que les vocalisations ou les gestes. Cela inclut le geste de tendre à l'examinateur ou à un parent sans le regarder ; regarder l'autre personne sans autre comportement ; et des demandes brèves sans persister. Cela n'inclut pas le fait de tirer physiquement la main de l'examinateur vers un objet ou vers lui-même.

2 = Ne demande pas directement comme cela est spécifié pour une cotation "0" ou "1", mais utilise des moyens physiques pour demander au moins une action faisant partie d'une routine (par exemple : tirer la main de l'examinateur vers un objet ou vers lui-même).

3 = Peut participer à une (des) routine(s) ou essayer d'actionner un objet en vocalisant, tapant ou en produisant une autre action (par exemple : souffler) sans regarder une autre personne ou vocaliser pour demander de l'aide, mais ne demande pas comme cela est spécifié ci-dessus.

Suite...

8. Donner.

Cet item évalue l'action de donner des objets à une autre personne dans une variété de contextes, y compris le partage et la demande d'aide. Il ne nécessite pas un contact visuel, mais implique le fait de lâcher l'objet de manière indépendante et spontanée.

0 = Donne spontanément des jouets ou des objets à d'autres personnes dans une variété de contextes au cours de l'évaluation avec l'ADOS. Il peut s'agir de donner des jouets, de la nourriture ou de la nourriture factice dans le but de partager.

1 = Donne des objets à d'autres personnes pour obtenir de l'aide (par exemple : pour la manipulation de jouets ou pour ouvrir une boîte de nourriture) ou comme élément d'une routine.

2 = Donne rarement ou jamais quelque chose à une autre personne.

9. Montrer.

Montrer se définit comme l'orientation délibérée ou le placement d'un objet là où il peut être vu par une autre personne, sans l'objectif identifiable d'obtenir de l'aide ou de participer à une routine. Pour une cotation "0", ce comportement doit être accompagné par un contact visuel mais les vocalisations ne sont pas requises.

0 = Montre spontanément des jouets ou des objets au cours de l'évaluation avec l'ADOS en les tenant levés ou en les plaçant devant les autres tout en utilisant le contact visuel avec ou sans vocalisation.

1 = Montre des jouets ou des objets de manière partielle ou incohérente (par exemple : les tient levés et/ou les place devant les autres sans coordonner avec le contact visuel, regarde un objet tenu dans ses mains puis une autre personne sans l'orienter clairement vers cette personne, ou montre des objets comme décrit ci-dessus pour une cotation "0" en une seule occasion).

2 = Ne montre pas d'objets à une autre personne.

10. Initiation spontanée de l'attention conjointe.

Cet item évalue les tentatives de l'enfant pour diriger l'attention d'une autre personne vers des objets que ni l'un ni l'autre ne touche. Des tentatives qui ont pour but de demander ne sont pas prises en compte.

0 = Utilise un contact visuel clairement intégré pour faire référence à un objet qui est hors de portée en regardant l'objet, puis l'examinateur ou le parent, pour revenir à l'objet. Le contact visuel peut être coordonné avec un pointé du doigt et/ou des vocalisations. Un exemple clair de tentative pour attirer l'attention d'une autre personne vers un objet (c'est-à-dire plus qu'une simple référence à l'objet) est suffisant pour cette cotation.

1 = Fait partiellement référence à un objet qui est nettement hors de portée. Peut regarder spontanément et pointer du doigt l'objet et/ou vocaliser, mais ne coordonne aucun de ces comportements avec le regard vers une autre personne, OU peut regarder un objet puis regarder ou pointer du doigt l'examinateur ou le parent, mais sans retourner visuellement à l'objet.

2 = Absence d'une initiation spontanée de l'attention conjointe afin de faire référence à un objet qui est hors de portée.

11. Réponse à l'attention conjointe.

Cette évaluation cote la réponse de l'enfant à l'utilisation par l'examinateur du regard et/ou du pointé du doigt pour diriger son attention vers un objet éloigné. La cotation ne doit pas être influencée par la compréhension qu'a l'enfant du langage (c'est-à-dire, l'enfant doit suivre l'orientation du regard ou le pointé de l'examinateur mais n'a pas à comprendre ce qui a été dit).

0 = Utilise la seule orientation des yeux et du visage de l'examinateur comme indice pour regarder vers la cible, sans qu'il ne soit besoin de pointer du doigt. L'enfant doit suivre le regard de l'examinateur et tourner son visage ou ses yeux en direction de la cible après avoir regardé l'examinateur le faire ; il n'a pas à voir réellement la cible.

1 = Répond au pointé du doigt en regardant la cible, ou en direction de la cible.

2 = Regarde la cible quand elle est actionnée ou placée directement devant lui, mais ne se sert pas du regard ou du pointé du doigt afin de localiser la cible à distance.

3 = Pas d'intérêt ou de prise de conscience de la présence de la cible. S'il n'est pas possible d'obtenir l'attention de l'enfant au bout de cinq reprises, attribuer cette cotation.

Suite...

12. Qualité des ouvertures sociales.

Cet item résume la *qualité* des tentatives de l'enfant pour initier l'interaction sociale et non la fréquence de ces tentatives. Une attention particulière doit être portée à la forme des ouvertures et à leur adéquation au contexte social. La cotation doit refléter la majorité des ouvertures sociales et pas uniquement les meilleures.

☐

0 = Utilise efficacement des moyens verbaux et non verbaux pour faire des ouvertures sociales claires à l'examinateur ou au parent. Les ouvertures doivent être appropriées aux contextes actuels.

1 = Qualité des ouvertures sociales légèrement inhabituelle. Donner cette cotation si les ouvertures sont limitées à des demandes personnelles ou liées à de forts intérêts, mais avec une certaine tentative pour impliquer l'examinateur ou le parent dans cet intérêt.

2 = Ouvertures qui manquent souvent d'adéquation au contexte ET/OU de qualité sociale. Donner aussi cette cotation s'il y a quelques ouvertures clairement inappropriées.

3 = Pratiquement pas d'ouvertures sociales, d'aucune sorte.

ADOS MODULE 1

Identité de l'enfant : _____ Date de naissance : _____

Sexe : _____ Date de l'évaluation : _____

Examinateur : _____ Age chronologique : _____

Algorithme pour le diagnostic d'Autisme DSM-IV/CIM-10
(Convertir les scores 3 du protocole en 2, et considérer tous les scores autres que 0-3 comme 0)

Communication

Fréquence des vocalisations dirigées vers les autres	(A-2)	_____
Utilisation stéréotypée/idiosyncrasique de mots ou de phrases	(A-5)	_____
Utilisation du corps de l'autre pour communiquer	(A-6)	_____
Pointé du doigt	(A-7)	_____
Gestes	(A-8)	_____

Total Communication _____
("cut-off" pour l'*Autisme* = 4 ; "cut-off" pour les *Désordres du Spectre Autistique* = 2)

Interaction Sociale Réciproque

Contact visuel inhabituel	(B-1)	_____
Expressions faciales dirigées vers les autres	(B-3)	_____
Plaisir partagé dans l'interaction	(B-5)	_____
Montrer	(B-9)	_____
Initiation spontanée de l'attention conjointe	(B-10)	_____
Réponse à l'attention conjointe	(B-11)	_____
Qualité des ouvertures sociales	(B-12)	_____

Total Interaction Sociale _____
("cut-off" pour l'*Autisme* = 7 ; "cut-off" pour les *Désordres du Spectre Autistique* = 4)

Total Communication + Interaction Sociale _____
("cut-off" pour l'*Autisme* = 12 ; "cut-off" pour les *Désordres du Spectre Autistique* = 7)

Jeu

Jeu fonctionnel avec des objets	(C-1)	_____
Imagination/Créativité	(C-2)	_____

Total Jeu _____

Comportements Stéréotypés et Intérêts Restreints

Intérêt sensoriel inhabituel pour le matériel de jeu/la personne	(D-1)	_____
Maniérismes des mains et des doigts et autres maniérismes complexes	(D-2)	_____
Intérêts inhabituellement répétitifs et comportements stéréotypés	(D-4)	_____

Total Comportements Stéréotypés et Intérêts Restreints _____

Diagnostic

Classification à l'ADOS : _____

Diagnostic général : _____

Copyright © 2003 by Western Psychological Services. Not to be reproduced in any form without written permission.
Copyright © 2008 by Editions Hogrefe France. Toute reproduction interdite. www.hogrefe.fr.

ADOS Module 2

Phrases

N° inclusion :.....

Date : .....

Age : .....

Examinateur : .....

Cotation

L'ensemble des cotations ci-dessous devra être fait sur la base du comportement de l'enfant durant toute l'évaluation. Si le comportement de l'enfant change en qualité après une période d'adaptation, les cotations devront être basées sur la période suivant la stabilisation du comportement. La cotation doit être effectuée immédiatement après l'évaluation. Les cotations sont organisées en cinq domaines principaux : "A. Langage et Communication", "B. Interaction Sociale Réciproque", "C. Jeu", "D. Comportements Stéréotypés et Intérêts Restreints", "E. Autres Comportements Anormaux".

A LANGAGE ET COMMUNICATION.

Sauf instructions spécifiques, coter en fonction des attentes relatives à l'âge chronologique et non par rapport au niveau de développement ou par rapport à l'estimation des capacités de langage expressif.

1. Niveau général de langage non écholalique.

Cet item est coté par rapport à la complexité du langage expressif spontané produit au cours de la séance. La cotation doit refléter la majorité des productions, pas les plus complexes.

☐

0 = Langage non écholalique par phrases de trois mots ou plus par énoncé ; quelques formes grammaticales telles que les pluriels ou les temps.

1 = Langage principalement composé d'énoncés de deux ou trois mots, avec un minimum ou une absence de formes grammaticales.

2 = Phrases occasionnelles ; essentiellement des mots isolés.

3 = Mots isolés uniquement ou pas de langage parlé.

7 = Tout le langage est constitué d'écholalie (immédiate ou différée), avec ou sans intention de communiquer.

2. Quantité d'ouvertures sociales/maintien de l'attention.

Cet item se focalise sur le *nombre* de tentatives de l'enfant pour obtenir, maintenir ou diriger l'attention de l'examinateur, ET/OU pour diriger l'attention de l'examinateur vers les objets ou actions qui intéressent l'enfant. Ne pas coter ici la qualité non verbale de ces tentatives ; cet aspect sera pris en considération plus loin dans le protocole. Cependant, la cotation pour cet item peut inclure des questions répétitives, des instructions données à l'examinateur ou des comportements non verbaux s'ils ne sont pas liés aux préoccupations ou destinés à obtenir des objets mais semblent fonctionner comme une méthode pour établir le contact social.

☐

0 = Tentatives fréquentes pour obtenir ou maintenir l'attention de l'examinateur ET/OU pour diriger l'attention de l'examinateur vers les objets ou les actions qui intéressent l'enfant.

1 = Quelques tentatives pour obtenir, maintenir ou diriger l'attention de l'examinateur comme décrit ci-dessus pour la note"0", mais réduites en fréquence, ou par le nombre de contextes exploités (par exemple : cherche seulement l'attention pour diriger le comportement de l'examinateur).

2 = Présente peu d'intérêt pour l'attention accordée par l'examinateur, sauf s'il a besoin d'aide, ET/OU peu de tentatives pour obtenir, maintenir ou diriger l'attention de l'examinateur.

7 = Demandes d'attention inhabituellement fréquentes, intenses ou excessives en dehors des tâches structurées ou des questions de l'ADOS, sans prise en compte du caractère social approprié du comportement.

3. Anomalies du langage associées à l'autisme (intonation/volume/rythme/débit).

Cet item se focalise sur les anomalies du langage spécifiques à l'autisme. En raison de la variabilité dans le spectre de l'autisme, les structures de langage inhabituelles par les caractéristiques identifiées, mais non spécifiques de l'autisme, doivent être cotées "1". Coter cet item en fonction du niveau de complexité du langage expressif. Les anomalies du langage typiquement associées avec le retard global de langage reçoivent la cotation "0".

☐

0 = Intonation variant de manière appropriée, volume correct et débit du langage normal avec un rythme régulier coordonné à la respiration.

1 = Peu de variation dans la hauteur et dans le ton ; intonation plutôt monocorde ou exagérée, mais pas particulièrement bizarre OU volume légèrement inhabituel, ET/OU langage qui a tendance à être légèrement et inhabituellement ralenti, accéléré ou saccadé.

2 = Langage qui est clairement anormal pour n'importe laquelle des raisons suivantes : lent et hésitant, inadapté au niveau de la rapidité ; saccadé et irrégulier dans le rythme (sans qu'il s'agisse d'un bégaiement ordinaire) ; intonation étrange ou hauteur et accentuation inappropriées ; fortement monocorde et sans intonation ("mécanique") ; volume constamment anormal.

7 = Bégaiement ou autre désordre qui touche la fluidité du langage.

8 = N/A (langage par phrase inadéquat en fréquence ou en complexité pour une évaluation de l'intonation/du rythme/du débit).

4. Echolalie immédiate.

Cet item concerne la répétition immédiate par l'enfant du dernier énoncé ou de séries d'énoncés produits par le parent ou l'examinateur. Lors de la cotation, exclure les répétitions qui sont une amorce de réponse à l'examinateur ou qui sont utilisées comme moyen mnésique dans des tâches spécifiques

☐

0 = Répète rarement ou jamais le discours des autres.

1 = Enoncé occasionnellement écholalique.

2 = Répète des mots et des phrases régulièrement, mais utilise du langage spontané (celui-ci peut être stéréotypé).

3 = Le langage consiste largement en écholalie immédiate.

Suite...

5. Utilisation stéréotypée/idiosyncrasique de mots ou de phrases.

La cotation pour cet item comprend l'écholalie différée ou d'autres phrases fortement répétitives, avec des schémas d'intonation constants. Ces mots ou ces phrases peuvent être intentionnels, dotés d'une signification et appropriés à la conversation à un certain niveau. L'item est centré sur la qualité stéréotypée ou idiosyncrasique de la formulation ou sur l'utilisation inhabituelle de mots et/ou sur leur association arbitraire avec une signification particulière. Les néologismes doivent être cotés ici. La cotation est liée au niveau du langage expressif de l'enfant.

0 = Utilise rarement ou jamais de mots ou de phrases stéréotypés ou idiosyncrasiques.

1 = L'utilisation des mots ou des phrases tend à être plus répétitive que celle de la plupart des sujets, à un même niveau de complexité, mais elle n'est pas bizarre de manière évidente, OU productions stéréotypées occasionnelles ou utilisation de mots bizarres, OU utilisation de phrases d'une manière inhabituelle, coexistant avec un langage spontané flexible.

2 = Utilise souvent des productions stéréotypées ou des mots ou phrases bizarres avec également un autre langage.

3 = S'exprime presqu'exclusivement par des productions bizarres ou stéréotypées.

6. Conversation.

Cet item se centre sur l'utilisation réciproque de mots et de phrases dans une conversation sociale. Coter cet item en fonction du niveau de langage expressif de l'enfant. Coter toute marque (ou absence) de réciprocité *non verbale* dans la rubrique "Quantité de communication sociale réciproque" dans la section B de ce protocole.

0 = Flux de conversation qui se construit sur le discours de l'examinateur. Cette cotation nécessite qu'une grande partie du langage de l'enfant constitue à la fois une réponse au discours de l'examinateur et un échantillon additionnel de langage (pas nécessairement une question) qui est construit à partir de ce qui vient d'être dit et qui permet une réponse de la part de l'examinateur (c'est-à-dire des séquences d'au moins quatre éléments : l'examinateur ouvre la communication, l'enfant commente, l'examinateur répond, l'enfant répond à la réponse).

1 = Le discours inclut certaines élaborations spontanées des réponses de l'enfant au bénéfice de l'examinateur OU guide l'examinateur sur une voie qu'il peut suivre, mais moins en quantité que ce que l'on pourrait attendre du niveau de langage de l'enfant, ou limitée en flexibilité.

2 = Peu de conversation réciproque soutenue par l'enfant ; suit sa propre idée plutôt que de participer à un échange ; peut offrir spontanément de l'information ou des commentaires mais peu de sens de la réciprocité.

3 = Peu de langage communicatif spontané (bien qu'il puisse présenter beaucoup de langage écholalique ou non communicatif). Cette cotation s'applique aux enfants qui font des réponses limitées, mais très peu nombreuses.

7. Pointé du doigt.

Cet item cerne le pointé du doigt socialement dirigé, dans le but de demander et/ou de partager l'attention. Le terme *distant* fait référence à un pointé et non à un contact par le toucher (par exemple, à plus de cinq centimètres environ).

0 = Pointe avec son index pour faire une référence visuelle (regard coordonné vers l'objet et la personne) à des objets distants dans au moins deux contextes.

1 = Utilise le pointé pour faire référence aux objets, mais sans flexibilité ou fréquence suffisante pour correspondre aux critères de la cotation "0" (par exemple : seulement un cas de pointé du doigt qui correspond à la description pour une cotation "0", ou absence de regard coordonné accompagnant le pointé du doigt, bien que l'enfant puisse vocaliser) ; OU produit une approximation du pointé plutôt qu'un pointé de l'index ; OU coordonne seulement le pointé du doigt qui inclut le fait de toucher une image ou un autre objet proche avec le regard ou des vocalisations ; OU pointe seulement vers une personne.

2 = Pointe seulement de près ou en touchant effectivement un objet, sans regard coordonné.

3 = Ne pointe en aucune manière les objets.

8. Gestes descriptifs, conventionnels, instrumentaux ou informatifs.

Cet item se centre sur les gestes descriptifs qui symbolisent ou représentent un objet ou un événement. L'utilisation de gestes conventionnels (par exemple : applaudir pour "c'est bien"), informatifs, ou instrumentaux (par exemple : demander, hausser les épaules, hocher la tête, secouer la tête) reçoivent un crédit partiel. Lors de la cotation, exclure le pointé du doigt, mais inclure les comportements qui apparaissent au cours de la **Tâche de Démonstration** et durant toute la séance. Toutefois, l'accent est porté sur la manière dont l'enfant utilise les gestes avant que l'examinateur l'incite à le faire ou le lui demande.

0 = Utilisation spontanée de plusieurs gestes descriptifs. Ces gestes peuvent être typiques ou idiosyncrasiques, mais doivent être communicatifs. Peut également utiliser des gestes conventionnels ou instrumentaux.

1 = Une certaine utilisation spontanée de gestes descriptifs, mais exagérés ou limités en diversité et/ou en contextes OU utilisation fréquente de gestes conventionnels ou instrumentaux mais pas de gestes descriptifs.

2 = Une certaine utilisation spontanée de gestes informatifs, conventionnels ou instrumentaux, mais pas de gestes descriptifs.

3 = Pas ou peu d'utilisation spontanée de gestes conventionnels, instrumentaux ou descriptifs

8 = N/A (par exemple : limité par un handicap physique).

B. INTERACTION SOCIALE RECIPROQUE.

Coter en fonction de l'âge mental non verbal (ou du QI non verbal).

1. Contact visuel inhabituel.

La cotation pour cet item requiert la distinction entre un regard net, flexible, socialement modulé, et approprié, employé pour une variété de buts et un regard limité en flexibilité, en pertinence ou en contexte. Si l'enfant est timide au départ et que son regard change de façon marquée et durable au fur et à mesure qu'il se sent plus à l'aise, ne pas coter à partir des premières impressions. Cependant, si le contact visuel ne s'améliore jamais, la cotation doit s'appuyer sur ce qui est observé, même si l'enfant paraît timide.

0 = Regard approprié présentant des changements subtils, combinés à d'autres modes de communication.

2 = Utilise un contact visuel pauvrement modulé pour initier, terminer ou réguler l'interaction sociale.

2. Expressions faciales dirigées vers les autres.

L'évaluation pour cet item doit indiquer si les expressions faciales de l'enfant sont dirigées vers une autre personne dans le but de communiquer un affect. Les expressions faciales qui sont dirigées vers les objets ou qui ne sont pas dirigées ne sont pas cotées ici. Les expressions faciales appropriées doivent être cotées même si elles sont bizarres.

0 = Dirige une variété d'expressions faciales appropriées vers le parent ou l'examinateur afin de communiquer un affect.

1 = Une certaine orientation des expressions faciales vers l'examinateur et/ou le parent (par exemple : dirige seulement des expressions indiquant des émotions extrêmes vers les autres, ou dirige occasionnellement une plus large variété d'expressions). Un enfant qui présente un éventail limité d'expressions faciales, ou présente seulement des expressions faciales légèrement inhabituelles, mais qui dirige la plupart de ses expressions faciales vers une autre personne est coté ici.

2 = Dirige rarement ou jamais d'expressions faciales appropriées vers les autres.

3. Plaisir partagé dans l'interaction.

Coter la réponse sociale de l'enfant au cours de toute activité ou sollicitation. Cette cotation ne doit pas être employée pour indiquer l'état émotionnel général de l'enfant durant l'entretien. Notez que l'on attend des enfants et adolescents d'âge chronologique plus élevé qu'ils montrent leur plaisir d'une manière plus atténuée et plus subtile que ne le font les enfants plus jeunes. L'évaluation est centrée sur la capacité de l'enfant à signifier son plaisir à l'examinateur, et non simplement à interagir.

0 = Manifeste un plaisir évident et approprié dans la participation aux interactions et à la conversation dans plus d'une activité ou d'un sujet de conversation.

1 = Manifeste un certain plaisir approprié pour les actions de l'examinateur dans plus d'une activité OU un plaisir évident lors d'une seule interaction.

2 = Exprime peu ou pas de plaisir dans l'interaction. Peut manifester du plaisir dans ses propres actions, ou dans une partie de la conversation, mais pas dans les comportements de l'examinateur et pas dans l'interaction.

8 = Pas de cotation possible en raison du peu ou même de l'absence d'interaction, ou pour une autre raison.

4. Réponse à l'appel de son prénom.

Cette évaluation cote la réponse de l'enfant à l'appel de son prénom au cours d'une sollicitation spécifique. Une réponse complète se définit par une orientation et l'établissement d'un contact visuel avec la personne qui l'appelle par son prénom. Le nombre de sollicitations est précisé car la probabilité que l'enfant regarde augmente lorsque plusieurs occasions lui sont données.

0 = Regarde vers l'examinateur et établit immédiatement un contact visuel pour au moins l'un des deux premiers appels évidents produits par l'examinateur (seul le prénom est appelé).

1 = Regarde vers le parent et établit immédiatement un contact visuel pour le premier ou le second appel de son seul prénom, OU établit un contact visuel avec l'examinateur au troisième ou quatrième appel du seul prénom.

2 = N'établit pas de contact visuel avec l'examinateur ou le parent au bout de quatre appels de son prénom, mais modifie brièvement l'orientation de son regard (pas de contact visuel) OU regarde au moins une fois quand une vocalisation intéressante ou familière ou une verbalisation est produite (par exemple : faire claquer la langue, "*Je vais t'attraper*").

3 = Ne regarde pas vers l'examinateur ou le parent après toute tentative uniquement verbale ou vocale pour attirer son attention.

Suite...

Interaction Sociale Réciproque (suite)

5. Montrer.

Montrer se définit comme l'orientation délibérée ou le placement d'un objet là où il peut être vu par une autre personne, sans l'objectif identifiable d'obtenir de l'aide ou de participer à une routine. Pour une cotation "0", ce comportement doit être accompagné par un contact visuel mais les vocalisations ne sont pas requises.

0 = Montre spontanément des jouets ou des objets au cours de l'évaluation avec l'ADOS en les tenant levés ou en les plaçant devant les autres et en utilisant le contact visuel avec ou sans vocalisation.

1 = Montre des jouets ou des objets de manière partielle ou irrégulière (par exemple : les tient levés et/ou les place devant les autres sans coordonner avec le contact visuel, regarde un objet tenu dans ses mains puis une autre personne sans l'orienter clairement vers cette personne, ou montre des objets comme décrit ci-dessus pour une cotation "0" en une seule occasion).

2 = Ne montre pas d'objets à une autre personne.

6. Initiation spontanée de l'attention conjointe.

Cet item évalue les tentatives de l'enfant pour diriger l'attention d'une autre personne vers des objets que ni l'un ni l'autre ne touche. Des tentatives qui ont pour but de demander ne sont pas prises en compte.

0 = Utilise un contact visuel clairement intégré pour faire référence à un objet qui est hors de portée en regardant l'objet, puis l'examinateur ou le parent, pour revenir à l'objet. Le contact visuel peut être coordonné avec un pointé du doigt et/ou des vocalisations. Un exemple clair de tentative pour attirer l'attention d'une autre personne vers un objet (c'est-à-dire plus qu'une simple référence à l'objet) est suffisant pour cette cotation.

1 = Fait partiellement référence à un objet qui est nettement hors de portée. Peut regarder spontanément et pointer du doigt l'objet et/ou vocaliser, mais ne coordonne aucun de ces comportements avec le regard à une autre personne, OU peut regarder un objet puis regarder ou pointer du doigt l'examinateur ou le parent, mais sans retourner visuellement à l'objet.

2 = Absence d'une initiation spontanée de l'attention conjointe afin de faire référence à un objet qui est hors de portée.

7. Réponse à l'attention conjointe.

Cette évaluation cote la réponse de l'enfant à l'utilisation par l'examinateur du regard et/ou du pointé du doigt pour diriger son attention vers un objet éloigné. La cotation ne doit pas être influencée par la compréhension qu'a l'enfant du langage (c'est-à-dire, l'enfant doit suivre l'orientation du regard ou le pointé de l'examinateur mais n'a pas à comprendre ce qui a été dit).

0 = Utilise la seule orientation des yeux et du visage de l'examinateur comme indice pour regarder vers la cible, sans qu'il ne soit besoin de pointer du doigt. L'enfant doit suivre le regard de l'examinateur et tourner son visage ou ses yeux en direction de la cible après avoir regardé l'examinateur le faire ; il n'a pas à voir réellement la cible.

1 = Répond au pointé du doigt en regardant la cible, ou en direction de la cible.

2 = Regarde la cible quand elle est actionnée ou placée directement devant lui, mais ne se sert pas du regard ou du pointé du doigt afin de localiser la cible à distance.

3 = Pas d'intérêt ou de prise de conscience de la présence de la cible. S'il n'est pas possible d'obtenir l'attention de l'enfant au bout de cinq reprises, attribuer cette cotation.

8. Qualité des ouvertures sociales.

Cet item résume la *qualité* des tentatives de l'enfant pour initier l'interaction sociale avec l'examinateur et non sur la fréquence de ces tentatives. Une attention particulière doit être portée à la forme des ouvertures et à leur adéquation au contexte social. La cotation doit refléter la majorité des ouvertures sociales à l'égard de l'examinateur et pas seulement les meilleures. Ne pas coter les comportements à l'égard du parent.

0 = Utilise efficacement des moyens non verbaux et verbaux/vocaux pour faire des ouvertures sociales claires à l'examinateur. Les ouvertures doivent être appropriées aux contextes actuels.

1 = Qualité des ouvertures sociales légèrement inhabituelle. Les ouvertures peuvent être limitées à des demandes personnelles ou liées aux propres intérêts de l'enfant, mais avec une certaine tentative pour impliquer l'examinateur dans cet intérêt.

2 = Quelques ouvertures clairement inappropriées ; beaucoup d'ouvertures manquent d'intégration au contexte ET/OU de qualité sociale. Cette cotation inclut l'intérêt de l'enfant pour des préoccupations avec peu de tentatives pour impliquer l'examinateur.

3 = Pratiquement pas d'ouvertures sociales, d'aucune sorte.

Suite...

9. Qualité de la réponse sociale.

Cet item résume les réponses sociales de l'enfant tout au long de la session.

0 = Présente un éventail de réponses appropriées, variées selon le contexte social immédiat et les sollicitations.

1 = Présente une réponse à la plupart des situations sociales, mais quelque peu limitée, socialement maladroite, inappropriée, non constante ou constamment négative.

2 = Réponses étranges, stéréotypées, ou restreintes en diversité ou inappropriées au contexte.

3 = Réponse minimale ou absente face aux tentatives de l'examinateur d'entrer en contact avec l'enfant.

10. Quantité de communication sociale réciproque.

Cet item se centre sur la fréquence avec laquelle les échanges réciproques apparaissent au cours de la séance, faisant appel à n'importe quel mode de communication. *La fréquence* est définie à la fois par le nombre absolu d'occurrences et par leur distribution dans une variété de contextes immédiats. La cotation de cet item inclut les aspects du comportement non verbal et verbal/vocal, qui n'ont pas besoin d'être coordonnés mais doivent entraîner des échanges réciproques. Les échanges réciproques soit avec le parent soit avec l'examinateur peuvent être cotés ici.

0 = Utilisation importante de comportements verbaux ou non verbaux (quelque soit le niveau atteint) dans le but d'une interaction sociale (c'est-à-dire bavardage, commentaires et remarques ou comportements non verbaux qui semblent avoir un objectif intentionnel de réciprocité).

1 = Une certaine communication sociale réciproque (comme décrit ci-dessus pour une cotation "0"), mais réduite en fréquence, en quantité ou en nombre de contextes dans lesquels elle survient (indépendamment de la quantité de discours non social).

2 = Une grande partie de la communication est orientée vers les objets (c'est-à-dire pour demander des choses), OU est une réponse à des questions, OU est écholalique, OU concerne des préoccupations particulières ; peu ou pas de bavardage social ou d'échanges.

3 = Peu ou pas de communication sociale réciproque.

11. Qualité générale de la relation.

La cotation pour cet item résume le jugement général de l'examinateur sur la relation établie avec l'enfant durant la séance. L'évaluation doit particulièrement prendre en compte le degré avec lequel l'examinateur a dû modifier son propre comportement pour maintenir l'interaction avec succès.

0 = Relation "confortable" avec l'examinateur qui est appropriée au contexte.

1 = Interaction parfois "confortable", mais pas soutenue (par exemple : se sent parfois maladroit ou guindé ou le comportement de l'enfant semble mécanique ou inapproprié).

2 = Interaction unilatérale ou inhabituelle, donnant un caractère légèrement "inconfortable" à l'entretien ou l'entretien aurait été difficile, si l'examinateur n'avait pas constamment modifié la structure de la situation au-delà de ce qui est fourni par les activités standard de l'ADOS.

3 = L'enfant manifeste un minimum d'attention à l'égard de l'examinateur OU l'entretien est très "inconfortable" pendant une durée significative.

ADOS MODULE 2

Identité de l'enfant : _____ Date de naissance : _____

Sexe : _____ Date de l'évaluation : _____

Examinateur : _____ Age chronologique : _____

Algorithme pour le diagnostic d'Autisme DSM-IV/CIM-10
(Convertir les scores 3 du protocole en 2, et considérer tous les scores autres que 0-3 comme 0)

Communication

Quantité d'ouvertures sociales/maintien de l'attention	(A-2)	_____
Utilisation stéréotypée/idiosyncrasique de mots ou de phrases	(A-5)	_____
Conversation	(A-6)	_____
Pointé du doigt	(A-7)	_____
Gestes descriptifs, conventionnels, instrumentaux ou informatifs	(A-8)	_____

Total Communication _____
("cut-off" pour l'*Autisme* = 5 ; "cut-off" pour les *Désordres du Spectre Autistique* = 3)

Interaction Sociale Réciproque

Contact visuel inhabituel	(B-1)	_____
Expressions faciales dirigées vers les autres	(B-2)	_____
Initiation spontanée de l'attention conjointe	(B-6)	_____
Qualité des ouvertures sociales	(B-8)	_____
Qualité de la réponse sociale	(B-9)	_____
Quantité de communication sociale réciproque	(B-10)	_____
Qualité générale de la relation	(B-11)	_____

Total Interaction Sociale _____
("cut-off" pour l'*Autisme* = 6 ; "cut-off" pour les *Désordres du Spectre Autistique* = 4)

Total Communication + Interaction Sociale _____
("cut-off" pour l'*Autisme* = 12 ; "cut-off" pour les *Désordres du Spectre Autistique* = 8)

Imagination/Créativité (C-2) _____

Comportements Stéréotypés et Intérêts Restreints

Intérêt sensoriel inhabituel pour le matériel de jeu/la personne	(D-1)	_____
Maniérismes des mains et des doigts et autres maniérismes complexes	(D-2)	_____
Intérêts inhabituellement répétitifs et comportements stéréotypés	(D-4)	_____

Total Comportements Stéréotypés et Intérêts Restreints _____

Diagnostic

Classification à l'ADOS : _____

Diagnostic général : _____

Copyright © 2003 by Western Psychological Services. Not to be reproduced in any form without written permission.
Copyright © 2008 by Editions Hogrefe France. Toute reproduction interdite. www.hogrefe.fr

Echelle SRS (Social ResponsivenessScale)

N°inclusion :…….

Date : ……

Remplie par : ☐ mère ☐ père ☐ autre *(préciser) :* ……

	NON	PARFOIS	SOUVENT	TOUJOURS
1. Semble être plus agité(e) dans des situations sociales /en société que seul	☐	☐	☐	☐
2. Les expressions de son visage ne correspondent pas avec ce qu'il/elle dit	☐	☐	☐	☐
3. Semble avoir confiance enlui/elle en présence d'autres personnes	☐	☐	☐	☐
4. En cas de stress, l'enfant semble se mettre en « pilotage automatique » (par exemple avec des comportements rigides ou inflexibles qui semblent étranges)	☐	☐	☐	☐
5. Ne sais pas voir quand les autres essaient de profiter de lui/elle	☐	☐	☐	☐
6. Aimerait mieux être seul(e) qu'avec les autres	☐	☐	☐	☐
7. A conscience de ce que les autres pensent ou ressentent	☐	☐	☐	☐
8. Se comporte de façon qui semble bizarre ou étrange	☐	☐	☐	☐
9. S'accroche aux adultes, semble trop dépendant d'eux	☐	☐	☐	☐
10. Incapable de de comprendre le moindre sens des conversations d'enfants plus âgés ou d'adultes	☐	☐	☐	☐
11. A confiance en lui/elle	☐	☐	☐	☐
12. Est capable de communiquer ses sentimentsenvers aux autres par des ou des gestes	☐	☐	☐	☐

	NON	PARFOIS	SOUVENT	TOUJOURS
13. Est lent(e) ou maladroit(e) dans les interactions à tour de rôle avec ses pairs	☐	☐	☐	☐
14. N'est pas bien coordonné dans les activités physiques	☐	☐	☐	☐
15. Est capable de comprendre le sens des tons de la voix ou des expressions faciales des autres personnes	☐	☐	☐	☐
16. Evite de regarder dans les yeux, a un contact visuel inhabituel	☐	☐	☐	☐
17. Reconnait quand quelque chose est injuste	☐	☐	☐	☐
18. Quand il est dans une cour de récréation ou dans un groupe avec d'autres jeunes enfants, l'enfant n'essaie pas de rentrer en intéraction avec les autres enfants	☐	☐	☐	☐
19. Est frustré(e) quand il essaie de faire passer ses idées dans une conversation	☐	☐	☐	☐
20. A une étrange façon de jouer avec ses jouets	☐	☐	☐	☐
21. Est capable d'imiter les actions des autres	☐	☐	☐	☐
22. Joue de façon appropriée avec les enfants de son âge	☐	☐	☐	☐
23. Ne se joint pas aux activités d'un groupe à moins qu'on le lui dise	☐	☐	☐	☐
24. A plus de difficultés que les autres enfants avec les changements de sa routine	☐	☐	☐	☐

	NON	PARFOIS	SOUVENT	TOUJOURS
25. Cela ne le/la dérange pas d'être en décalage ou de ne pas être « sur la même longueur d'onde » que les autres	☐	☐	☐	☐
26. Réconforte les autres quand ils sont tristes	☐	☐	☐	☐
27. Evite d'initier des interactions sociales avec ses pairs ou des adultes	☐	☐	☐	☐
28. Pense ou parle de la même chose encore et encore	☐	☐	☐	☐
29. Est perçu(e) par les autres comme étrange ou bizarre	☐	☐	☐	☐
30. Est contrarié(e) dans les situations où il y a beaucoup de choses qui arrivent	☐	☐	☐	☐
31. Est contrarié dans les situations où beaucoup de choses arrivent	☐	☐	☐	☐
32. Vous ne pouvez lui faire penser à autre chose quand il a une chose en tête	☐	☐	☐	☐
33. Veut être changé(e) quand ses couches ou sous-vêtements sont sales ou mouillés	☐	☐	☐	☐
34. Est socialement maladroit(e)	☐	☐	☐	☐
35. Evite les personnes qui veulent être émotionnellement proche de lui/elle	☐	☐	☐	☐
36. A du mal à maintenir le flot d'une interaction normale avec d'autres enfants	☐	☐	☐	☐
37. A des difficultés à être en relation avec les adultes	☐	☐	☐	☐
38. A des difficultés à être en relation avec les enfants de son âge	☐	☐	☐	☐

	NON	PARFOIS	SOUVENT	TOUJOURS
39. Réagit de façon appropriée aux changements d'humeur des autres (par exemple lorsqu'un ami ou camarade de jeu devient triste)	☐	☐	☐	☐
40. A un éventail de centres d'intérêts limités (ou exceptionnellement étroits)	☐	☐	☐	☐
41. Est imaginatif (ive), sait faire-semblant (sans perdre pied avec la réalité)	☐	☐	☐	☐
42. Erre sans but d'une activité à l'autre	☐	☐	☐	☐
43. Semble être trop sensible à des sons, des textures ou des odeurs	☐	☐	☐	☐
44. Se sépare facilement des accompagnants	☐	☐	☐	☐
45. Ne comprends pas comment les évènements sont liés les uns aux autres à la manière d'un enfant de son âge	☐	☐	☐	☐
46. Concentre son attention là au les autres regardent ou écoutent	☐	☐	☐	☐
47. A trop d'expressions faciales graves	☐	☐	☐	☐
48. Est trop décalé ou rit de façon inappropriée	☐	☐	☐	☐
49. A le sens de l'humour, comprend les blagues	☐	☐	☐	☐
50. Fait extrêmement bien certaines tâches, mais ne fait pas aussi bien la plupart des autres tâches	☐	☐	☐	☐
51. A des comportements étranges, répétitifs comme des battements des mains ou des balancements	☐	☐	☐	☐

	NON	PARFOIS	SOUVENT	TOUJOURS
52.Répond à des questions directes et claires d'une façon qui ne semble pas avoir de sens	☐	☐	☐	☐
53.Sait quand il/elle parle trop fort ou quand il fait trop de bruit	☐	☐	☐	☐
54. Parle aux autres avec un ton spécial (comme un robot, ou comme si il/elle lisait)	☐	☐	☐	☐
55.Semble réagir avec les gens comme s'ils étaient des objets	☐	☐	☐	☐
56. Sait quand il/elle est trop proche de quelqu'un ou quand il/elle envahit son espace /l'espace d'autrui	☐	☐	☐	☐
57. S'immisce brutalement entre deux personnes qui parlent	☐	☐	☐	☐
58.Les autres enfants n'aiment pas jouer avec lui/elle	☐	☐	☐	☐
59.Se concentre trop sur des détails plutôt que de voir l'ensemble (par exemple joue à faire tourner les roues d'une petite voiture mais ne la fait pas rouler comme une voiture, ou joue avec les cheveux d'une poupée sans jouer à la poupée)	☐	☐	☐	☐
60.Est trop suspicieux(se)	☐	☐	☐	☐
61.Est émotionnellement distant(e), ne montre pas ses émotions	☐	☐	☐	☐
62.Est inflexible, a du mal à changer d'avis	☐	☐	☐	☐
63.Donne des explications illogiques ou inhabituelles pour faire des choses	☐	☐	☐	☐

	NON	PARFOIS	SOUVENT	TOUJOURS
64.Touche les autres d'une façon inhabituelle (par exemple, l'enfant peut toucher quelqu'un juste pour entrer en contact et part alors sans rien dire)	☐	☐	☐	☐
65.Est trop tendu(e) en situations sociales	☐	☐	☐	☐
66. Fixe ou regarde ailleurs dans l'espace	☐	☐	☐	☐

Calcul du score :

<u>Items positifs :</u>
Non =0, parfois = 1, souvent =2, toujours=3
1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 41,42, 44, 46, 47, 49, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65

<u>Items inversées :</u>
Non =3, parfois = 2, souvent =1, toujours =0
3, 7, 11, 12, 15, 17, 21, 22, 26, 32, 38, 40, 43, 45, 48, 52, 55

Fiche n° 4 : Technique de dosage des anticorps anti-FR alpha "*blocking*" et "*binding*"

D'après Sequeira *et al.*, 2013

La technique de dosage des anticorps anti FRA bloquants (« blocking ») utilisée est radioimmunologique.

30 µL de sérum (sans folates) sont incubés toute la nuit à 4°C avec 0,01 M *Sodium phosphate buffer* contenant 0,5 % de Triton X-100 et 0,18 pmol de récepteur purifié dans un volume total de 500 µL. De l'acide folique marqué [3H] est ajouté puis le tout est incubé à température ambiante. L'acide folique [3H] libre est retiré avec du charbon et ensuite la radioactivité des complexes recepteur acide folique [3H] est mesurée. Le titre d'anticorps est calculé à partir de la différence de radioactivité. Les résultats des anticorps bloquants sont exprimés en picomoles de recepteur FRA bloqués par millilitre de sérum (Molloy *et al*., 2009).

Une technique ELISA est utilisée pour le dosage des anticorps anti-FRA liants *« binding ».* Des récepteurs au folates purifiés issus de lait de cache ou de placenta sont placés dans une plaque de 96 puits. Des aliquots de serum sans folates sont ajoutés et incubés une nuit à 4°C. La présence d'autoanticorps et détéctée grâce à la liaison avec des anticors biotinylés de chèvre dirigés contre les IgG humaines, suivi par l'ajout de complexe avidin-biotine-peroxydose et une réaction colorimétrique avec le tetraméthylbenzidine. Le titre d'autoanticorps est quantifié grâce au total d'IgG humaines ainsi capturés. Les autoanticorps liants (« binding ») sont exprimés en pmol d'IgG par millilitre de sérum.

Les taux d'anticorps anti-FR*alpha* sont interprétés comme bas, moyen ou haut (autoanticorps anti-FRA bloquants: négatif < 0,2, bas 0,2–0,5, moyen 0,5–1,0, haut > 1,0 picomoles de recepteur FRA bloqués par millilitre de serum; les anticorps liant FRA : négatif < 0,5, bas 0,5–2, moyen 2–10, haut > 10 exprimé en pmol/L d'anticorps IgA par ml de sérum).

Fiche n°5 : Dosage des vitamines B9 et B12 par RIA Technique adioisotopique, SimulTRAC-SNB[1]

Les concentrations de vitamine B12 et des folates sériques sont déterminées simultanément sur le même tube de prélèvement. Le test SimulTRAC est un dosage radio immunologique par compétition. La vitamine B12 ou les folates non marqués présents dans le sérum du patient entrent en compétition avec leurs homologues marqués sur le nombre restreint de sites de fixation disponibles sur l'agent de fixation (facteur intrinsèque de porc fixé, pour la B12 ; facteur de fixation purifié du lait de vache pour les folates. Les facteurs de fixations sont fixés sur un support solide). Le taux de radioactivité liée est donc inversement proportionnel à la concentration en B12 ou B9 de l'échantillon du patient.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fournisseur.

Les courbes d'étalonnages sont réalisées sur 6 points :
->Vitamine B12 (0, 74, 148, 296, 740 et 1480 picomolaire (pM)).
->Folates (0, 2,3, 4,5, 9,1, 23 et 45 nanomolaire (nM)).

- Déposer 200 µL de sérum dans un tube à hémolyse.
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/Dithiothréitol (DTT)[2], agiter.
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 100 µL de réactif d'extraction, vortexer.
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 1000 µL de réactif de liaison SimulTRAC-SNB, agiter.
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 60 min, à l'abri de la lumière.
- Centrifuger pendant 10 min à 1 000 g.
- Éliminer le surnageant.
- Compter la radioactivité du culot à l'aide d'un compteur gamma[3]

1. Kit ICN Pharmaceuticals, Inc, USA co_ret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals)
2. Dithiothréitol : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
3. FluostarGalaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Marne, France)
Compteur COBRA-IIrTMautogamma (Packard) à double canal
Coup total par minutes Cobalt 57 : 10.000-25.000
Coup total par minutes Iode 125 : 15.000-35.000

Fiche n°6 : Dosage de l'Hcy, MMA, SAM et SAH

L'homocystéine, l'acide méthylmalonique la SAM et la SAH sont quantifiés par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC Acquity® Waters) couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (4000QTrap® Sciex) en mode MRM (« multiple reaction monitoring ») développées dans le Service de Biochimie-Biologie Moléculaire- Nutrition du CHRU de Nancy. Les échantillons font l'objet d'un ajout de standards internes marqués par des isotopes stables et la quantification est faite par rapport à une gamme de calibration préparée sur chaque série.

Préparation du Standard interne dans une solution de DDT à 200 mM :

- Peser 154,25 mg DDT QSP 5ml H2O MilliQ dans un tube en polypropylène de 20 ml
- Mettre à dissoudre 10 min à l'ultrason
- Mettre 500 µL de la solution DTT à 200 mM (pour les Blancs réactif et échantillon) dans un tube de 1,5 ml
- Dans les 4,5 ml de DDT à 200 mM restants ajouter :
  D4_HCY 1 mM 150 µL 29,6 µM
  D3_MMA à 2 mM 5 µL 1,97 µM
  D3_SAM 1 Mm 5 µL 988 nM
  C5 SAH 5 µM 100 µL 98,8 nM

Préparation des gammes Standards : (Hcy-MMA-SAM-SAH) :

HCY 1 mM 100 µL
MMA à 1 mM 10 µL
SAM 1 mM dil 1/10 100 µM 10 µL
SAH 0,5 mM dil 1/10 50 µM 10 µL QSP 1 ml de plasma de la série précédente dont les résultats HCY et MMA ne sont pas trop élevés servant de matrice pour la gamme des standards

Faire ensuite une dilution de ½ en ½ dans le plasma restant jusqu'au STD 1

Gammes Standards:

HCY: 0,781-1,56-3,125-6,25;12,5; 25; 50; 100 µM

MMA : 0,0781; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10,0 µM

SAM : 7,81; 15,625; 31,25; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 ; 1000 nM

SAH : 3,91; 7,81 ; 15,625 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 nM

Préparation des échantillons :

	Blanc réactif	Blanc Echantillon	Standard S1 à S8	Contrôles	Echantillons
Echantillon	50 µL pool	50 µL plasma ayant servi à préparer les std	50 µL	50 µL	50 µL
Standard interne	0		50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL		0	0	0
Vortexer et incuber 15 min à température ambiante					
Méthamaol à 0,1% acide. Formique	100 µL		100 µL	100 µL	100 µL
Vortexer et incuber 30 min à + 4°C, puis vortexer et centrifuger 10 min à 15 000 rpm					

Passage sur le LC-MS/MS (plaque de 96 puits de 350 µL) :

- Distribuer en A1, 200µL H2O + 0,2 % Acide Formique
- Distribuer 100 µL H2O + 0,2 % Acide Formique dans les autres puits
- Ajouter 25 µL de chaque échantillon dans les puits correspondants (dilution 1/5e)
- Souder un film sur la plaque et mettre à agiter la plaque 5 min à 600 rpm
- Centrifuger la plaque 2 min à 1500 rcf (secteur Biologie Moléculaire)

Colonne : HSS T3 (c18 trifonctionnel-10 cm) Waters
Phases mobiles :
- A1 : H2O + 0,2% Acide Formique
- WEAK : H2O + 0,2% Acide Formique
- B1-STRONG : MeOH + 0,2% Acide Formique
- Soniquer les phases mobiles 10min pour dégazer

Analyse :
- Méthode UPLC Acquity: &ISO_2.80 MIN_95-5_ FL.method
- Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC SUCC_ISO_FL_H6.dam
à 2 périodes (MRM + pour HCY puis MRM – pour MMA)
- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qm

Fiche n° 7 : Données médicales recueillies dans le dossier médical à l'inclusion des patients dans l'étude EFFET

- Antécédents néonataux : terme à la naissance (en semaine d'aménorrhée), poids, taille, périmètre crânien et leur expression en déviations standards
- Prise en charge des troubles autistiques : école orthophonie, psychologue, psychomotricien… en nombre d'heures par semaine
- Consommation de produits laitiers : lait, yaourt, fromage... en nombre de portions par jour
- Supplémentation en acide folique pendant la grossesse et en début de grossesse
- Bilan génétique réalisé : X fragile, ACM, gènes impliqués dans l'autisme, conservation d'ADN (étude dans le cadre de l'étude de mécanisme moléculaire de l'autisme)

Fiche n°8: Questionnaire utilisé lors de l'appel à 12 semaines après la fin de traitement

CONTACT TELEPHONIQUE

12 semaines après la fin de l'intervention

Date : ……/…./……

Rempli avec la mère □, le père □, autre □

Depuis la fin du traitement, votre enfant a-t-il présenté :
-des problèmes médicaux depuis la fin du traitement :

□ OUI □ NON

Si oui décrire :
……
……
……

Une réaction allergique :

□ OUI □ NON

Si oui préciser (nature de la réaction, gravité…)
……
……
……..

Des modifications de son comportement :

□ OUI □ NON

Si oui préciser :
Agressivité □ OUI □ NON
Autres :
……
……
……..

Fiche n°9 : Extraction d'ADN sur prélèvement EDTA[1]

Après une étape de lyse et de déprotéinisation par le perchlorate de sodium, l'ADN est extrait par partition de phase en présence de chloroforme et d'une résine de type Nucleon qui a la propriété de former des liaisons covalentes de type imide avec les protéines. Après centrifugation, la résine et les protéines liées forment une couche semi-solide à l'interphase entre la phase supérieure organique contenant des protéines et la phase inférieure aqueuse contenant l'ADN.

- L'échantillon de sang (7 à 10 ml ; 0,5 ml au minimum) est prélevé sur tube EDTA (Acide Ethylène-Diamino-Tétra Acétique).

- A la réception du prélèvement de sang, le centrifuger pendant 10 minutes à 2000 g.

- A l'aide d'une pasteurpette stérile à usage unique, récupérer le plasma pour conservation à -20°C. De la même façon, récupérer ensuite l'interface de globules blancs et la transvaser dans un tube à hémolyse de 5 ml étiqueté au nom du patient.

- Les globules blancs ainsi récupérés peuvent servir tout de suite à l'extraction d'ADN ou être conservés à -20°C au maximum pendant 2 mois.

- Si nécessaire, décongeler à température ambiante le tube contenant l'anneau cellulaire de l'échantillon.
- Préparer la solution de travail de réactif A de concentration 1X : dans une bouteille en verre stérile, diluer 100 mL de réactif A de concentration 4X avec 300 mL d'eau milliQ. Après dilution, conserver la solution de travail à 4°C pendant 1 semaine.
- S'assurer que le réactif B est limpide. Dans le cas contraire, il est possible de le placer dans un bain marie à 37°C.
- Annoter un tube polypropylène conique avec le nom ou numéro de l'échantillon : pour un échantillon de moins de 2 mL utiliser un tube de 15 mL, pour un échantillon entre 2 et 5 mL utiliser un tube de 50 ml.
- Homogénéiser l'échantillon puis le verser dans le tube conique.
- Ajouter à l'échantillon 4 fois son volume de réactif A dilué.
- Homogénéiser à température ambiante sur roue d'agitation pendant 4 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 1300 g.
- Eliminer le surnageant grâce à la pompe à vide.
- Ajouter 1 mL de réactif A dilué.
- Si l'échantillon a été traité dans un tube conique de 50 mL, annoter de la même façon un tube conique de 15 mL et y transvaser l'échantillon.
- Placer le tube conique sur la glace pendant 5 minutes
- Centrifuger 5 minutes à 1300 g.
- Eliminer le surnageant grâce à la pompe à vide.
- Ajouter 1 mL de réactif B limpide.
- Agiter au vortex le tube jusqu'à dissolution complète du culot.
- Ajouter 250 µL de perchlorate de sodium, puis homogénéiser par inversion 7 fois.

- Sous la hotte, ajouter 1 mL de chloroforme, puis homogénéiser par inversion 7 fois.
- Agiter au vortex le flacon de résine jusqu'à la remise en suspension complète du réactif.
- Sous la hotte, ajouter 200 µL de résine vortexée.
- Centrifuger 5 minutes à 1300 g.
- Annoter un nouveau tube polypropylène de 15 mL.
- A l'aide d'une pipette P1000 et en prenant garde à ne pas perturber ou prélever l'interface, récupérer la phase supérieure (environ 2 mL) et la déposer dans le nouveau tube de 15 mL.
- Ajouter à la phase supérieure récupérée deux fois son volume d'éthanol absolu conservé à -20°C.
- Annoter un tube de 1,5 mL.
- Agiter le tube par retournements, puis à l'aide d'une spatule en plastique à usage unique, récupérer l'ADN précipité et le déposer dans un tube de 1,5 mL.
- Selon la taille du culot d'ADN, ajouter entre 100 et 1000µL de tampon Tris EDTA 1X, de façon à obtenir une solution finale à une concentration comprise entre 200 et 500 ng / µL.
- Laisser le culot d'ADN resuspendre sur agitateur rotatif à température ambiante pendant une nuit.

Fiche n°10 : Dosage d'ADN par Picogreen

Le PicoGreen est une molécule fluorescente spécifique de l'ADN double brin qui émet au delà de 500 nm.

1-Préparation d'une gamme standard

- Numéroter les 8 tubes d'une barrette de A à H
- Dans le tube A, diluer l'ADN Lambda standard pour obtenir 75 ng/µL dans un volume final de 233,3 µL. Mélanger par 10 cycles d'aspiration/refoulement.

- Utiliser cette formule pour calculer le volume d'ADN Lambda à ajouter dans le tube A :

$$\frac{(233{,}3\ \mu l)\ X\ (75\ ng/\mu l)}{\text{(concentration Lambda DNA standard)}} = \mu l\ \text{d'ADN Lambda standard à ajouter au tube A}$$

Exemple : pour un ADN standard à 100 ng/µL, prélever 175 µL d'ADN

- Utiliser cette formule pour calculer le volume de TE à ajouter dans le tube A :

µl de TE 1X à ajouter au tube A = 233,3 µl d'ADN Lambda standard dans le tube A

Exemple : pour un ADN standard à 100 ng/µL, prélever 58.3 µL de TE1X

- Ajouter 66,7 µL de TE dans le tube B.
- Ajouter 100 µL de TE dans les tubes C, D, E, F, G et H.
- Transférer 133,3 µL d'ADN Lambda dilué du tube A vers le tube B. Mélanger par 10 cycles d'aspiration/refoulement.
- Changer de pointe puis transférer 100 µL du tube B vers le tube C. Mélanger par 10 cycles d'aspiration/refoulement.
- Répéter pour les tubes D, E, F et G en changeant de pointe à chaque fois. Ne pas transférer du tube G vers le tube H. Le tube H est utilisé comme blanc 0 ng/µL d'ADN Lambda.

Tube	Concentration en ng/µL	Volume final en µL
A	75	100
B	50	100
C	25	100
D	12.5	100
E	6.25	100
F	3.125	100
G	1.5262	200
H	0	100

- Aliquoter la gamme obtenue en barettes de 10 µL et conserver à -20°C.

2. Dilution du Picogreen

- Dans un tube de 15 ou 50 mL en polypropylène, diluer le Picogreen au 1/200e dans du TE 1X :

Volume final = 195 x (nombre d'échantillons à doser + 8 puits pour la gamme)

(prévoir 1 ou plus échantillons supplémentaires)

3. Réalisation du dosage

Note : la concentration des échantillons doit être inférieure à 75 ng/µL, si nécessaire réaliser un premier dosage par spectromètre UV et une dilution des échantillons.

- Dans une plaque 96 puits opaque à fond plat, ajouter 195 µL de Picogreen dilué au 1/200e.
- Dans une des colonnes ajouter 2 µL de chacun des 8 puits de la gamme standard.
- Dans les autres puits ajouter 2 µL des échantillons à doser.
- Fermer la plaque avec un film adhésif.
- Agiter la plaque 1 minute à 1800 rpm.
- Centrifuger la plaque 1 minute à 350 g.

Fiche n°11 : Préparation de la librairie[1] et séquençage[2]

L'ensemble des étapes de la préparation de la librairie sont réalisées en suivant strictement les recommandations du fournisseur. Durée de la préparation de la libraire : trois jours.

En résumé :

Evaluation de la qualité de l'ADN

Le système SureSelectQXT nécessite des échantillons d'ADN de haute qualité pour des performances optimales. L'intégrité de l'ADNg extrait est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, dépôt de 500ng d'ADNg.

Fragmentation de l'ADN génomique et ajout des adaptateurs

L'ADNg (ng) est fragmenté par voie enzymatique et les adaptateurs sont ajoutés aux extrémités des fragments en une seule réaction grâce à l'action d'une transposase modifiée (tagmentase®). La qualité de la fragmentation de l'ADNg est ensuite vérifiée par électrophorèse capillaire (BionanalyserAgilent 20100®) qui évalue la qualité et quantité et la taille des fragments d'ADNg obtenus pour chaque patient. L'objectif de taille des fragments obtenus fixé par Agilent est entre 245-325bp.

Hybridation et capture

Etape ou les régions cibles de l'ADNg fragmenté vont s'hybrider aux sondes de captures SureSelect Focused Exome® Plus d'Agilent®. Il s'agit de sondes de type ARN biotinylées constituées d'oligonucléotides de 120 mers qui vont d'hybrider de façon complémentaire aux fragments d'ADN cibles, celles-ci vont ensuite être capturées grâce à des billes de streptavidine magnétiques.

Ajouts des index et primers

Les fragments d'ADN capturés subissent ensuite une étape d'amplification par PCR ou les index et les primers (qui vont permettre le séquençage) sont ajoutés à chaque extrémité des fragments. Les index contiennent une séquence de huits nucléotides et permettent par combinaison de deux index différents pour chaque patient, l'identification des fragments d'ADN pour le multiplexage. Une vérification de la qualité, taille et concentration de l'ADN a lieu à l'issu de cette étapepar électrophorèse capillaire (Bionanalyser Agilent 20100®, puce High Sensitivity). Les quantités d'ADNg ainsi préparés sont normalisées de façon à ce que la concentration finale des échantillons multiplexés soit de 4nM.

Dépôt sur la cellule de séquençage

Les échantillons des patients sont mélangés 3 par 3 (mulitplexage) pour chaque run de séquençage et déposés sur la cellule de séquençage (lame de verre dont la surface est recouverte d'oligonucléotides de séquence complémentaire à celle des adaptateurs placés aux extrémités des fragments d'ADN constituants la librairie).

1- SureSelectQXT Target Enrichment for Illumina MultiplexedSequencing (Agilent Technologies) MiSeq (Illumina)

Fiche n° 12 : Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

– Dans un microtube de 0,2 mL stérile à paroi fine, mélanger dans l'ordre :

	Volume	Concentration finale
H_2O ultra-pure stérile	34 µL	
Tampon PCR 10X[1]	5 µL	1X
$MgCl_2$ 25 mM	3 µL	1,5 mM
dNTP 10mM	1[3] µL	0,2 mM
Amorce sens (12 pmol/µL)	2,5 µL	0,24 µM
Amorce anti-sens (12 pmol/µL)	2,5 µL	0,24 µM
ADN génomique 50 ng/µL	1 µL	1 ng/µL
ADN polymérase 2,5U/µL	1 µL	2,5 U

– Programme PCR

		Température	**Durée**
	dénaturation initiale	95 °C	3 min
10 cycles	dénaturation	95 °C	30 sec
	hybridation	57 °C – 46°C*	30 sec
	élongation	72 °C	5 sec
dénaturation	95°C	30 sec	
20 cycles	hybridation	46°C	30 sec
	élongation	72°C	30 sec
	terminaison de la réaction	72 °C	7 min

* touchdown (diminution de 1°C/cycle de 57 à 46°C)

- Amorces utilisées pour la PCR

Gène	Variant	Amorce sens 5'→3'	Amorce sens 5'→3'
BHMT	rs763726268	ACAGGGCCAGGAAGGAATAC	AACCCCCTTTTCCGTATTTG
TCN2	rs35838082	CTTCTTCTCCAAGCCCTCCT	AGGGTCTCTTTCCCACCTGT
MMAA	rs148142853	GATGGCAGATCTGGTAGCTG	CACTCCGTCTTTGTCATGATTT
LRP2	rs137983840	GTGATGCCATTAGGCCACTC	CATTGTCCCCTTCCTTTTTC
FPGS	rs41306702	AATACCCTGCAGACCAATGC	CCAGTGACGTGGATGATGTT
GLI3	rs35364414	CCGTTGGTTGCAGTCTTTTT	CTTTCCCCAGGTGCTAATCA

1-Tampon Ampli*Taq*® 10X :Tris-HCl 100 mM (pH 8,3), KCl 500 mM (Applied Biosystems)
2-Ampli*Taq*® DNA Polymerase : 5 U/µL (Applied Biosystems)

Fiche n° 13 : Séquençage automatique de l'ADN par technique fluorescente[1]

Le principe général de cette technique repose sur un arrêt statistique de la réaction de polymérisation par des didésoxynucléotides (ddNTP)[(2)]. Les 4 ddNTP sont marqués par des fluorochromes différents (fluorescéine, NBD, rouge Texas et tétraméthylrhodamine) et incubés dans un même tube. Les brins d'ADN néosynthétisés sont séparés par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide. La migration se fait à front perdu et les ADN marqués sont identifiés en sortie de gel par un photomètre à laser couplé à un ordinateur.

I Réaction de séquençage

- Mélanger dans un microtube de 0,2 mL stérile :

ADN db	- 3-10 ng pour un **produit de PCR** purifié (200-500 pb)
Amorce[(3)] S ou AS	3,2 pmol
Terminator mix[(4)]	8,0 µL
H_2O ultrapure	qsp 20 µL

- Programme d'amplification :

		Température	Durée
25 cycles	dénaturation	96 °C	30 sec
	hybridation	50 °C	15 sec
	élongation	60 °C	4 min

II Purification des produits de séquençage - Sephadex G50

Cette étape a pour but de purifier les produits de la réaction de séquençage par gel d'exclusion. La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dessaler les échantillons, d'éliminer les nucléotides non incorporés (les ddNTP marqués par un fluorochrome) et l'amorce utilisée pour la PCR de séquence présente en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 correspond à un oligonucléotide d'environ 20 bases.

2-1-Préparation de la plaque de G50

- Retourner la plaque MultiScreen HV. Coller un film aluminium autocollant en dessous de la plaque Multiscreen de façon à bien protéger la membrane de chaque puits.
- Déposer de la résine Sephadex® G 50 dans chaque puits du chargeur de colonne,
- Retirer l'excès de résine sur le chargeur de colonne avec la raclette et récupérer l'excès de résine dans le pot stock,
- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble,
- Taper légèrement sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.
- Ajouter 300 µl d'eau ultra pure dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque MultiScreen HV avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à 4°C.

Les plaques MultiScreen HV contenant de la résine Sephadex® G 50 imbibée d'eau peuvent être stockées à 4 °C pendant 2 semaines.

2-2-Tassement de la colonne avant la première utilisation de la plaque de G50

- Masquer avec un film aluminium les puits qui ne vont pas être utilisés.
- Sans retourner la plaque Multiscreen, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés. Placer la plaque de filtration Multiscreen HV sur la plaque de récupération de 350 µL.
- Centrifuger le montage à 910 g pendant 5 min. Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques.

2-3-Purification

- Ajuster le volume de la réaction de séquençage à 20 µl à l'aide d'eau ultra pure.
- Déposer la plaque de filtration Multiscreen HV sur une plaque neuve 96 puits transparente à fond conique de 250 µL.
- Déposer les 20 µl de produits de séquençage au centre de chaque puits de la plaque de filtration, sans toucher les bords ni la résine.
- Centrifuger à 910 g pendant 4 min.

III Séquençage automatique

Réalisé par le Service Commun de Biologie Moléculaire du CHRU de Nancy, sur un séquenceur ABI 373A piloté par le logiciel SequencingAnalysis Software v. 1.2.1 (PE Biosystems).

1- ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit avec l'Ampli*Taq*® DNA Polymerase, FS (Perkin Elmer)

2- Sanger *et al*. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** : 5463-5467

3- Amorce spécifique du produit de PCR (séquençage direct),

4-Terminator premix : (A/G/C/T)-DyeDeoxy Terminator, dITP, dATP, dCTP, dTTP dans tampon Tris-HCl (pH 9,0) contenant du $MgCl_2$ et l'Ampli*Taq*® DNA polymerase, FS. Cette *Taq* ADN polymérase est une forme mutée à l'activité 5→3' exonucléase négligeable et qui ne fait quasiment plus de discrimination entre les ddNTP fluorescents et les dNTP

Fiche n°14 : Bisulfitation de l'ADN[1]

Cette technique consiste à traiter l'ADN génomique avec du bisulfite, qui convertit les résidus cytosines non méthylés en uracile. Les cytosines méthylées restent inchangées pendant le traitement.
Les recommandations du fournisseur sont strictement suivies.

1. Ajoutez 5 µl de tampon de dilution M à l'échantillon d'ADN (600 ng) et ajustez le volume total à 50 µl avec de l'eau. Mélanger l'échantillon en pipetant.
2. Incuber l'échantillon à 37 ° C pendant 15 min.
3. Après l'incubation, ajouter 100 µl du réactif de conversion CT à chaque échantillon et mélanger.
4. Incubation selon les recommandations d'utilisation du test Illumina Infinium® Methylation (95 ° C pendant 30 s, 50 ° C pendant 60 min) x 16 cycles, puis maintient à 4 °C.
5. Incuber l'échantillon à une température de 0 à 4 °C (sur de la glace) pendant 10 minutes. Les échantillons peuvent être conservés à 4°C jusqu'à 20 h.
6. Ajoutez 400 µl de tampon « MBinding » sur une colonne CI Zymo-Spin ™
7. Chargez l'échantillon (de l'étape 5) sur la colonne CI Zymo-Spin ™ contenant le tampon « MBinding ». Fermer le capuchon et mélanger en inversant la colonne plusieurs fois.
8. Centrifuger à pleine vitesse (> 10 000 x g) pendant 30 secondes. Eliminer l'éluat.
9. Ajoutez 100 µl de tampon « M-Wash » à la colonne. Centrifuger à pleine vitesse 30s.
10. Ajouter 200 µl de tampon de désulfonation (« M-Desulphonation Buffer ») sur la colonne et laisser incuber 20 min entre 20 à 30 °C Après incubation, centrifuger à plein vitesse pendant 30 s.
11. Ajouter 200 µl de tampon « M-Wash » dans la colonne. Centrifuger à pleine vitesse 30s. Ajouter 200 µl de tampon « M-Wash » et centrifuger pendant 30 s supplémentaires.
12. Placez la colonne dans un tube à centrifuger de 1,5 ml. Ajouter 12 µl de tampon d'élution « M-Elution-Buffer »sur la colonne. Centrifuger pendant 30 s à pleine vitesse pour éluer l'ADN.

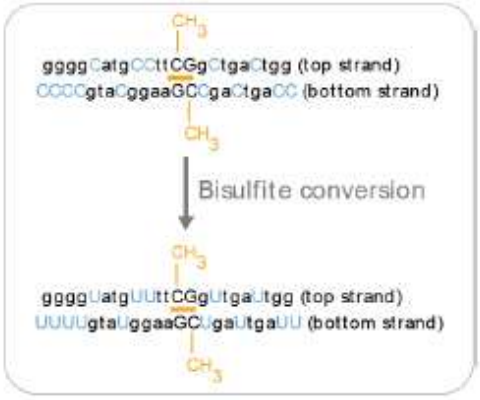
1- EZ DNA Methylation kit (ZymoResearch)

Fiche n°15: Etude pangénomique du méthylome de l'ADN génomique

L'ensemble des étapes de l'analyse sont réalisées en suivent strictement les recommandations du fournisseur. L'ensemble de la procédure d'analyse dure trois jours.

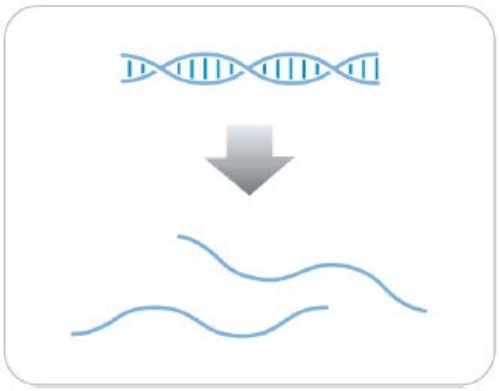
La puce « HumanMethylation 450 » est constituée de 485 577 sondes dont 485 512 mesurent la méthylation de cytosines ainsi réparties: 482 421 sur des sites CpG, 3 091 sur des sites CNG (N pouvant être un G, C, A ou T). La puce couvre 99 % des gènes RefSeq, avec une moyenne de 17 sites CpG par région du gène répartis sur le promoteur, le 5'UTR, le premier exon, le gènecorps, et 3'UTR. Il couvre 96% des îlots CpG, avec une couverture supplémentaire sur les « isletshores » et les régions flanquantes.
La puce contient également 65 sondes conçues pour mesurer non pas la méthylation mais la présence de SNPs (*Single-NucleotidePolymorphism* ou polymorphisme d'un seul nucléotide) sélectionnés aléatoirement qui servent de contrôle qualité notamment pour vérifier que les allèles détectés avec la puce HM450k correspondent bien à ceux détectés avec une autre méthode de génotypage.).
850 sondes de contrôles sont incluses pour permettre d'évaluer différents critères de performances du déroulement des différentes étapes réactionnelles.

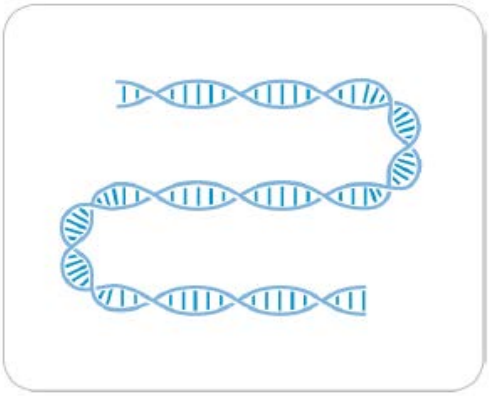
1- Conversion de l'ADN par le bisulfite (fiche n°13)



Les cystosines non-méthylées sont convertis en uraciles, contrairement au cystosinesméthylées qui restent inchangées.

2- Amplification de l'ADN

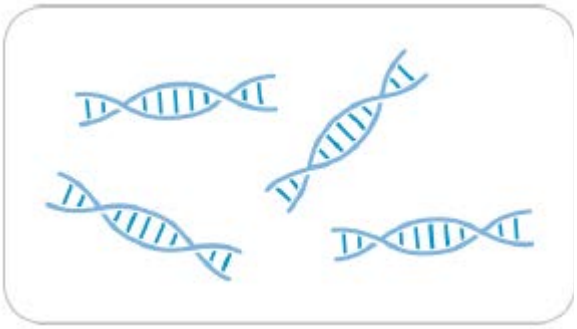




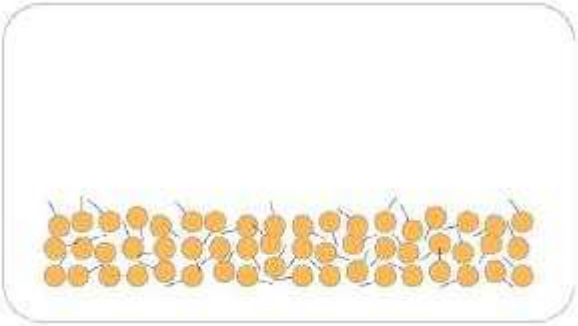
Dénaturation et neutralisation de l'échantillon

L'ADN dénaturé est amplifié de manière isothermique en une étape d'une nuit. L'amplification du génome entier augmente uniformément la quantité de l'échantillon d'ADN de plusieurs milliers de foissans biais d'amplification significatif.

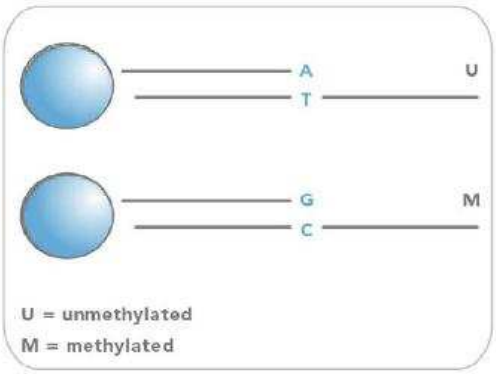
3- Fragmentation et précipitation de l'ADN



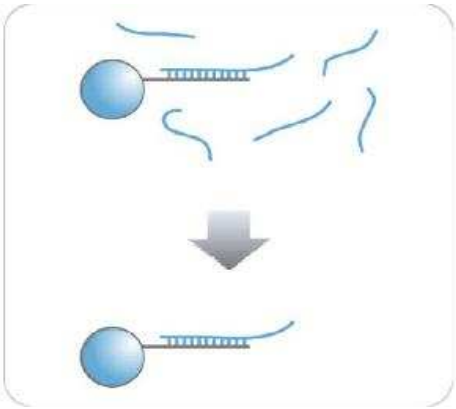
L'ADN est fragmenté par digestion enzymatique dans des conditions contrôlées pour éviter la surfragmentation.



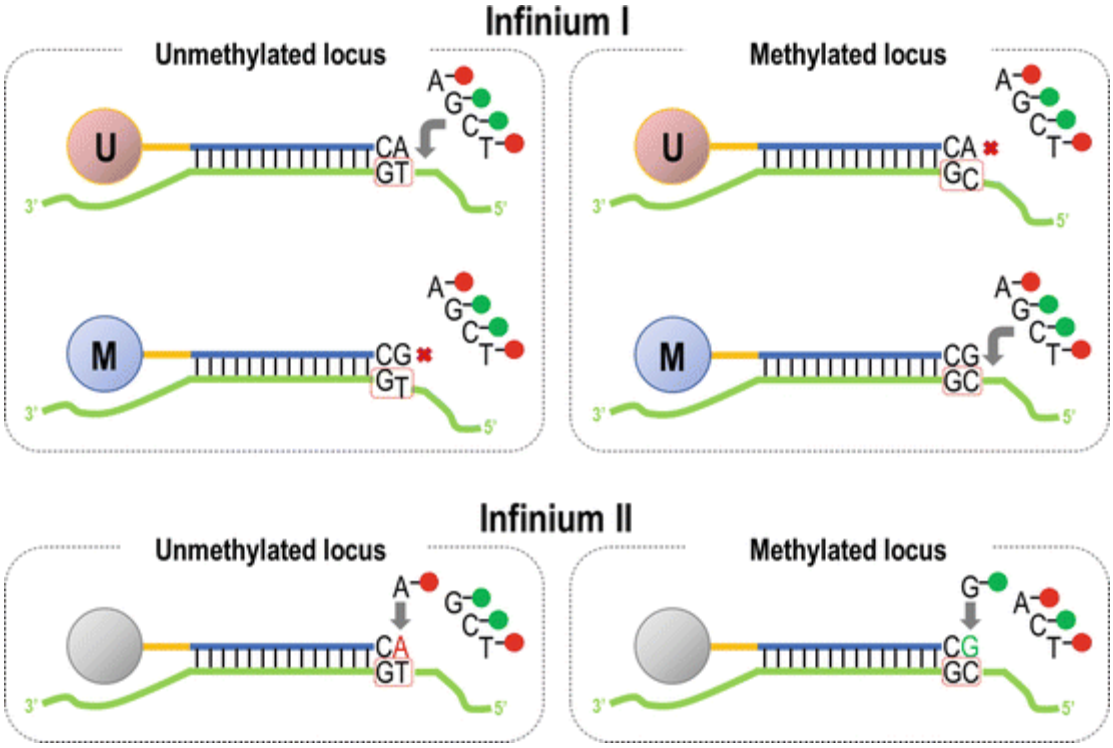
L'ADN est précipité en présence d'isopropanol.



L'ADN fragmentés, remis en suspension, est déposé sur la puce (12 échantillons par puces) et incubé au moins 16h à 48°C dans le four d'hybridation. Les fragments d'ADN amplifiés et fragmentés s'hybrident en fonction de la spécificité du locus à des oligonucléotides de 50 mers liées de manière covalente à l'une des billes. Il existe deux types de billes : Billes Infinium I: un type de billes correspond à méthylé (C), un autre type de billes à l'état non méthylé (T) du site CpG. Billes Infinium II : Un type de bille correspond à chaque locus CpG.



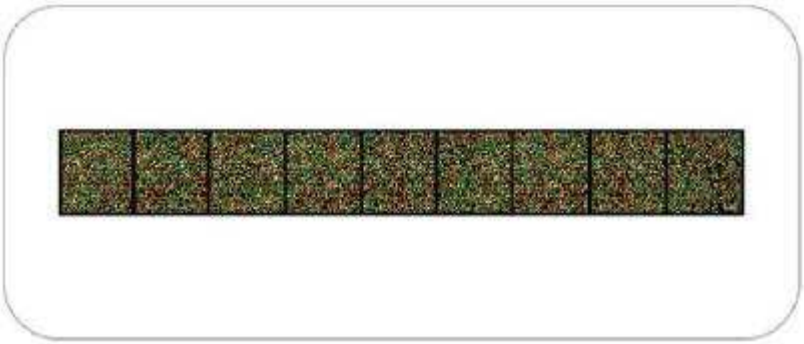
L'ADN non-hybridé ou hybridé de façon non-spécifique est éliminé par lavages.



Une spécificité parfaite entre l'oligonucléotide et le fragment d'ADN permet l'ajout d'un simple base marquée qui pourra être détecte après amplification du signal par méthode setwich.

6-Lecture de la puce

Le système iScan utilise le laser pour exciter le fluorophore du produit d'extension sur les billes. Le scanner enregistre en haute résolution l'image de la lumière émise par les fluorophores.



Fiche n°16 : Liste de gènes sélectionnés pour le métabolisme des folates et monocarbones

Symbole	Nom	Localisation
AHCY	*Adenosylhomocysteinase*	20q11.22
ALDH1L1	*Aldehyde dehydrogenase 1 familymember L1*	3q21.3
ALDH1A2	*aldehyde dehydrogenase 1 family member A2*	15q21.3
AMD1	*Adenosyl methioninedecarboxylase 1*	6q21
BHMT	*betaine--homocysteineS-methyltransferase*	5q14.1
BHMT2	*betaine--homocysteineS-methyltransferase 2*	5q14.1
CBS	*cystathionine-beta-synthase*	21q22.3
CHKA	*choline kinase alpha*	11q13.2
COQ3	*coenzyme Q3.methyltransferase*	6q16.2
CTH	*Cystathionine gamma-lyase*	1p31.1
VSIG2	*V-set et immunoglobulin domain containing 2*	11q24.2
CUBN	*Cubilin*	10p13
DHFR	*Dihydrofolat reductase*	5q14.1
DNMT1	*DNA Methyltransferase 1*	19p13.2
FOLR1	*folate receptor 1*	11q13.4
FOLR2	*folate receptor 2*	11q13.4
FOLR3	*folate receptor 3*	11q13.4
FPGS	*Folylpolyglutamate synthase*	9q34.11
FTCD	*Formimidoyltransferasecyclodeaminase*	21q22.3
GIF	*GastricIntrinsic Factor*	11q12.1
GAMT	*GuanidinoacetateN-methyltransferase*	19p13.3

Symbole	Nom	Localisation
GART	*Phosphoribosylglycinamideformyltransferase*	21q22.11
GGH	*gamma-glutamyl hydrolase*	8q12.3
ICMT	*Isoprenylcysteinecarboxylmethyltransferase*	1p36.31
MAT1A	*Methionineadenosyltransferase 1A*	10q22.3
MAT2A	*Methionineadenosyltransferase 2A*	2p11.2
MGMT	*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*	10q26.3
MMAA	*Methylmalonic Aciduria (Cobalamin Deficiency) CblA Type*	4q31.21
MTFMT	*Mitochondrial Methionyl-TRNAFormyltransferase*	15q22.31
MTHFD1	*Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase*	14q23.3
MTHFD2	*Methylenete trahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2.*	2p13.1
MTHFR	*Methylene tetrahydrofolatereductase*	1p36.22
MTHFS	*Methenyltetrahydrofolatesynthetase*	15q25.1
MTR	*5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase*	1q43
MTRR	*5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferasereductase*	5p15.31
MUT	*methylmalonyl-CoAmutase*	6p12.3
NAT1	*N-acetyltransferase 1*	8p22
SLC6A2	*solute carrier family 6 member 2*	16q12.2
EIF4G2	*eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2*	11p15.4
NAT2	*N-acetyltransferase 2*	8p22
SLC38A1	*solute carrier family 38 member 1*	12q13.11

Symbole	Nom	Localisation
NNMT	*nicotinamide N-methyltransferase*	11q23.1
NOS1	*Nitricoxidesynthase 1*	12q24.22
NANOS1	*nanos C2HC-type zinc finger 1*	10q26.11
NOS2	*Nitricoxidesynthase 2*	17q11.2
NANOS2	*nanos C2HC-type zinc finger 2*	19q13.32
NOS3	*nitricoxidesynthase 3*	7q36.1
NANOS3	*nanos C2HC-type zinc finger 3*	19p13.13
PCMT1	*protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase*	6q25.1
PEMT	*phosphatidylethanolamineN-methyltransferase*	17p11.2
PRMT1	*protein arginine methyltransferase 1*	19q13.33
PRMT2	*protein arginine methyltransferase 2*	21q22.3
PCYT1A	*phosphate cytidylyltransferase 1. choline. alpha*	3q29
RNMT	*RNA guanine-7 methyltransferase*	18p11.21
SARDH	*Sarcosinedehydrogenase*	9q34.2
SHMT2	*serine hydroxymethyltransferase 2*	12q12-q14
SHMT1	*serine hydroxymethyltransferase 1*	17p11.2
TCN2	*transcobalamin 2*	22q12.2
TYMS	*thymidylatesynthetase*	18q11.32

Fiche n°17: Liste de gènes impliqués dans l'embryogénèse du tube neural (non impliqués dans le métabolisme des monocarbones) et associés au risque de NTD

Planar Cell Polarity		
CELSR1	*cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1*	22q13.31
DVL1	*dishevelled segment polarityprotein 1*	1p36.33
DVL2	*dishevelled segment polarityprotein 2*	17p13.1
DVL3	*dishevelled segment polarityprotein 3*	3q27.1
FZD6	*frizzled class receptor 6*	8q22.3
SCRIB	*scribbled planar cell polarity protein*	8q24.3
SEC24B	*SEC24 homolog B. COPII coatcomplex component*	4q25
VANGL1	*VANGL planar cell polarity protein 1*	1p13.1
VANGL2	*VANGL planar cell polarity protein 2*	1q23.2
DACT1	*dishevelled binding antagonist of beta catenin 1*	14q23.1
PRICKLE1	*prickle planar cell polarity protein 1*	12q12
FUZ	*fuzzy planar cell polarity protein*	19q13.33
WNT5A	*Wntfamilymember 5A*	3p14.3
PTK7	*protein tyrosine kinase 7 (inactive)*	6p21.1
SMURF1	*SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1*	7q22.1
SMURF2	*SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2*	17q23.3-q24.1
Sonic Hedgehog		
GLI2	*GLI family zinc finger 2*	2q14.2
GLI3	*GLI family zinc finger 3*	7p14.1
SMO	*smoothened.frizzled class receptor*	7q32.1
SMOX	*spermine oxidase*	20p13
SUFU	*SUFU negative regulator of hedgehog signaling*	10q24.32
Retinoic acid metabolism		
ALDH1A2	*aldehyde dehydrogenase 1 family member A2*	15q21.3
CRABP1	*cellular retinoic acid binding protein 1*	15q25.1
CRABP2	*cellular retinoic acid binding protein 2*	1q23.1
CYP26A1	*cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1*	10q23.33
CYP26B1	*cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1*	2p13.2
Oxydative stress		
CAT	*Catalase*	11p13
SOD2	*Superoxidedismutase 2*	6q25.3
Glucose metabolism		
GAPDH	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*	12p13.31
SLC2A2	*solute carrier family 2 member 2*	3q26.2
SLC2A4	*solute carrier family 2 member 4*	17p13.1
HK1	*hexokinase 1*	10q22.1
KCNA4	*potassium voltage-gated channel subfamily A member 4*	11p14.1
HOOK1	*hook microtubule tetheringprotein 1*	1p32.1
HK2	*hexokinase 2*	2p12
KCNA5	*potassium voltage-gated channel subfamily A member 5*	12p13.32
KIF2A	*Kinesinfamilymember 2A*	5q12.1
HOOK2	*hook microtubule tetheringprotein 2*	19p13.13
INS	*Insulin*	11p15.5
INSR	*Insulinreceptor*	19p13.2
LEP	*Leptin*	7q32.1
LEPR	*Leptinreceptor*	1p31.3
Cellular adhesion		
NCAM1	neural celladhesionmolecule 1	11q23.2
SHROOM1.2.3.4	ShroomFamilymember 1.2.3.4	
Animal models		
BRCA1	*BRCA1. DNA repairassociated*	17q21.31
CFL1	*cofilin 1*	11q13.1
CITED2	*Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 2*	6q24.1
PAX3	*paired box 3*	2q36.1
PDGFRA	*platelet derived growth factor receptor alpha*	4q12
PRKACA	*protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha*	19p13.1
PRKACB	*protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta*	1p31.1
TXN2	*thioredoxin 2*	22q12.3
ZIC1	*Zicfamilymember 1*	3q24
ZIC2	*Zicfamilymember 2*	13q32.3
ZIC3	*Zicfamilymember 3*	Xq26.3
TBXT	*T-box transcription factor T*	6q27
OGG1	*8-oxoguanine DNA glycosylase*	3p25.3
ERCC2	*ERCC excision repair 2. TFIIH corecomplexhelicasesubunit*	19q13.32
XRCC1	*X-ray repair cross complementing 1*	19q13.2
XRCC3	*X-ray repair cross complementing 3*	14q32.3

Fiche n°18: Détail des beta-value du patient S27 en comparaison avec les contrôles pour les locus *TTC40*, *LINC01166* (alias, *LOC101927590*), et *LINC01168* (alias, *LOC399829*)

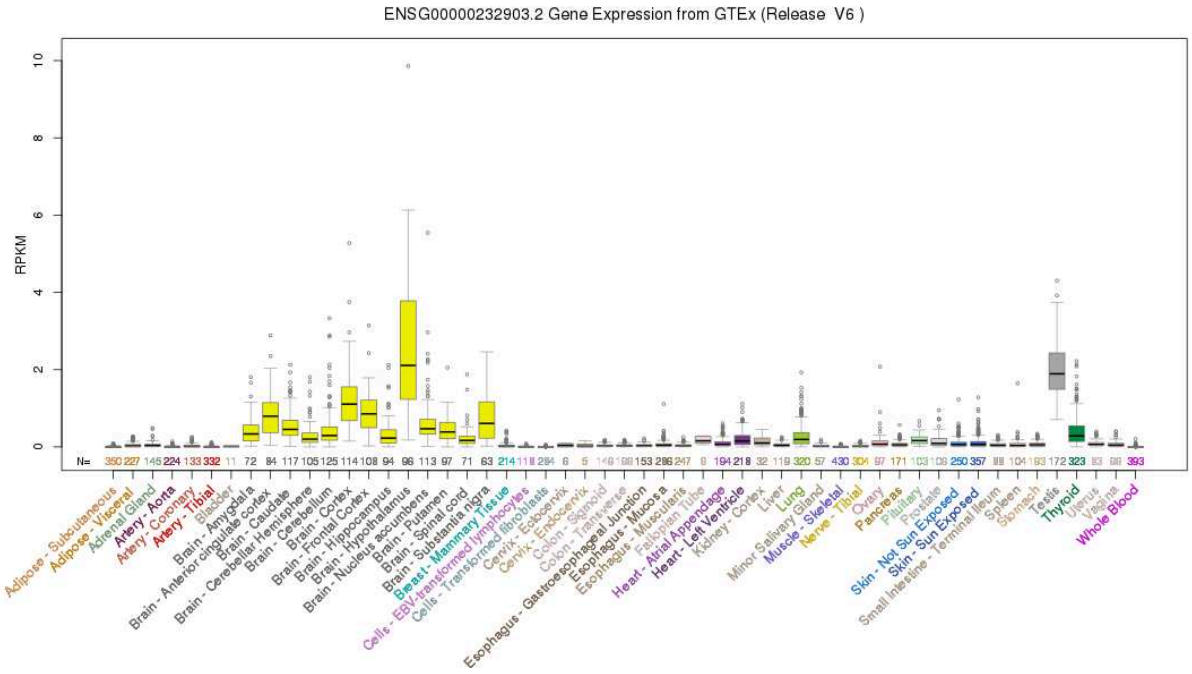
Chromosome	Position	CpG	Gene Name	Minor epi-allele Frequency*	Average β S27	Average β (Controls)	*t*-test *P*-value	*t*-test -log10 *P*-value	Smooth value
10	134621945	cg09753644	***TTC40***	0.066	0.59	0.64	5.41E-01	0.27	0.29
10	134622019	cg26365014	***TTC40***	0.017	0.63	0.68	5.37E-01	0.27	0.28
10	134622487	cg19100900	***TTC40***	0.003	0.73	0.79	2.14E-01	0.67	0.29
10	134622540	cg14923370	***TTC40***	0.001	0.74	0.79	4.92E-01	0.31	0.28
10	134622602	cg17301379	***TTC40***	0.001	0.85	0.88	7.27E-01	0.14	0.27
10	134624132	cg20497668	***TTC40***	0.006	0.73	0.76	6.77E-01	0.17	0.24
10	134628045	cg14126600	***TTC40***	0.001	0.81	0.83	6.97E-01	0.16	0.14
10	134639821	cg03934443	***TTC40***	0.023	0.67	0.64	6.39E-01	0.19	0.12
10	134641582	cg26797529	***TTC40***	0.001	0.86	0.86	9.45E-01	0.02	0.16
10	134645960	cg23908771	***TTC40***	0.001	0.77	0.77	9.78E-01	0.01	0.18
10	134646282	cg18980036	***TTC40***	0.003	0.92	0.88	6.73E-01	0.17	0.17
10	134647259	cg25979994	***TTC40***	0.001	0.83	0.86	3.79E-01	0.42	0.18
10	134647457	cg02562387	***TTC40***	0.006	0.84	0.81	5.49E-01	0.26	0.25
10	134650467	cg25403174	***TTC40***	0.056	0.11	0.12	7.79E-01	0.11	0.34
10	134652760	cg02210222	***TTC40***	0.004	0.75	0.80	5.11E-01	0.29	0.38
10	134662206	cg11426080	***TTC40***	0.039	0.10	0.09	3.09E-01	0.51	0.35
10	134672797	cg07498088	***TTC40***	0.291	0.84	0.61	2.28E-01	0.64	0.35
10	134692616	cg05423768	***TTC40***	0.001	0.77	0.81	3.76E-01	0.42	0.36
10	134692852	cg17481047	***TTC40***	0.079	0.12	0.15	5.68E-01	0.25	0.36
10	134697042	cg08681409	***TTC40***	0.004	0.69	0.74	6.11E-01	0.21	0.41
10	134697093	cg00232816	***TTC40***	0.013	0.63	0.67	6.43E-01	0.19	0.38
10	134697771	cg04496042	***TTC40***	0.006	0.79	0.76	5.48E-01	0.26	0.40
10	134697862	cg19652416	***TTC40***	0.014	0.63	0.74	1.29E-01	0.89	0.39
10	134700254	cg19963839	***TTC40***	0.103	0.55	0.63	3.56E-01	0.45	0.40
10	134703407	cg04718304	***TTC40***	0.003	0.76	0.84	2.72E-01	0.57	0.38

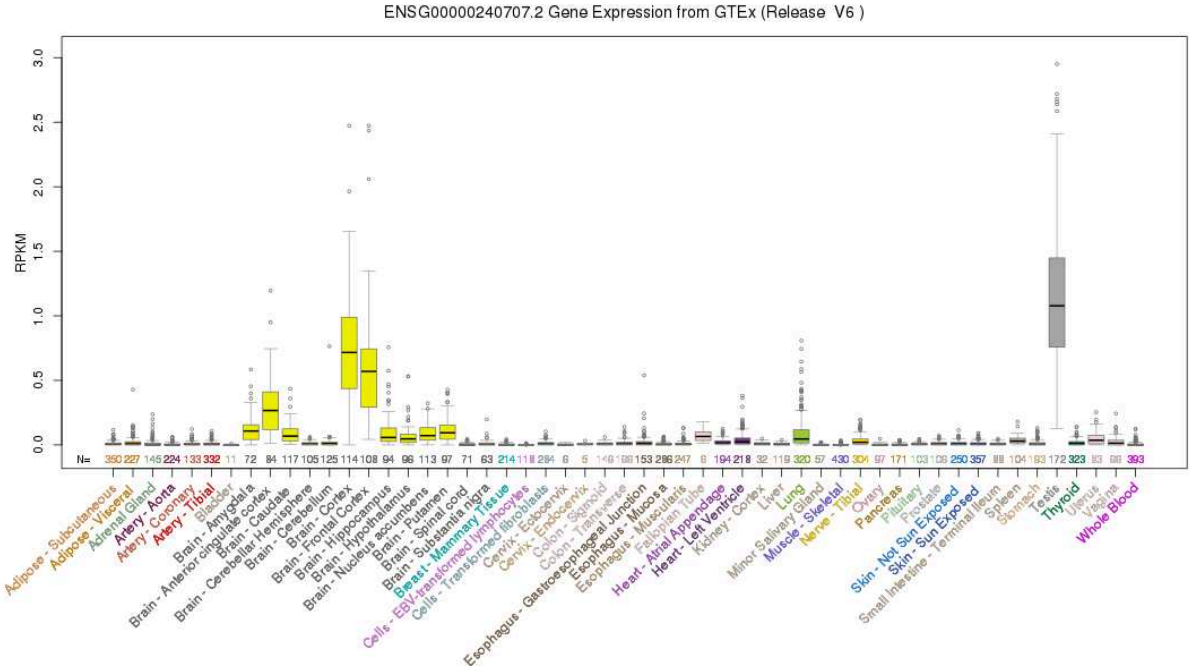
10	134716879	cg04155450	***TTC40***	0.001	0.89	0.90	7.26E-01	0.14	0.41
10	134720057	cg02836233	***TTC40***	0.063	0.94	0.74	5.16E-01	0.29	0.51
10	134724823	cg23693569	***TTC40***	0.026	0.83	0.84	8.13E-01	0.09	0.52
10	134725087	cg18048370	***TTC40***	0.040	0.57	0.61	3.59E-01	0.44	0.50
10	134726665	cg11860238	***TTC40***	0.009	0.91	0.93	2.66E-02	1.57	0.54
10	134726771	cg12319143	***TTC40***	0.119	0.69	0.79	2.79E-01	0.56	0.55
10	134727319	cg22716280	***TTC40***	0.078	0.66	0.76	3.98E-01	0.40	0.57
10	134729332	cg16817435	***TTC40***	0.120	0.82	0.61	3.79E-01	0.42	0.54
10	134730258	cg00676833	***TTC40***	0.063	0.62	0.65	4.66E-01	0.33	0.33
10	134735452	cg16740640	***TTC40***	0.001	0.98	0.97	5.85E-01	0.23	0.31
10	134737191	cg15930085	***TTC40***	0.001	0.87	0.82	5.60E-01	0.25	0.31
10	134739369	cg20654875	***TTC40***	0.001	0.87	0.87	8.01E-01	0.10	0.27
10	134741998	cg02713180	***TTC40***	0.001	0.64	0.69	3.53E-01	0.45	0.23
10	134752049	cg11360416	***TTC40***	0.092	0.15	0.11	4.34E-01	0.36	0.27
10	134752183	cg06579154	***TTC40***	0.060	0.16	0.14	6.98E-01	0.16	0.32
10	134752472	cg13289827	***TTC40***	0.160	0.59	0.60	9.04E-01	0.04	0.49
10	134754286	cg24626659	***TTC40***	0.001	0.74	0.83	2.87E-01	0.54	0.49
10	134754396	cg24411972	***TTC40***	0.001	0.70	0.74	2.61E-01	0.58	0.44
10	134755862	cg25745697	***TTC40***	0.013	0.13	0.09	5.41E-02	1.27	0.44
10	134755955	cg23962250	***TTC40***	0.004	0.04	0.03	3.32E-01	0.48	0.52
10	134756306	cg07421032	***intergenic***	0.004	0.15	0.15	9.86E-01	0.01	0.61
10	134756503	cg03354772	***intergenic***	0.153	0.21	0.19	7.20E-01	0.14	0.71
10	134756610	cg08325191	***intergenic***	0.073	0.05	0.11	2.24E-01	0.65	0.73
10	134756994	cg17000480	***intergenic***	0.081	0.58	0.72	7.13E-02	1.15	1.26
10	134771944	cg26094990	***LOC101927590***	0.001	0.75	0.78	5.16E-02	1.29	2.04
10	134772029	cg12559997	***LOC101927590***	0.024	0.56	0.69	4.23E-02	1.37	2.86
10	**134775542**	**cg01263624**	***LOC101927590***	0.023	**0.30**	**0.10**	**6.41E-05**	**4.19**	**3.57**
10	**134775610**	**cg00912926**	***LOC101927590***	0.042	**0.49**	**0.13**	**3.43E-06**	**5.47**	**3.86**
10	**134775949**	**cg23987897**	***LOC101927590***	0.027	**0.40**	**0.06**	**1.23E-06**	**5.91**	**4.10**
10	**134776050**	**cg17693826**	***LOC101927590***	0.020	**0.31**	**0.02**	**2.41E-06**	**5.62**	**3.94**
10	134778467	cg24680439	***LOC101927590***	0.149	0.24	0.62	6.69E-04	3.17	3.34

10	134778648	cg02276826	***LOC101927590***	0.101	0.41	0.67	1.12E-03	2.95	2.56
10	134785521	cg00056497	***LOC399829***	0.177	0.50	0.58	5.43E-01	0.27	1.80
10	134789042	cg25295723	***LOC399829***	0.001	0.75	0.75	9.66E-01	0.02	1.09
10	134789568	cg12065779	***LOC399829***	0.013	0.14	0.14	9.80E-01	0.01	0.64
10	134791043	cg16756674	***intergenic***	0.004	0.69	0.74	2.58E-01	0.59	0.30
10	134791323	cg03753683	***intergenic***	0.121	0.56	0.65	2.48E-01	0.61	0.30
10	134791352	cg02006950	***intergenic***	0.046	0.80	0.78	9.19E-01	0.04	0.33
10	134791450	cg09784428	***intergenic***	0.029	0.63	0.74	2.62E-01	0.58	0.35

* Minor epi-allele frequencies were calculated on the MARTHA cohort methylome dataset [PMID: 24630777]

Fiche n° 19 : Données d'expression des 2 LINC : *LINC01166* et *LINC01168* issue de GTEx *(Genotype Tissue Expression Project* (GTEx) (gtexportal.org)





VII. Article soumis

Exome sequencing of cases with neural tube defects identifies candidate genes involved in one-carbon/vitamin B12 metabolisms and Sonic Hedgehog pathway

Running title: genetic prediction of NTD risk

Emeline Renard[1,2,*], Céline Chery[1,3,*], Abderrahim Oussalah[1,3,*], Thomas Josse[3], Pascal Perrin[3], Denise Tramoy[3], Jimmy Voirin[1], Olivier Klein[4], Bruno Leheup[1,2], François Feillet[1,2], Rosa-Maria Guéant-Rodriguez[1,3], and Jean-Louis Guéant[1,3]

Corresponding author: Professor Jean-Louis Guéant, MD, DSc, AGAF. INSERM U1256, NGERE – Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure, Faculty of Medicine of Nancy, University of Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54000, France. Phone: + 33 3 83 68 32 71; Fax: + 33 3 83 68 32 79; E-mail: jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

Author affiliations

[1]INSERM U1256, NGERE – Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure, Faculty of Medicine of Nancy, University of Lorraine, Nancy (Vandoeuvre), F-54000, France;

[2]Department of Pediatrics, University Hospital of Nancy, Nancy (Vandoeuvre), F-54000, France;

[3]Department of Molecular Medicine and Personalized Therapeutics, Department of Biochemistry, Molecular Biology, Nutrition, and Metabolism, University Hospital of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54000, France;

[4]Department of Pediatric Surgery, University Hospital of Nancy, Nancy (Vandoeuvre), F-54000, France.

*Equal contribution

Word count: 3490 words

ABSTRACT

The Neural tube defects (NTD) result from complex mechanisms between genes, nutrition and environment. The identification of genetic predictors by genome exome sequencing and their influence on genome methylation need further consideration.

We performed exome sequencing of 6116 genes referenced in OMIM and NTD risk and genome methylation in 23 NTD cases. We replicated the most significant associations in 81 other cases.

The analysis of exome sequencing identified 2 genes of Sonic Hedgehog (SHH), MKS1 and GLI3, a new gene predictor and 1 gene of one carbon metabolism (1- CM), LRP2. The analysis restricted to genes of neural tube embryogenesis and 1-CM identified 5 gene predictors of 1-CM (LRP2, rs137983840, p=0.005; MMAA, rs148142853, p=0.005; TCN2, rs35838082, p=0.044; FPGS, rs41306702, p=0.0012; BHMT, rs763726268, p=0.011) and 2 of SHH (GLI3, rs35364414, p=0.012; MKS1, rs151023718). We replicated the association of TCN2, BHMT, and GLI3 with NTD risk. We found a significant hemimethylation of CFAP46 that may influence SHH activation, in one case who carried risk alleles in BHMT, LRP2 and GLI3.

In conclusion we identified new candidate genes and rare variants that highlight an interacting influence of genes involved in SHH and 1-CM in the puzzle of genetic components of NTD risk. `

KEY WORDS: one-carbon metabolism; neural tube defects; spina bifida; folate, vitamin B12; NGS; methylome.

Competing interests: None declared.

Funding: This work was supported partly by the french PIA project « Lorraine Université d'Excellence », reference ANR-15-IDEX-04-LUE

Contributors

ER: conducted research; analyzed data; performed genotyping analyses; performed statistical analysis; wrote paper; **CC:** conducted research; analyzed data; performed genotyping analyses; **AO:** conducted research; analyzed data; performed statistical analysis; wrote paper; **TJ:** conducted research; performed genotyping analyses; **JV and OK:** recruited subjects**; FF and BL:** conducted research; analyzed data; recruited subjects; **R-MG-R:** conducted research; provided essential materials; participated in genotyping analyses; performed statistical analysis; recruited subjects, analyzed data**; J-LG:** designed and coordinated research; analyzed data; wrote paper; had primary responsibility for final content.

Ethics approval: The studies described here were approved by the Nancy University Hospital ethics committee

INTRODUCTION

Neural tube defects are one the most common congenital malformation, affecting approximately 0.5 at 1 child per 1000 births in Europe. These malformations are a consequence of the failure of fusion of the neural tube during the early stage of embryogenesis. They are classified in function of their localization along the central nervous system. The clinical consequence is variable, with lethal forms such as anencephaly or craniorachischisis, and forms with motor and sensitive deficit (as spina bifida aperta) and asymptomatic forms (as spina bifida occulta).

It is generally admitted that the pathomechanisms of neural tube defects (NTD) may result from complex interactions between genetic factors involved in neural tube development and metabolism and environmental factors such as maternal nutritional status and intake of teratogenic drugs. A great variation of the prevalence of NTD is reported among populations worldwide. This may reflect differences in exposure to environmental risk factors or allele frequencies of genetic variants at specific loci.

The environmental and nutritional maternal factors risk factors of neural tube defect include age, folate status, caffeine consumption and anti-epileptic treatments by valproic acid and carbamazepine [1]. Since the 1980s, many studies have demonstrated the protective effect of perinatal folic acid fortification. This led to introducing the food fortification with folic acid in North America two decades ago and to recommend maternal acid folic supplementation 4 weeks before conception and during the first 12 weeks of pregnancy in Europe [2,]. The fortification was associated with a large reduction of incidence of NTD worldwide [3]. More recently, the contributing role of vitamin B12, another micronutrient involved in the one-carbon metabolism (1-CM) has also been pointed out [4,5]. Several mechanisms may underly the association of the 1-CM with NTD risk [6]. One hypothesis is that the dysregulation of the 1-CM decreases the intracellular production of S-

Adenosylmethionine (SAM), the universal methyl donor, with consequences on DNA methylation and the subsequent epigenomic dysregulation of genes involved in neural tube embryogenesis.

The multifaceted involvement of genetic factors in NTD is mostly illustrated by the transgenic KO mice models of birth defects and the identification of several genetic polymorphisms in population studies. Many of these genes are involved in 1-CM and key pathways of the early stage of embryogenesis such as planar cell polarity (PCP) and WNT and Sonic Hedgehog (SHH) pathways [6]. The genetic predictors for NTD risk in relation with 1-CM include the c.665C>T single nucleotide polymorphism (SNP) of MTHFR, the gene needed for the synthesis of methyltetrahydrofolate (MeTHF) [7,8] , and other SNPs in other genes such as MTR, MTRR, TCN2, and SCL19A1 [4, 9, 10, 11]. Very few studies have used the next-generation sequencing (NGS) of the exome to identify less frequent and/or non-reported gene variants. In addition, the interplay of the potential genetic variants with DNA methylation has not deserved attention in the setting of NTD.

We made a systematic search of genetic variants referenced in OMIM and their gene ontology in the risk prediction of NTD. We investigated also the NTD risk could result in part from epigenome wide alterations influenced by these genetic predictors. To address this issue, we performed a high throughput exome sequencing using a large panel of 6116 genes and an epigenome-wide DNA methylome study in 23 children suffering from NTD. We replicated the most significant associations in 81 other NTD cases.

METHODS

Study design

We performed a discovery study of mutations and rare genetic variants identified by NGS in 23 French NTD cases and a replication study in 81 other cases. We compared the alternative allele frequencies of cases with those from the ExAC database for the European non-Finnish population.

Study populations

We recruited 23 patients (10 males and 13 females) with spina bifida aperta (meningocele and myelomeningocele) in the consultation of neurosurgery pediatric in Children Hospital of Nancy (France) between 2007 and 2008. Parental and patient consent was obtained after oral and written information. The study obtained the authorization of the ethical committee Est III (CPP) in 2007. The replication study was performed in a population previously described of 54 French and Italian NTD cases [4, 9] and 27 aborted French fetuses with NTD (meningocele and myelomeningocele) recruited in the Center of Foetopathology of the University Hospital Center of Nancy, France. We followed the principles outlined in the Helsinki Declaration, and we obtained informed and signed consents from the parents to perform the biochemical DNA analyses from the cord blood DNA, in the two replication populations.

NGS and Sanger sequencing

Genomic DNA from EDTA-treated peripheral blood samples was isolated using the NucleonBACC3 Kit. (GE Healthcare, Aulnay-sous-Bois, France). The purified DNA samples were checked by 1% agarose electrophoresis and quantified by the PicoGreen dye binding assay. DNA sequencing was performed with a MiSeq® sequencer, from Illumina (San Diego, Ca, USA). We used the SureSelect Focused Exome Plus from Agilent® (Santa Clara, Ca, USA), which covers exonic regions of more than 6110 genes. We used the SureDesign tool to

customize it with 6 genes described in the literature of NTD, which were not initially present in the panel (DVL1, FZD5, DVL3, SNAI2, SHROOM2, TSPYL2). We confirmed the mutations identified in NGS by Sanger sequencing of PCR products, using the Big Dye Terminator® kit. v 1.1 (Applied Biosystems, Foster, Ca, USA) and capillary electrophoresis (ABI3100®).

The first phase of our bio-informatic analysis of NGS data is described in supplementary Figure S1. All the genetic variants retrieved from genome sequencing analysis of the genes used in the SureSelect Focused Exome Plus (Agilent®) design were imported for each of the 23 NTD cases. We used the following strategy for filtering and prioritizing the genetic variants: Step #1: Import all retrieved genetic variants retrieved in the 23 NTD cases; Step #2: Exclude variants with a reported alternative allele frequency (AAFc) > 5% in the following databases: the Exome Aggregation Consortium (ExAC), the Genome Aggregation Database (gnomAD), or the Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP 149); Step #3: Exclude intronic or synonymous variants; step #4: Exclude variants with a low prediction probability for their association with neural tube defect risk based on a Phevor1 score < 0.02 (≥ 97th percentile). The Phevor score was calculated according to the RefSeq Genes 105v2, NCBI gene source, using the following ontologies: Human Phenotype Ontology, Gene Ontology, and OMIM Phenotype Ontology, and the following terms related to the NTD phenotype: “neural tube defect”, “spina bifida”, and “abnormal neural tube morphology”; Step #5: Exclude variants with a minor allele frequency among NTD cases (MAF_{NTD}) < 4% (at least 2 alleles present among the 23 NTD subjects); Step #6: Exclude variants with a “Benign” or “Likely Benign” prediction according to the ACMG Classification; Step #7: Exclude variants with an enrichment < 3 (enrichment = MAFNTD/ AAFc).

The second phase of our analysis was the search for candidate genes that belong to the same ontology groups that the genes identified in phase 1. Two groups were considered, genes that belong to embryogenesis in relation with neural tube closure and genes of the 1-

CM. For this second phase of bioinformatic analysis of NGS, we defined therefore two in silico gene panels, the first contained the selected genes for 1-CM (supplementary data Table S1) and the second the candidate genes implicated in embryogenesis or from animal models (http://ntdwiki.wikispaces.com, supplementary data Table S2). Sequencing reads are aligned to GRCh37 hg19 with program Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM), SAM (Sequence alignment / Map) files are generated. Identification of SNV (Single nucleotide variant) is performed using SNPPET SNP Caller. SureCall and Annovar were used to SNV annotation. PolyPhenII and SIFT were used to qualify variant effect: score less than 0.05 for SIFT or superior than 0.85 for PolyPhenII are consider to be respectively deleterious or damaging. After alignment, 91.4% of the target regions was covered by at least 20 reads. 13957 (+/- 2006) variants per patient on overage have been identified in this cohort. In total, 55262 different variants were identified. We selected the non synonymous SNV of the genes included in the 2 panels, according to the deleterious or/and damaging prediction with Sift and Polyphen II and a minor allele frequency in general population less than 5% and with a higher frequency (with a minimum enrichment of 1.5-fold) in our cohort than in the general population. The allelic frequencies were compared with data from ExAC (http://exac.broadinstitute.org/) (European non-Finnish frequencies). Fischer's Exact Test was used to compare the allele frequency of our cases with that in the reference population.

In the third phase, we replicated the significant associations of candidate genes with NTD risk found in phase #1 and phase #2 for gene variants with a MAF higher that 0.01. To estimate the probability of replication of the genetic variants retrieved in the phase #1 study, we assessed the study power using a hypothetical alternative allele frequency (AAFc) in the reference population (ExAC) of 0.025, a risk ratio of 3.0 (minor allele frequency in NTD, MAFNTD = 0.075), a number of experimental subjects of 40, and a type I error probability associated with the Fisher's exact test for the null hypothesis of 0.05, and a study power of

0.80. The minimal number of experimental subjects necessary to achieve a statistical significance was 66 (132 alleles).

DNA methylome analysis

600 ng of blood DNA was bisulfite modified using EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, Proteigene, Saint-Marcel, France). The genome-wide profiling of methylome was determined using the Infinium Human Methylation 450 BeadChip array (Illumina, Paris, France), according to the manufacturer's instructions. The arrays were scanned on an Illumina iScan® system, and raw methylation data were extracted using Illumina's Genome Studio methylation module. Methylation was described as a β value, ranging between 0 (fully unmethylated CpG) and 1 (fully methylated CpG). Background correction and normalization was implemented using SWAN method (R Package Minfi) [12].

We performed a comparison of methylation levels using three sets of comparison: Set #1: patient(s) with rare SNV of 1-CM, Set #2: patient(s) with rare SNV of folate metabolism, and Set #3: patients with rare SNV of B12 metabolism. Set #1: a patient with BHMT-LRP2-MMAA and GLI3 variants identified; Set#2: a patient with FPGS variant identified (rs41306702); Set #3: two patients with TCN2 variant identified (rs35838082). DNA methylome data from identified sets were compared with those from pseudo-controls, which consisted of NTD cases from the discovery cohort with no above-mentioned variants. Due to the low sample size, and considering the exploratory approach of our analysis, we used the smoothed P-value transformation by converting nominal P-values obtained from the t-test to smoothed P-values using a window radius of 3, as previously reported [13] . To assess the methylome architecture, we performed linkage disequilibrium (LD)-pairwise analysis on all adjacent CpG pairs in a chromosome. D' values were used in the epi-LD plots. All epi-LD analyses were performed after transforming the CpG β-values to categorical variables according to the ENCODE project, as previously reported [13,14]. We estimated the haplotype

frequencies using the expectation/maximization (EM) algorithm [15, 16]. We used the following parameters for the haplotype block definition: confidence Bound: 0.7 to 0.98; reject criteria threshold (D'): 0.9; minor epi-allele frequency threshold: 0.05; Max # Markers in a Block: 30; max length of a block: 160; display threshold: 0.01. All statistical analyses were performed using the SNP & Variation Suite (v8.8.1; Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA).

RESULTS

Characteristics of the study populations

The 23 cases recruited in the discovery study and the postnatal cases of the replication study were aged between 14 and 35 years (mean, 25 years) and 5 and 21 years (mean, 8.5 years), respectively. The clinical characteristics of the discovery cohort are summarized in supplementary Table S3.

In the replication study, among the 54 NTD postnatal cases, 41 had myelomeningocele, and 13 cases had meningocele. All the 27 fetuses of the replication group had spina bifida, including 7 with myelomeningocele and 20 with meningocele.

Identification of NTD risk candidate genes in NGS analysis.

The study design is summarized in Figure 1. The genome exome analysis of the 23 NTD cases retrieved 55,798 genetic variants. Among them, 35,233 represented SNP with an allele frequency > 5% and were excluded (Supplementary data Figure S1). Among the low frequency and rare variants retained, 15,015 were annotated as intronic or synonymous variants and were thus excluded. The Phevor score was calculated for the remaining 5,541 variants and allowed to exclude variants exhibiting low proximity with the NTD phenotype (Phevor score < 0.02; < 97th percentile). Among the 178 remaining variants, 42 were retained given their MAF_{NTD} > 4%. After excluding the variants with a "Benign" or "Likely Benign" prediction according to the ACMG Classification and those exhibiting an enrichment < 3, 3 variants from 2 genes were finally retained as potential candidates for the replication study

(**Table 1**). These genes are involved in the neurodevelopment and ciliopathies in relation with NTD (GLI3) and the 1-CM (LRP2).

According to these results, we restricted subsequently our search of gene predictors to the genes involved in the 1-CM and neurodevelopment/ciliopathies. We identified alleles of 16 genes from the panel of genes 1-CM and 5 genes from the panel of genes implicated during embryogenesis, with a frequency <5 % in ExAC and at least a 1.5-fold higher frequency in our NTD cases (**Table 2**). Among the genes of 1-CM, 5 were significantly associated with an increased risk of NTD. Three of these genes were involved in vitamin B12 metabolism, LRP2 (rs137983840, p=0.005), MMAA (rs148142853, p=0.005) and TCN2 (rs35838082, p=0.044), one in folate cellular metabolism, FPGS (rs41306702, p=0.0012) and one in choline metabolism, BHMT (rs763726268, p= 0.011) (**Table 2**). We also detected an alternative allele for the rs117687681 of CBS associated with NTD risk with borderline significance (p=0.06). These genetic variants were predicted to be 'probably damaging' or 'damaging'. The alternative allele frequencies for the rs763726268, rs41306702, rs137983840, rs148142853, rs35838082 and rs117687681 were respectively enriched by 208.7-, 11.9-, 209.7, 333.8-, 5.9- and 17.6-fold in the NTD population.

We replicated the association of BHMT rs763726268 and TCN2 rs35838082 with NTD risk in the 81 other cases compared with ExAC database (**Table 3**). One NTD case was homozygous for the BHMT rs763726268.

In the neural-tube embryogenesis panel, we found variants from 5 genes with a frequency < 5% in ExAC and an enrichment of 1.5-fold or more in NTD cases in comparison with ExAC database. The SNV of these 5 genes are detailed in **Table 2**. Among them, only two variants were significantly associated with NTD risk, GLI3 (c.4609C>T, rs35364414) and MSK1 (c.857A>G, rs151023718). We reported the MKS1 variant in two heterozygous cases and the GLI3 variant in 6 cases, including 1 homozygous and 5 heterozygous. The MKS1

allele frequency was at 4.3% in the NTD case. This variant is extremely rare in the European sample population from ExaC, with an AAF of 0.09% and could not be retained for the replication study. The GLI3 c.4609T allele frequency of 15.2 % was significantly higher than that reported in the European non-Finish population (4.7 % in ExAC data, p=0.012). This variant is predicted as deleterious and probably damaging by SIFT and Polyphen II, respectively. It is in LD with another variant c.4007G>A, (rs35280470) of GLI3. We did not replicate the association of GLI3 rs35364414 in the 81 NTD cases (**Table 3**). However, the allelic frequency of rs35364414 was 12.2 % in the 41 French NTD vs. 4.7% in ExAC (p=0.005).

One patient presented 4 of the rare variants identified in the discovery population at a heterozygous status: BHMT rs763726268, LRP2 rs137983840, MMAA rs148142853 (from the 1-CM panel), and GLI3 rs35364414, from the neural tube embryogenesis panel.

Methylation analysis

We performed the genome profiling of methylation in 22 of the 23 NTD cases (12 females and 10 males). We found a top significant signal in the vicinity of the CFAP46 gene (alias, TTC40) in the patient S27 who carried risk alleles in BHMT, LRP2, MMAA, and GLI3, as shown in **Figure 2**. This top significant locus encompassed one gene (CFAP46) and two long intergenic non-protein coding RNA, namely: LINC01166 (alias, LOC101927590), and LINC01168 (alias, LOC399829) (**Figure 2A and 2B**). The CpG probes associated with the top P-values were: cg01263624, cg00912926, cg23987897, and cg17693826. They were hemimethylated in the S27 case while they were fully unmethylated in the NTD pseudo-controls (**Figure 2C** and **Supplementary Table S4**). We performed an epi-haplotype approach for estimating the methylome architecture of this locus and found a relatively structured co-methylation pattern encompassing CFAP46, LINC01166, and LINC01168 (**Figure 2B**).

DISCUSSION

This study of the genome sequencing of a large panel of genes has permitted to identify new variants associated with NTD risk in genes involved in vitamin B12 metabolism (LRP2, MMAA, and TCN2), folate cellular metabolism (FPGS), choline metabolism (BHMT) and one gene involved in the Sonic Hedgehog pathway (GLI3).

We found three variants, which predicted NTD risk in genes of B12 metabolism, LRP2, TCN2 and MMAA, in the discovery cohort. Among them, the TCN2 variant was the single to be significantly associated with NTD risk in the replication study. We found a risk prediction of the rs35838082 missense variant c.643C>T (p.Arg215Trp) of TCN2, the gene that encodes transcobalamin. This protein plays a key role in B12 transport and cell delivery [17]. It is internalized by receptor-mediated endocytosis through its binding to CD320 in the brain and low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 2 (LRP2) in the kidney tubule and other tissues. Whether this polymorphism influences the binding of transcobalamin to either CD320 or LRP2 should deserve further attention. Other variants of TCN2 have been previously associated with NTD, including TCN2 c.776C>G in the Indian population with a high prevalence of B12 deficiency [18]. We found a significant association of LRP2 rs137983840 c.10030G>A with NTD risk. LRP2, also named megalin, is a multifunctional endocytic receptor expressed on the apical surface of the neuroepithelium in the early steps of embryonic development [19]. Previous studies have reported other variants of LRP2 gene in association with NTD risk [20]. The loss of LRP2 expression in the central nervous system leads to impaired closure of the rostral neural tube in mice [21]. The association of LRP2 with NTD risk could be related to its role in folate and vitamin B12 uptake through its binding to FOLR1 and cubilin, respectively [21]. The involvement of the MMAA gene in the pathomechanisms of NTD is less clear and not documented in the literature. This gene plays a key role in the

transport of vitamin B12 in the mitochondrion and mutations in this gene increase methylmalonic acid [17]. High levels of MMA are associated with NTD [5].

The variant identified in BHMT is rare and has not been reported previously. It is now referenced as rs763726268 and has a very low allele frequency in the general population (**Table 2**). The deletion leads to loss of a stop codon, responsible to an elongation of the protein. This gene encodes betaine-homocysteine S-methyltransferase, a protein, which catalyzes homocysteine and betaine transformation in methionine. It is mainly expressed in liver and kidney in humans [22]. The association of other variants of BHMT gene with NTD risk have been previously described in the literature [23, 24]. Moreover, low maternal choline status produces a potential risk for NTD occurrence in some but not all published studies [25, 26].

Our study is the first report of NTD association with GLI3. The rs35364414 was a risk predictor in the discovery study and in the French cases of the replication study. GLI3 is a transcriptional factor involved in the Sonic Hedgehog pathway (SHH). This pathway is essential during development particularly for the formation and patterning of the neural tube. The loss of SHH signaling is associated with a cranial defect such as holoprosencephaly and cyclopia. Conversely, hyperactivation of the SHH pathway seems to be associated with neural tube defect, as observed notably with mutations of PATCH1 [27]. GLI3 rs35364414 is a missense c.4609C>T variant (p.Arg1537Cys) located in an exon needed for the translation of the C-terminal domain. This domain is phosphorylated by the protein kinase A to obtain the truncated and repressive form named GLI3R. It has been hypothesized that the reduced GLI3R is the fundamental cause of the failure of neural tube closure, but this hypothesis was challenged by the absence of risk association with NTD.[27] GLI3 shares similarities with GLI2, another transcriptional factor involved in NTD pathomechanisms. Pan et al. have previously shown that a Gli2 mutation in the site recognized by PKA (GLI P1-4) produces NTD in mice [28]. We found also two heterozygous cases for rs151023718 of MSK1. This gene

is involved in SHH and ciliary function. It belongs to the syndromic encephalocele genes associated with Bardet-Biedl syndrome [30]. We could not replicate the association of rs151023718 with NTD as the MAF is extremely rare in the European population.

Our and previous data suggest interactions between 1-CM and SHH. A link between 1-CM and GLI3 was evidenced by Ernest et al. [31] who showed that mice mutant Gli3xtj (heterozygote) have increased level of homocysteine compared with wild-type mice. Homozygous Gli3xtj mice were not viable and presented anencephaly. In our cohort, the homocysteine level in patients with GLI3 c.4609C>T variant was 13.5 µmol/L vs.10.5 µmol/L in cases with no GLI3 mutation (p=0.14). Recently Toriyama et al. showed that the folate-dependent methylation of septins governs ciliogenesis during neural tube closure [32]. Septin-2 is methylated in two residues and this methylation regulates septin-2 functions in animal models. Moreover, the hypomethylation produced by folate depletion and Adox treatment influence SHH signaling by decreasing the truncated Gli3R in Scl19a1$^{-/-}$ cells.[32] This impaired Gli3 processing is expected to activate the SHH pathway. One patient carried 4 variants encompassing LRP2, BHMT, MMAA, and GLI3, and which were individually identified as NTD predictors. The interacting and complementary role of 3 of these gene variants may reflect epistasis [33]. LRP2 is described as a component of SHH in neural tube development by influencing the internalization and cellular trafficking of SHH/patched 1 complex [34, 35]. The Gli3 processing could be amplified by a decreased methylation capacity produced by the BHMT variant[27,32]. The epigenome-wide analysis identified a hemimethylated locus encompassing the CFAP46 gene and two long intergenic non-protein coding RNA, LINC01166 (alias, LOC101927590), and LINC01168 (alias, LOC399829). LINC01166 encodes a long non-coding RNA, which is almost exclusively expressed in brain and testis (3.9 TPM) according to data extracted from the Genotype-Tissue Expression Project (GTEx) (gtexportal.org) (Supplementary data **Figure S1**). The CFAP46 gene is expected to

encode a “protein cilia and flagella associated protein 46” involved in cilium axoneme and cilium movement. The primary cilium is abundant in the neural tube. Most of the components of the SHH pathway, such as PTCH1 [36], Gli2 and Gli3 proteins [37] are localized in primary cilium [38]. Mutations of proteins required for proper functioning of cilia and SHH signaling can disrupt neural tube closure [27]. Moreover, CFAP46 is involved in pathomechanisms of heterotaxy syndrome [39], a syndrome with an increased risk of NTD [40].

In conclusion, we performed an NGS study that identified new candidate genes and new rare variants with risk prediction of NTD. These variants were located in interacting genes that may reflect the influence of deregulated B12 metabolism and SHH pathway in the pathomechanisms of NTD.

REFERENCES

1. Au KS, Ashley-Koch A, Northrup H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. Dev Disabil Res Rev. 2010;16(1):6-15. doi:10.1002/ddrr.93

2. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. Lancet Lond Engl. 1991;338(8760):131-137.

3. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. Nutrients. 2011;3(3):370-384. doi:10.3390/nu3030370

4. Guéant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. Neurosci Lett. 2003;344(3):189-192.

5. Senousy SM, Farag MK, Gouda AS, El Noury MA, Dabbous OA, Gaber KR. Association between biomarkers of vitamin B12 status and the risk of neural tube defects. J Obstet Gynaecol Res. 2018;44(10):1902-1908. doi:10.1111/jog.13751

6. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. Hum Mol Genet. 2009;18(R2):R113-129. doi:10.1093/hmg/ddp347

7. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? Am J Hum Genet. 1998;62(5):1044-1051. doi:10.1086/301825

8. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2000;151(9):862-877.

9. Candito M, Rivet R, Herbeth B, et al. Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. Am J Med Genet A. 2008;146A(9):1128-1133. doi:10.1002/ajmg.a.32199

10. Afman LA, Lievers KJA, van der Put NMJ, Trijbels FJM, Blom HJ. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. Eur J Hum Genet EJHG. 2002;10(7):433-438. doi:10.1038/sj.ejhg.5200830

11. Guéant J-L, Guéant-Rodriguez R-M, Anello G, et al. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? Clin Chem Lab Med. 2003;41(11):1473-1477. doi:10.1515/CCLM.2003.226

12. Wu MC, Joubert BR, Kuan P, et al. A systematic assessment of normalization approaches for the Infinium 450K methylation platform. Epigenetics. 2014;9(2):318-329. doi:10.4161/epi.27119

13. Guéant J-L, Chéry C, Oussalah A, et al. APRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. Nat Commun. 2018;9(1):67. doi:10.1038/s41467-017-02306-5

14. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012;489(7414):57-74. doi:10.1038/nature11247

15. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H. The structure of haplotype blocks in the human genome. - PubMed - NCBI. Science. 2002;(296):2225-2229.

16. Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, et al. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(20):11479-11484. doi:10.1073/pnas.201394398

17. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen A-L, et al. Vitamin B12 deficiency. Nat Rev Dis Primer. 2017;3:17040. doi:10.1038/nrdp.2017.40

18. Godbole K, Gayathri P, Ghule S, et al. Maternal one-carbon metabolism, MTHFR and TCN2 genotypes and neural tube defects in India. Birt Defects Res A Clin Mol Teratol. 2011;91(9):848-856. doi:10.1002/bdra.20841

19. Willnow TE, Hammes A, Eaton S. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. Dev Camb Engl. 2007;134(18):3239-3249. doi:10.1242/dev.004408

20. K RP, T S, B S, T MK, A J. LRP2 gene variants and their haplotypes strongly influence the risk of developing neural tube defects in the fetus: a family-triad study from South India. Metab Brain Dis. 2018;33(4):1343-1352. doi:10.1007/s11011-018-0242-2

21. Kur E, Mecklenburg N, Cabrera RM, Willnow TE, Hammes A. LRP2 mediates folate uptake in the developing neural tube. J Cell Sci. 2014;127(Pt 10):2261-2268. doi:10.1242/jcs.140145

22. Lee MB, Kooistra M, Zhang B, et al. Betaine homocysteine methyltransferase is active in the mouse blastocyst and promotes inner cell mass development. J Biol Chem. 2012;287(39):33094-33103. doi:10.1074/jbc.M112.365478

23. Cao L, Wang Y, Zhang R, et al. Association of neural tube defects with gene polymorphisms in one-carbon metabolic pathway. Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg. 2018;34(2):277-284. doi:10.1007/s00381-017-3558-z

24. Morin I, Platt R, Weisberg I, et al. Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. Am J Med Genet A. 2003;119A(2):172-176. doi:10.1002/ajmg.a.20115

25. Shaw GM, Finnell RH, Blom HJ, et al. Choline and risk of neural tube defects in a folate-fortified population. Epidemiol Camb Mass. 2009;20(5):714-719. doi:10.1097/EDE.0b013e3181ac9fe7

26. Mills JL, Fan R, Brody LC, et al. Maternal choline concentrations during pregnancy and choline-related genetic variants as risk factors for neural tube defects. Am J Clin Nutr. 2014;100(4):1069-1074. doi:10.3945/ajcn.113.079319

27. Murdoch JN, Copp AJ. The relationship between sonic Hedgehog signaling, cilia, and neural tube defects. Birt Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010;88(8):633-652. doi:10.1002/bdra.20686

28. Pan et al. Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. - PubMed - NCBI. Dev Biol. 2009;1(326):177-189.

29. Lu X-L, Wang L, Chang S-Y, et al. Sonic Hedgehog Signaling Affected by Promoter Hypermethylation Induces Aberrant Gli2 Expression in Spina Bifida. Mol Neurobiol. 2016;53(8):5413-5424. doi:10.1007/s12035-015-9447-0

30. Leitch CC, Zaghloul NA, Davis EE, et al. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. Nat Genet. 2008;40(4):443-448. doi:10.1038/ng.97

31. Ernest S, Christensen B, Gilfix BM, et al. Genetic and molecular control of folate-homocysteine metabolism in mutant mice. Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc. 2002;13(5):259-267. doi:10.1007/s00335-001-3054-2

32. Toriyama M, Toriyama M, Wallingford JB, Finnell RH. Folate-dependent methylation of septins governs ciliogenesis during neural tube closure. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2017;31(8):3622-3635. doi:10.1096/fj.201700092R

33. Mackay TF, Moore JH. Why epistasis is important for tackling complex human disease genetics. Genome Med. 2014;6(6):124. doi:10.1186/gm561

34. Christ A, Christa A, Kur E, et al. LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. Dev Cell. 2012;22(2):268-278. doi:10.1016/j.devcel.2011.11.023

35. McCarthy RA, Barth JL, Chintalapudi MR, Knaak C, Argraves WS. Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. J Biol Chem. 2002;277(28):25660-25667. doi:10.1074/jbc.M201933200

36. Goodrich LV, Milenković L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. Science. 1997;277(5329):1109-1113.

37. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. PLoS Genet. 2005;1(4):e53. doi:10.1371/journal.pgen.0010053

38. Pal K, Mukhopadhyay S. Primary cilium and sonic hedgehog signaling during neural tube patterning: role of GPCRs and second messengers. Dev Neurobiol. 2015;75(4):337-348. doi:10.1002/dneu.22193

39. Liu C, Cao R, Xu Y, et al. Rare copy number variants analysis identifies novel candidate genes in heterotaxy syndrome patients with congenital heart defects. Genome Med. 2018;10(1):40. doi:10.1186/s13073-018-0549-y

40. Loomba R, Shah PH, Anderson RH. Fetal Magnetic Resonance Imaging of Malformations Associated with Heterotaxy. Cureus. 2015;7(5):e269. doi:10.7759/cureus.269

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Study design. The study was designed in 3 phases. The first phase analyzed the genetic variants retrieved from genome sequencing analysis in 23 cases with neural tube defects (NTD). In the second phase, we analyzed candidate genes that belonged to the same ontology groups that the genes identified in phase 1. In the third phase, we replicated the significant associations of candidate genes with NTD risk found in phase #1 and phase #2 for gene variants with a MAF higher that 0.01, in 81 other NTD cases, including 41 French (FR) and 40 Italian (IT) cases. Abbreviation: Minor allele frequency in NTD (MAFNTD).

Figure 2. DNA methylation. The DNA methylation profiling of patient S27 exhibiting genetic variants in BHMT, LRP2, and MMAA in comparison with pseudo-controls (7 NTD cases with that did not exhibit the 1-CM variants). **A**: top significant signal in the vicinity of the CFAP46 gene (alias TTC40). **B**: epi-haplotype approach for estimating the methylome architecture of this locus showing a relatively structured co-methylation pattern encompassing CFAP46, LINC01166, and LINC01168. **C**: beta values of the four CpG probes associated with a top statistical significance in the DNA methylome analysis between the case S27 and pseudo-controls (MARTHA cohort), as described previously (18).

Figure 1

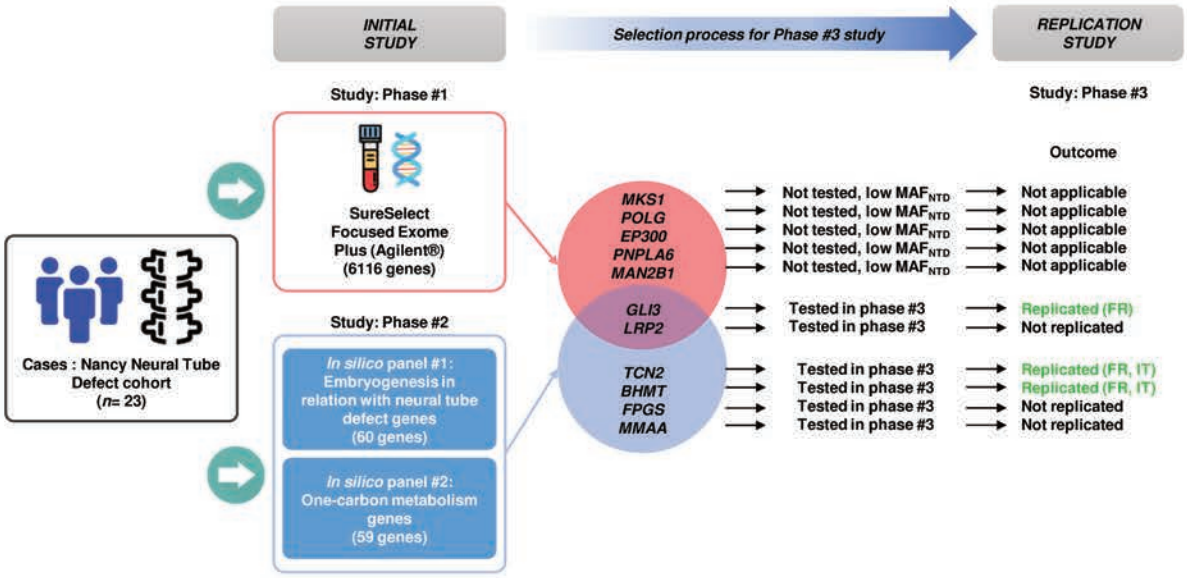

INITIAL STUDY
Selection process for Phase #3 study
REPLICATION STUDY
Study: Phase #1
Study: Phase #3
Outcome
SureSelect Focused Exome Plus (Agilent®) (6116 genes)
Cases : Nancy Neural Tube Defect cohort (n= 23)
Study: Phase #2
In silico panel #1: Embryogenesis in relation with neural tube defect genes (60 genes)
In silico panel #2: One-carbon metabolism genes (59 genes)
MKS1
POLG
EP300
PNPLA6
MAN2B1
GLI3
LRP2
TCN2
BHMT
FPGS
MMAA
Not tested, low MAF NTD
Not tested, low MAF NTD
Not tested, low MAF NTD
Not tested, low MAF NTD
Not tested, low MAF NTD
Tested in phase #3
Tested in phase #3
Tested in phase #3
Tested in phase #3
Tested in phase #3
Tested in phase #3
Not applicable
Not applicable
Not applicable
Not applicable
Not applicable
Replicated (FR)
Not replicated
Replicated (FR, IT)
Replicated (FR, IT)
Not replicated
Not replicated

Figure 2

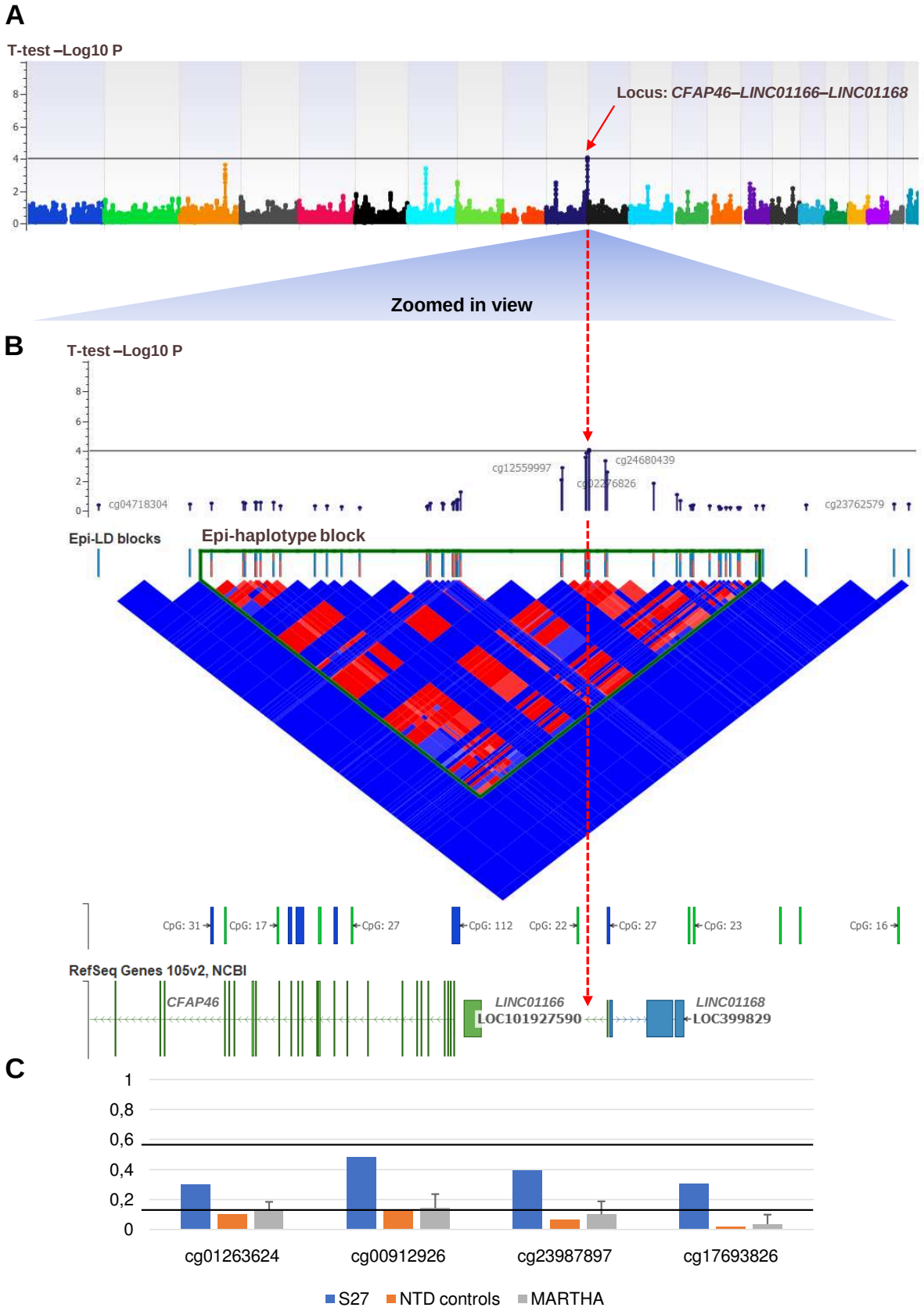

A
T-test –Log10 P
Locus: CFAP46–LINC01166–LINC01168
Zoomed in view
B
T-test –Log10 P
cg12559997
cg24680439
cg02276826
cg04718304
cg23762579
Epi-LD blocks
Epi-haplotype block
CpG: 31
CpG: 17
CpG: 27
CpG: 112
CpG: 22
CpG: 27
CpG: 23
CpG: 16
RefSeq Genes 105v2, NCBI
CFAP46
LINC01166
LOC101927590
LINC01168
LOC399829
C
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
cg01263624
cg00912926
cg23987897
cg17693826
S27
NTD controls
MARTHA

Table 1. Variants retrieved from the whole NGS analysis of the 23 NTD cases (Phase #1)

Genetic variant	[Ref/Alt]	Gene Names	HGVS nomenclature	Sequence Ontology	MAF_{NTD}	AAFc	Enrichment (MAF_{NTD} /AAFc)	Considered for Phase #2
7:42004062-SNV	G/A	GLI3	NM_000168.5:c.4609C>T NP_000159.3:p.Arg1537Cys	missense	0.152	0.05	3.0	Yes
7:42003898-SNV	C/A	GLI3	NM_000168.5:c.*30G>T —	3_prime_UTR	0.152	0.05	3.0	Yes
2:170097707-SNV	T/G	LRP2	NM_004525.2:c.3836A>C NP_004516.2:p.Asp1279Ala	missense	0.065	0.022	3.0	Yes
17:56290344-SNV	T/C	MKS1	NM_017777.3:c.857A>G NP_060247.2:p.Asp286Gly	missense	0.043	0.0009	48.3	No
15:89873364-SNV	C/G	POLG	NM_002693.2:c.803G>C NP_002684.1:p.Gly268Ala	missense	0.043	0.004	10.9	No
22:41546158-SNV	C/A	EP300	NM_001429.3:c.2773C>A NP_001420.2:p.Pro925Thr	missense	0.043	0.006	7.2	No
19:7626428-SNV	G/A	PNPLA6	NM_001166111.1:c.4108G>A NP_001159583.1:p.Gly1370Ser	missense	0.043	0.008	5.4	No
19:12757392-SNV	C/T	MAN2B1	NM_000528.3:c.*42G>A —	3_prime_UTR	0.043	0.009	4.8	No

HGVS: Human genome variation society; **MAF_{NTD}**: minor allele frequency; **AAFc**: Alternative allele frequency in the following databases in reference populations (ExAC, gnomAD, or dbSNP 149).

Table 2. Genetic variants reporting low frequency variants (<5%) in the NTD cases with an enrichment of at least 1.5-fold in comparison with the ExAC database (European non-Finnish) retrieved from the 1-CM panel (OCM) and neural tube embryogenesis panel (NTE) (#phase 2)

Gene	Panel	Variant	HGVS, cDNA	HGVS, Prot	AAC_{NTD}	MAF_{NTD}	AAFc	Enrichment (NTD vs. ExAC)	SIFT	Polyphen2	P-value
AHCY	OCM	rs41301825	c.367G>A	p.Gly123Arg	1	0.022	6.24×10^{-3}	3.5	D	B	0.25
BHMT	OCM	rs763726268	c.1196delA	p.Lys400AsnfsTer15	1	0.043	2.38×10^{-4}*	180.7	—	—	0.011
CBS	OCM	rs117687681	c.1105C>T	p.Arg369Cys	2	0.043	2.44×10^{-3}	17.6	D	P	0.06
DNMT1	OCM	Not reported	c.3830G>A	p.Arg1277Gln	1	0.022	Not reported	—	D	D	—
FPGS	OCM	rs41306702	c.253C>T	p.Arg85Trp	2	0.043	3.61×10^{-3}	11.9	D	P	0.0012
GIF	OCM	rs150884181	c.290T>C	p.Met97Thr	1	0.022	1.12×10^{-2}	2.0	D	P	0.4
LRP2	OCM	rs149469954	c.5209C>T	p.Leu1737Phe	1	0.022	1.70×10^{-3}	13.0	D	B	0.07
LRP2	OCM	rs137983840	c.10030G>A	p.Ala3344Thr	1	0.022	1.05×10^{-4}	209.7	D	P	0.005
MMAA	OCM	rs148142853	c.941G>A	p.Arg314His	1	0.022	1.05×10^{-4}	209.7	D	B	0.005
MTFMT	OCM	rs199599204	c.16C>T	p.Arg6Trp	1	0.022	1.32×10^{-2}	1.7	D	B	0.46
MTHFD1	OCM	Not reported	c.1745T>G	p.Met582Arg	2	0.043	Not reported	—	D	P	—
MTR	OCM	rs116836001	c.3079C>T	p.Arg1027Trp	1	0.022	3.60×10^{-3}	6.1	D	B	0.15
MTR	OCM	rs12749581	c.155G>A	p.Arg52Gln	1	0.022	5.90×10^{-3}	3.7	D	B	0.23
MTRR	OCM	rs41283145	c.1549A>G	p.Thr517Ala	1	0.022	6.46×10^{-3}	3.4	D	P	0.26
PEMT	OCM	Not reported	c.311G>A	p.Arg104His	1	0.022	Not reported	—	D	P	—
TCN2	OCM	rs35838082	c.643C>T	p.Arg215Trp	2	0.043	7.24×10^{-3}	5.9	D	D	0.044
BRCA1	NTE	rs1800744	c.4598G>T	p.Ser1533Ile	1	0.022	3.18×10^{-3}	6.9	D	B	0.14
GLI2	NTE	rs114814747	c.4558G>A	p.Asp1520Asn	1	0.022	1.41×10^{-2}	1.6	D	D	1
GLI3	NTE	rs35364414	c.4609C>T	p.Arg1537Cys	7	0.152	4.73×10^{-2}	3.2	D	D	0.012
HK2	NTE	rs146476722	c.2207C>T	p.Pro736Leu	1	0.022	1.96×10^{-3}	11.2	D	D	0.09
MKS1	NTE	rs151023718	c.857A>G	p.Asp286Gly	2	0.043	9×10^{-4}	48.3	D	P	0.0008

AAC: alternative allelic count; MAF_{NTD} : Minor Allele Frequency in NTD; AAFc: Alternative allele frequencies from the ExAC Database (European non-Finnish); D: Deleterious; T : Tolerated; B: Benign; P: Probably damaging; D: Damaging

* Data was retrieved from the gnomAD database

Table 3. Results of replication study for the seven variants identified in the study in the 81 cases of NTD and comparison with alternative allelic frequency reported in the ExAC database

	MAF_{NTDR}	AAFc	P-value
BHMT rs763726268	0.012	0.007	0.0008
TCN2 rs35838082	0.037	0.007	0.001
MMAA rs148142853	0.000	0.000	1
LRP2 rs137983840	0.000	0.000	1
FPGS rs41306702	0.000	0.004	1
GLI3 rs35364414	0.068	0.047	0.195

MAF_{NTDR} : Minor Allele Frequency in replication study AAFc: alternative allele frequency from ExAC database (European non-Finnish).

Supplementary data

Table S1. List of genes potentially implicated in the one carbon metabolism and included in the NGS exome panel.

Symbol	Approved name	Localisation
AHCY	Adenosyl homocysteinase	20q11.22
ALDH1L1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1	3q21.3
ALDH1A2	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A2	15q21.3
AMD1	Adenosyl methionine decarboxylase 1	6q21
BHMT	Betaine--homocysteines-methyltransferase	5q14.1
BHMT2	Betaine--homocysteines-methyltransferase 2	5q14.1
CBS	Cystathionine-beta-synthase	21q22.3
CHKA	Choline kinase alpha	11q13.2
COQ3	Coenzyme Q3.methyltransferase	6q16.2
CTH	Cystathionine gamma-lyase	1p31.1
VSIG2	V-set and immunoglobulin domain containing 2	11q24.2
CUBN	Cubilin	10p13
DHFR	Dihydrofolate reductase	5q14.1
DNMT1	Dna methyltransferase 1	19p13.2
FOLR1	Folate receptor 1	11q13.4
FOLR2	Folate receptor beta	11q13.4
FOLR3	Folate receptor 3	11q13.4
FPGS	Folylpolyglutamatesynthase	9q34.11
FTCD	Formimidoyl transferase cyclo deaminase	21q22.3
GIF	Gastric intrinsic factor	11q12.1
GAMT	Guanidino acetate N-methyltransferase	19p13.3
GART	Phosphoribosyl glycinamide formyltransferase	21q22.11
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase	8q12.3
ICMT	Isoprenyl cysteine carboxyl methyltransferase	1p36.31
MAT1A	Methionine adenosyl transferase 1A	10q22.3
MAT2A	Methionine adenosyl transferase 2A	2p11.2
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	10q26.3
Symbol	**Approved name**	**Localisation**
MMAA	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cbla type	4q31.21
MTFMT	Mitochondrial methionyl-trnaformyltransferase	15q22.31
MTHFD1	Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	14q23.3
MTHFD2	Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (nadp+ dependent) 2.	2p13.1
MTHFR	Methylene tetrahydrofolate reductase	1p36.22
MTHFS	Methenyl tetrahydrofolatesynthetase	15q25.1
MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	1q43
MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	5p15.31
MUT	Methylmalonyl-coamutase	6p12.3
NAT1	N-acetyltransferase 1	8p22
SLC6A2	Solute carrier family 6 member 2	16q12.2
EIF4G2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	11p15.4
NAT2	N-acetyltransferase 2	8p22
SLC38A1	Solute carrier family 38 member 1	12q13.11
NNMT	Nicotinamide n-methyltransferase	11q23.1
NOS1	Nitricoxide synthase 1	12q24.22
NANOS1	Nanos c2hc-type zinc finger 1	10q26.11
NOS2	Nitric oxidesynthase 2	17q11.2
NANOS2	Nanos c2hc-type zinc finger 2	19q13.32
NOS3	Nitric oxide synthase 3	7q36.1
NANOS3	Nanos c2hc-type zinc finger 3	19p13.13

PCMT1	Protein-l-isoaspartate (d-aspartate) o-methyltransferase	6q25.1
PEMT	Phosphatidyl ethanolaminen-methyltransferase	17p11.2
PRMT1	Protein arginine methyltransferase 1	19q13.33
PRMT2	Protein arginine methyltransferase 2	21q22.3
PCYT1A	Phosphate cytidylyl transferase 1 choline alpha	3q29
RNMT	Rna guanine-7 methyltransferase	18p11.21
Symbol	**Approved name**	**Localisation**
SARDH	Sarcosine dehydrogenase	9q34.2
SHMT2	Serine hydroxymethyl transferase 2	12q12-q14
SHMT1	Serine hydroxymethyl transferase 1	17p11.2
TCN2	Transcobalamin 2	22q12.2
TYMS	Thymidylate synthetase	18q11.32

Table S2. Genes involved in embryogenesis of neural tube and not in the one-carbon metabolism and associated with NTD risk.

Planar Cell Polarity		
CELSR1	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	22q13.31
DVL1	Dishevelled segment polarityprotein 1	1p36.33
DVL2	Dishevelled segment polarityprotein 2	17p13.1
DVL3	Dishevelled segment polarityprotein 3	3q27.1
FZD6	Frizzled class receptor 6	8q22.3
SCRIB	Scribbled planar cell polarity protein	8q24.3
SEC24B	SEC24 homolog B. COPII coatcomplex component	4q25
VANGL1	VANGL planar cell polarity protein 1	1p13.1
VANGL2	VANGL planar cell polarity protein 2	1q23.2
DACT1	Dishevelled binding antagonist of beta catenin 1	14q23.1
PRICKLE1	Prickle planar cell polarity protein 1	12q12
FUZ	Fuzzy planar cell polarity protein	19q13.33
WNT5A	Wntfamilymember 5A	3p14.3
PTK7	Protein tyrosine kinase 7 (inactive)	6p21.1
SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	7q22.1
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	17q23.3-q24.1
Sonic hedgehog		
GLI2	GLI family zinc finger 2	2q14.2
GLI3	GLI family zinc finger 3	7p14.1
SMO	Smoothened frizzled class receptor	7q32.1
SMOX	Spermine oxidase	20p13
SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling	10q24.32

Retinoic Acid metabolism		
ALDH1A2	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A2	15q21.3
CRABP1	Cellular retinoic acid binding protein 1	15q25.1
CRABP2	Cellular retinoic acid binding protein 2	1q23.1
CYP26A1	Cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1	10q23.33
CYP26B1	Cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1	2p13.2
Oxydative stress		
CAT	Catalase	11p13
SOD2	Superoxide dismutase 2	6q25.3
Glucose metabolism		
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12p13.31
SLC2A2	Solute carrier family 2 member 2	3q26.2
SLC2A4	Solute carrier family 2 member 4	17p13.1
HK1	Hexokinase 1	10q22.1
KCNA4	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 4	11p14.1
HOOK1	Hook microtubule tetheringprotein 1	1p32.1
HK2	Hexokinase 2	2p12
KCNA5	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 5	12p13.32
KIF2A	Kinesinfamilymember 2A	5q12.1
HOOK2	Hook microtubule tetheringprotein 2	19p13.13
INS	Insulin	11p15.5
INSR	Insulinreceptor	19p13.2
LEP	Leptin	7q32.1
LEPR	Leptinreceptor	1p31.3

Cellular adhesion		
NCAM1	Neural celladhesionmolecule 1	11q23.2
SHROOM1.2.3.4	Shroomfamilymember 1.2.3.4	
Animal models		
BRCA1	BRCA1 DNA repair associated	17q21.31
CFL1	Cofilin 1	11q13.1
CITED2	Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 2	6q24.1
PAX3	Paired box 3	2q36.1
PDGFRA	Platelet derived growth factor receptor alpha	4q12
PRKACA	Protein kinase camp-activated catalytic subunit alpha	19p13.1
PRKACB	Protein kinase camp-activated catalytic subunit beta	1p31.1
TXN2	Thioredoxin 2	22q12.3
ZIC1	Zicfamily member 1	3q24
ZIC2	Zicfamily member 2	13q32.3
ZIC3	Zicfamily member 3	Xq26.3
TBXT	T-box transcription factor T	6q27
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	3p25.3
ERCC2	ERCC excision repair 2. TFIIH core complex helicase subunit	19q13.32
XRCC1	X-ray repair cross complementing 1	19q13.2
XRCC3	X-ray repair cross complementing 3	14q32.3

Table S3. Clinical characteristics of the NTD cases from the discovery study

	N
Gender	
Females	13
Males	10
Vertebral level of malformation	
Lumbar	12
Sacral	3
Not reported	8
Ventriculo-peritoneal bypass valve	18
Associated clinical manifestations	
Seizures	2
Arnold Chiari malformation	3

N: number of observations.

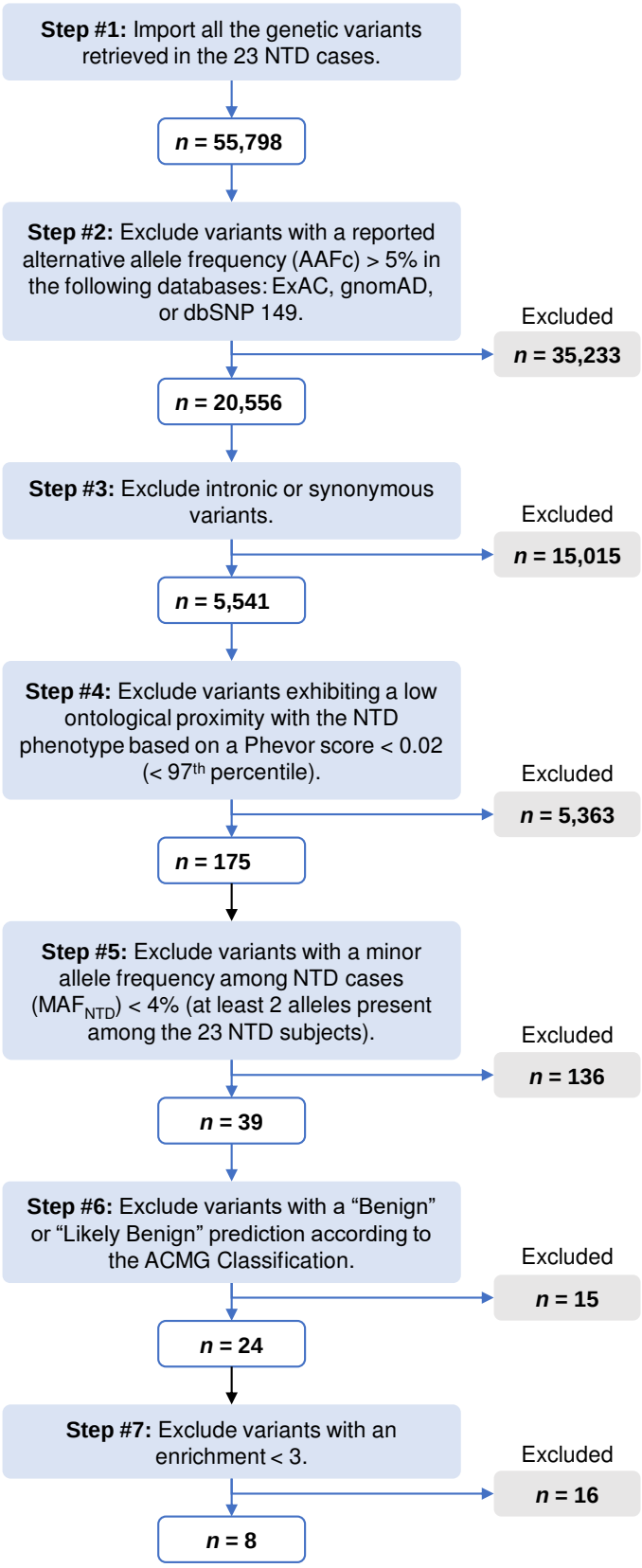


Figure S1. Flow chart of first phase of bio-informatics analysis of genome exome sequencing

Table S4. Beta values in S27 case and NTD control in the TTC40, LINC01166 (alias, LOC101927590), and LINC01168 (alias, LOC399829) locus.

Chromosome	Position	CpG	Gene Name	Minor epi-allele Frequency*	Average β S27	Average β (Controls)	*t*-test *P*-value	*t*-test -log10 *P*-value	Smooth value
10	134621945	cg09753644	*TTC40*	0.066	0.59	0.64	5.41E-01	0.27	0.29
10	134622019	cg26365014	*TTC40*	0.017	0.63	0.68	5.37E-01	0.27	0.28
10	134622487	cg19100900	*TTC40*	0.003	0.73	0.79	2.14E-01	0.67	0.29
10	134622540	cg14923370	*TTC40*	0.001	0.74	0.79	4.92E-01	0.31	0.28
10	134622602	cg17301379	*TTC40*	0.001	0.85	0.88	7.27E-01	0.14	0.27
10	134624132	cg20497668	*TTC40*	0.006	0.73	0.76	6.77E-01	0.17	0.24
10	134628045	cg14126600	*TTC40*	0.001	0.81	0.83	6.97E-01	0.16	0.14
10	134639821	cg03934443	*TTC40*	0.023	0.67	0.64	6.39E-01	0.19	0.12
10	134641582	cg26797529	*TTC40*	0.001	0.86	0.86	9.45E-01	0.02	0.16
10	134645960	cg23908771	*TTC40*	0.001	0.77	0.77	9.78E-01	0.01	0.18
10	134646282	cg18980036	*TTC40*	0.003	0.92	0.88	6.73E-01	0.17	0.17
10	134647259	cg25979994	*TTC40*	0.001	0.83	0.86	3.79E-01	0.42	0.18
10	134647457	cg02562387	*TTC40*	0.006	0.84	0.81	5.49E-01	0.26	0.25
10	134650467	cg25403174	*TTC40*	0.056	0.11	0.12	7.79E-01	0.11	0.34
10	134652760	cg02210222	*TTC40*	0.004	0.75	0.80	5.11E-01	0.29	0.38
10	134662206	cg11426080	*TTC40*	0.039	0.10	0.09	3.09E-01	0.51	0.35
10	134672797	cg07498088	*TTC40*	0.291	0.84	0.61	2.28E-01	0.64	0.35
10	134692616	cg05423768	*TTC40*	0.001	0.77	0.81	3.76E-01	0.42	0.36
10	134692852	cg17481047	*TTC40*	0.079	0.12	0.15	5.68E-01	0.25	0.36
10	134697042	cg08681409	*TTC40*	0.004	0.69	0.74	6.11E-01	0.21	0.41
10	134697093	cg00232816	*TTC40*	0.013	0.63	0.67	6.43E-01	0.19	0.38
10	134697771	cg04496042	*TTC40*	0.006	0.79	0.76	5.48E-01	0.26	0.40
10	134697862	cg19652416	*TTC40*	0.014	0.63	0.74	1.29E-01	0.89	0.39
10	134700254	cg19963839	*TTC40*	0.103	0.55	0.63	3.56E-01	0.45	0.40
10	134703407	cg04718304	*TTC40*	0.003	0.76	0.84	2.72E-01	0.57	0.38
10	134716879	cg04155450	*TTC40*	0.001	0.89	0.90	7.26E-01	0.14	0.41

10	134720057	cg02836233	*TTC40*	0.063	0.94	0.74	5.16E-01	0.29	0.51
10	134724823	cg23693569	*TTC40*	0.026	0.83	0.84	8.13E-01	0.09	0.52
10	134725087	cg18048370	*TTC40*	0.040	0.57	0.61	3.59E-01	0.44	0.50
10	134726665	cg11860238	*TTC40*	0.009	0.91	0.93	2.66E-02	1.57	0.54
10	134726771	cg12319143	*TTC40*	0.119	0.69	0.79	2.79E-01	0.56	0.55
10	134727319	cg22716280	*TTC40*	0.078	0.66	0.76	3.98E-01	0.40	0.57
10	134729332	cg16817435	*TTC40*	0.120	0.82	0.61	3.79E-01	0.42	0.54
10	134730258	cg00676833	*TTC40*	0.063	0.62	0.65	4.66E-01	0.33	0.33
10	134735452	cg16740640	*TTC40*	0.001	0.98	0.97	5.85E-01	0.23	0.31
10	134737191	cg15930085	*TTC40*	0.001	0.87	0.82	5.60E-01	0.25	0.31
10	134739369	cg20654875	*TTC40*	0.001	0.87	0.87	8.01E-01	0.10	0.27
10	134741998	cg02713180	*TTC40*	0.001	0.64	0.69	3.53E-01	0.45	0.23
10	134752049	cg11360416	*TTC40*	0.092	0.15	0.11	4.34E-01	0.36	0.27
10	134752183	cg06579154	*TTC40*	0.060	0.16	0.14	6.98E-01	0.16	0.32
10	134752472	cg13289827	*TTC40*	0.160	0.59	0.60	9.04E-01	0.04	0.49
10	134754286	cg24626659	*TTC40*	0.001	0.74	0.83	2.87E-01	0.54	0.49
10	134754396	cg24411972	*TTC40*	0.001	0.70	0.74	2.61E-01	0.58	0.44
10	134755862	cg25745697	*TTC40*	0.013	0.13	0.09	5.41E-02	1.27	0.44
10	134755955	cg23962250	*TTC40*	0.004	0.04	0.03	3.32E-01	0.48	0.52
10	134756306	cg07421032	*intergenic*	0.004	0.15	0.15	9.86E-01	0.01	0.61
10	134756503	cg03354772	*intergenic*	0.153	0.21	0.19	7.20E-01	0.14	0.71
10	134756610	cg08325191	*intergenic*	0.073	0.05	0.11	2.24E-01	0.65	0.73
10	134756994	cg17000480	*intergenic*	0.081	0.58	0.72	7.13E-02	1.15	1.26
10	134771944	cg26094990	*LOC101927590*	0.001	0.75	0.78	5.16E-02	1.29	2.04
10	134772029	cg12559997	*LOC101927590*	0.024	0.56	0.69	4.23E-02	1.37	2.86
10	**134775542**	**cg01263624**	***LOC101927590***	0.023	**0.30**	**0.10**	**6.41E-05**	**4.19**	**3.57**
10	**134775610**	**cg00912926**	***LOC101927590***	0.042	**0.49**	**0.13**	**3.43E-06**	**5.47**	**3.86**
10	**134775949**	**cg23987897**	***LOC101927590***	0.027	**0.40**	**0.06**	**1.23E-06**	**5.91**	**4.10**
10	**134776050**	**cg17693826**	***LOC101927590***	0.020	**0.31**	**0.02**	**2.41E-06**	**5.62**	**3.94**
10	134778467	cg24680439	*LOC101927590*	0.149	0.24	0.62	6.69E-04	3.17	3.34
10	134778648	cg02276826	*LOC101927590*	0.101	0.41	0.67	1.12E-03	2.95	2.56

10	134785521	cg00056497	*LOC399829*	0.177	0.50	0.58	5.43E-01	0.27	1.80
10	134789042	cg25295723	*LOC399829*	0.001	0.75	0.75	9.66E-01	0.02	1.09
10	134789568	cg12065779	*LOC399829*	0.013	0.14	0.14	9.80E-01	0.01	0.64
10	134791043	cg16756674	*intergenic*	0.004	0.69	0.74	2.58E-01	0.59	0.30
10	134791323	cg03753683	*intergenic*	0.121	0.56	0.65	2.48E-01	0.61	0.30
10	134791352	cg02006950	*intergenic*	0.046	0.80	0.78	9.19E-01	0.04	0.33
10	134791450	cg09784428	*intergenic*	0.029	0.63	0.74	2.62E-01	0.58	0.35

* Minor epi-allele frequencies were calculated on the MARTHA cohort methylome dataset [PMID: 24630777]

Résumé

Les folates sont des vitamines importantes dans le développement neurologique d'un enfant puisqu'elles sont impliquées dans deux pathologies : l'autisme et les anomalies de fermeture du tube neural (AFTN). Une carence en vitamine B9 et la présence de certains polymorphismes des gènes du métabolisme des monocarbones sont associées à un risque augmenté d'anomalies de fermeture du tube neural. A l'inverse, une supplémentation périconceptionnelle en vitamine B9 a permis de réduire l'incidence de ces malformations.Dans le cadre de l'autisme, la présence d'anticorps dirigés contre le récépteur aux folates FR *aplha* au niveau cérébral entraînant une carence en folate cérébral a été décrite avec une fréquence importante chez les enfants autistes. Un traitement par acide folinique permettrait une amélioration des symptômes en corrigeant la carence en folates grâce à un passage médié par le RFC (récépteur non bloqué par les anticorps).

La première partie est une étude clinique randomisée versus placebo réalisée au CHU de Nancy dont le but est d'évaluer l'éfficacité d'un traitement par acide folinique pendant 12 semaines sur la réduction des troubles autistiques. 19 enfants ont été inclus dans l'étude.Une amélioration significative des symptômes autistiques est observée pour le score ADOS dans le groupe traité (p= 0,02), plus particulièrement pour les interactions sociales réciproques (p=0,019). La fréquence des Anticorps anti FR *alpha* au sein du groupe est de 58 %. Il n'y a pas de corrélation observée entre le taux d'anticorps et l'importance de la réponse au traitement. Aucun effet secondaire grave n'a été observé au cours de l'étude.

La seconde partie est une étude par séquençage haut débit d'un large panel de gènes chez des patients présentant des anomalies de fermeture du tube neural (SureSelect Focused Exome Plus (Agilent®)). Le séquençage a été complété par une analyse de méthylation pan-génomique (Infinium HumanMethylation Beadchip (Illumina®)). 23 patients ont été inclus dans l'étude. Plusieurs variants rares ont été identifiés comme associés au risque de AFTN dont des variants de gènes du métabolisme des monocarbones : *LRP2*, rs137983840, p=0,005; *MMAA*, rs148142853, p= 0,005 ;*TCN2*, rs35838082, p=0,044, *FPGS*, rs41306702, p=0,0012, *BHMT*, rs763726268, p= 0,011 et de la voie Sonic Hedgehog (SHH) (*GLI3*, rs35364414, p=0,012). Une différence de méthylation significative a été mise en évidence au niveau du gène *CFAP46* (hémiméthylation versus absence de méthylation chez les contrôles) chez un patient porteur des 4 variants à risque identifiés (*LRP2*, *MMAA*, *BHMT* et *GLI3*).

Ces résultats renforcent l'implication des folates dans ces deux pathologies du neurodéveloppement que sont l'autisme et les anomalies de fermeture du tube neural. Une recherche des anticorps anti-FR*alpha* plus systématique chez les enfants autistes pourrait permettre de proposer un traitement par acide folinique ciblé. Dans le cadre des AFTN, notre étude a mis en évidence l'influence de gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine B12 et monocarbone sur le risque de AFTN. Un nouveau gène candidat (*GLI3*) est identifié ainsi qu'une signature de méthylation mettant en évidence l'influence de la voie SHH.

Mots clés : Autisme – Folates –Anomalie de fermeture du tube neural – Monocarbone - Séquençage

Abstract

Folates are essentials vitamins in children neurodevelopment with an implication in two pathologies : autism and neural tube defects (NTD). Folates deficiency and some polymorphisms of genes involved in one carbon metabolism (OCM) are associated with NTD. Contrary, periconceptional folate supplementation is associated with decreased NTD frequency.In autism, higher frequency of antibodies against Folate Receptor *Alpha* (FR *alpha*) is rapported and associated with folates cerebral deficiency. Folinic acid treatment could improve autistic symptoms by correcting cerebral folate deficiency (cerebral transport mediated by RFC, an other receptor which not blocked by antibodies anti-FR *alpha*).

First part is a randomized controlled trial versus placebo realized in CHU of Nancy in order to evaluate efficiency of folinic acid treatment during 12 weeks on autistic symptoms. 19 children have been included in the study. A significative improvement of autistic symptoms is observed by ADOS score in folinic acid group (p= 0.02) and particularly for mutual social interactions (p=0.012). FR*alpha* antibodies are present in 58 % of the group. We didn't observed correlation between antibodies titers and folinic acid response. No serious adverse effects have been observed during the study.

Second part is hight throughput next generation sequencing of DNA from patients with NTD using SureSelect Focused Exome Plus (Agilent®). Sequencing has been completed with DNA methylation analysis (Infinium HumanMethylation Beadchip (Illumina®)). 23 patients were included in the study. Six variants have been associated with NTD: from genes of B12 metabolism *LRP2*, rs137983840, p=0.005; *MMAA*, rs148142853, p= 0.005 and TCN2, rs35838082, p=0.044), folate cellular metabolism (*FPGS*, rs41306702, p=0.0012; choline metabolism, *BHMT*, rs763726268, p= 0.011) and Sonic Hedgehog pathway(SHH) (*GLI3*, rs35364414, p=0.012). A significative difference of methylation is identified in the vicinity of *CFAP46* gene (hemimethylation versus no methylation in pseudo-controls) in one patient exhibited variants of *BHMT*, *LRP2*et*MMAA*.

These results highlight implication of folates in these two pathologies of neurodevelopment, wich are autism and NTD. Anti-FR*alpha* should be routinely evaluated in case of autism in order to propose folinic acid treatment if they are positives. In the NTD study, we identified new variants from gene from one carbon metabolism probably implicated. A new candidate gene is identified (*GLI3*) and a methylation signature in association with B12 metabolism and OCM gene variants.

Key Words : Autism – Folates –Neural tube defect – One-carbon - Sequencing