



HAL
open science

Conséquences fonctionnelles, comportementales et adaptatives d'une mutation de la MAO (MonoAmine Oxydase) chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*.

Constance Pierre

► **To cite this version:**

Constance Pierre. Conséquences fonctionnelles, comportementales et adaptatives d'une mutation de la MAO (MonoAmine Oxydase) chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*.. Neurosciences. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS084 . tel-02900927

HAL Id: tel-02900927

<https://theses.hal.science/tel-02900927v1>

Submitted on 16 Jul 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.

Conséquences fonctionnelles,
comportementales et adaptatives d'une
mutation de la MAO (MonoAmine Oxydase)
chez le poisson cavernicole aveugle
Astyanax mexicanus.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568, signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat: Neurosciences
Unité de recherche : CNRS, Institut des Neurosciences Paris Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France.
Référent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 26/06/20, par

Constance PIERRE

Composition du Jury

Pierre CAPY Professeur, Université Paris-Saclay	Président
Patricia GASPAR Directrice de recherche émérite INSERM	Rapporteur & Examinatrice
Patrick PRUNET Directeur de recherche, INRA	Rapporteur & Examinateur
Laure BALLY-CUIF Directrice de recherche, CNRS	Examinatrice
Claire WYART Directrice de recherche, INSERM	Examinatrice
Sylvie RETAUX Directrice de recherche, CNRS	Directrice de thèse

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	5
INTRODUCTION ET SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. L'ÉVOLUTION DU COMPORTEMENT ANIMAL.....	7
A. <i>Les forces évolutives dans l'évolution du comportement</i>	7
Sélection : exemple de la coopération avec des individus non apparentés chez <i>Desmodus rotundus</i>	7
Dérive : exemple de la communication chez <i>Brachyhyopomus occidentalis</i>	9
B. <i>Les bases moléculaires et cellulaires de l'évolution du comportement</i>	10
Exemple du comportement de ponte chez <i>Drosophila suzukii</i>	10
Exemple des soins parentaux chez les primates du nouveau monde.....	12
II. LES SYSTEMES MONOAMINERGIQUES	14
A. <i>Le métabolisme des monoamines</i>	14
Synthèse	14
Récepteurs.....	15
Réabsorption	16
Dégradation	17
Contrôle de l'activité des neurones :	18
B. <i>Anatomie des systèmes monoaminergiques</i>	20
Chez les mammifères.....	20
Chez les poissons	22
C. <i>Les fonctions des systèmes monoaminergiques</i>	26
Les fonctions comportementales	26
Les fonctions physiologiques périphériques	27
Les fonctions développementales	29
Pathologies liées aux monoamines.....	31
D. <i>La monoamine oxydase (MAO)</i>	31
Les MAOs des mammifères	31
La MAO des poissons	34
Déficiences MAO	34
III. LE MODELE <i>ASTYANAX MEXICANUS</i>	36
A. <i>Deux morphotypes, différentes populations</i>	36
B. <i>Environnement naturel</i>	37
Caractéristiques du milieu cavernicole :	37
Caractéristiques du milieu en surface :	38
C. <i>Description du modèle</i>	38
Caractères morphologiques :	38
Caractères comportementaux :	40
Caractères physiologiques :	42
Convergences :	43
D. <i>Les comportements chez Astyanax et leurs liens avec les monoamines</i>	45
Agressivité	45
Nage en banc	48
Locomotion.....	52
Stress	56
E. <i>Techniques, avantages et désavantages du modèle Astyanax mexicanus</i>	73
Avantages et désavantages généraux :	73
L' <i>Astyanax</i> comme modèle d'étude de l'évolution :	73
L' <i>Astyanax</i> comme modèle d'étude de pathologies humaines :	75
ARTICLE 1 « A MUTATION IN MONOAMINE OXIDASE (MAO) AFFECTS THE EVOLUTION OF STRESS BEHAVIOR IN THE BLIND CAVEFISH <i>ASTYANAX MEXICANUS</i> », SOUMIS À J. EXP. BIOL.....	77
INTRODUCTION	78
METHODS.....	79
RESULTS	83
<i>Distribution of mao alleles in wild A. mexicanus populations</i>	83
<i>mao P106L does not affect the neuroanatomy of monoaminergic systems</i>	84

<i>The mao P106L mutation and the cavefish “behavioral syndrome”</i>	86
<i>Effects of the mao P106L mutation on stress behaviors and stress hormones</i>	89
<i>Effects of P106L mutation on other candidate phenotypes</i>	91
DISCUSSION.....	92
<i>mao alleles in the wild</i>	92
<i>Cavefish behavior</i>	92
<i>mao P106L: selected or not?</i>	95
SUPPLEMENTAL FIGURES AND VIDEOS:	97
ANNEXES À L’ARTICLE 1 « A MUTATION IN MONOAMINE OXIDASE (MAO) AFFECTS THE EVOLUTION OF STRESS BEHAVIOR IN THE BLIND CAVEFISH ASTYANAX MEXICANUS »	102
<i>Annexe 1 : Nage en surface de l’aquarium</i>	102
<i>Annexe 2 : Effet d’un traitement au deprenyl sur l’activité locomotrice</i>	103
<i>Annexe 3 : Activité locomotrice à 2 semaines</i>	104
ARTICLE 2 « THE ENZYMATIC AND NEUROCHEMICAL OUTCOMES OF A MUTATION IN CAVEFISH MAO REVEAL TELEOST-SPECIFIC ASPECTS OF BRAIN MONOAMINE HOMEOSTASIS », MANUSCRIT EN PRÉPARATION.....	105
INTRODUCTION	106
METHODS.....	107
RESULTS	108
<i>The P106L mutation decreases the enzymatic activity of A. mexicanus MAO.</i>	108
<i>The P106L mutation probably limits entrance of the substrate to the enzyme active site.</i>	109
<i>The P106L mutation affects monoamines homeostasis.</i>	110
The P106L mutation increases monoamine levels and decreases metabolite levels in the brain, in a region-specific manner..	110
P106L mutant CF show a reduced TPH activity.....	112
A chronic treatment with deprenyl does not mimic the P106L genetic mutation.....	113
Measuring fish MAO activity on dopamine as a substrate.	114
DISCUSSION.....	115
<i>mao P106L: specific considerations related to cavefish biology</i>	115
<i>General considerations on MAO and 5-HT system in fish</i>	116
<i>General considerations on MAO-dependent brain chemistry</i>	117
<i>Conclusion and perspectives</i>	118
SUPPLEMENTAL FIGURE:.....	119
<i>Annexe 4 : Rythmes circadiens des monoamines</i>	120
GENERATION ET DEBUT DE CARACTERISATION DE DEUX LIGNEES ASTYANAX DE SURFACE MAO KNOCKOUT (KO)	123
MATERIEL ET METHODES.....	123
RESULTATS	124
<i>Génération de lignées mao KO</i>	124
<i>Aspect général</i>	126
<i>Neuroanatomie des systèmes dopaminergique et sérotoninergique</i>	127
<i>Motilité intestinale</i>	130
<i>Comportement des poissons KO hétérozygotes (+/-)</i>	130
DISCUSSION.....	132
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS, PERSPECTIVES.....	135
REMERCIEMENTS.....	139
RÉFÉRENCES.....	140
ARTICLES DE REVUES PUBLIES.....	157

Introduction générale

Pourquoi la vie est-elle ce qu'elle est aujourd'hui ? Pourquoi la Terre est-elle ce qu'elle est aujourd'hui ? Ces deux questions m'ont toujours fasciné. C'est pourquoi j'ai toujours choisi la formation la plus académique possible et c'est tout naturellement que je me suis dirigée vers une thèse.

J'ai choisi un sujet de thèse se rapportant à l'évolution des espèces et à leur adaptation à un nouvel environnement. Le sujet aborde non seulement les forces évolutives mises en jeu, mais aussi les mécanismes moléculaires, cellulaires, neuronaux, comportementaux et physiologiques qui sous-tendent l'adaptation à un nouvel environnement.

L'approche pluridisciplinaire m'a énormément plu, à la fois de manière théorique et dans la pratique. De manière théorique, la pluridisciplinarité permet une approche très intégrée, elle permet de se pencher sur une question par toutes les directions, sans laisser de zone d'ombre, et en prenant en compte le plus de paramètres possibles. C'est donc une approche qui me semblait intéressante et rigoureuse.

Dans la pratique, l'approche pluridisciplinaire m'a permis de réaliser des expériences énormément variées, allant de la modélisation 3D de molécules aux études sur le terrain, en passant par l'étude du comportement animal et de l'imagerie du cerveau. Bien que je ne me destine pas à une carrière de chercheur, ce sujet m'a permis d'apprendre beaucoup de techniques expérimentales. Enfin, diversifier les axes de recherche permet de sécuriser la thèse, je n'étais à aucun moment dépendante du bon fonctionnement d'une expérience pour poursuivre.

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse utilise le poisson *Astyanax mexicanus*, qui est un excellent modèle pour étudier l'adaptation à un nouvel environnement. Il existe sous deux formes interfertiles : une forme vivant dans les rivières et points d'eau d'Amérique Centrale, et une forme vivant dans des grottes de la région Nord-Est du Mexique. L'ancêtre commun aux deux formes a colonisé les grottes il y a environ 20 000 ans et les poissons se sont ensuite adaptés à l'obscurité totale et permanente des grottes.

Les deux formes diffèrent sur beaucoup d'aspects morphologiques et physiologiques. Le poisson cavernicole est aveugle et dépigmenté. Les deux formes diffèrent aussi sur beaucoup d'aspects comportementaux. Le poisson cavernicole est très peu agressif, il ne nage pas en banc, dort très peu, est attiré par les vibrations et a un sens de l'odorat très développé. L'ensemble de ces traits comportementaux sont regroupés sous le terme de « syndrome comportemental de l'*Astyanax* cavernicole », et, comme les modifications anatomiques et physiologiques, sont probablement adaptatifs pour la vie dans les grottes.

Les poissons cavernicoles de la grotte Pachón portent une mutation dans le gène de la monoamine oxydase (MAO, mutation P106L), l'enzyme qui dégrade la sérotonine. Cette mutation cause une réduction de l'activité enzymatique de la MAO et une élévation des taux de monoamines cérébraux. Etant donné l'implication des monoamines dans le développement, la physiologie et le comportement, la mutation P106L pourrait être responsable de certains traits phénotypiques spécifiques au poisson cavernicole et participer à l'adaptation du poisson à son environnement cavernicole.

Dans cette thèse, je me suis intéressée aux effets de la mutation P106L à différentes échelles, allant de l'échelle moléculaire avec des modélisations en 3D des protéines mutées ou non, à l'échelle des populations avec la construction d'une carte de répartition des allèles mutés dans le milieu naturel. Nous nous sommes tout particulièrement focalisés sur les effets comportementaux de la mutation P106L, en étudiant l'agressivité, la nage en banc, la locomotion, la prise alimentaire et les comportements de stress. La mutation comme responsable de tout ou partie du syndrome comportemental de l'*Astyanax* cavernicole et donc son rôle dans l'évolution du comportement chez l'*Astyanax* cavernicole était notre première hypothèse de travail.

Ce manuscrit se compose de six parties. Tout d'abord une introduction détaillée faisant une synthèse bibliographique sur les sujets abordés par la suite. Puis les deux articles écrits pendant cette thèse sont présentés. Le premier traite des effets de la mutation MAO P106L sur les réseaux neuronaux et le comportement, et ses aspects évolutifs, notamment avec une discussion sur son implication dans l'adaptation du poisson cavernicole à son environnement. Le second article porte sur les effets moléculaires, enzymatiques et neurochimiques de la mutation MAO P106L. La quatrième partie porte sur le début de caractérisation du

poisson KO *mao*. La cinquième partie est une conclusion générale du travail de thèse et ses perspectives pour la suite. Enfin, deux articles de revues publiés en 2018 et 2020 auxquels j'ai participé en tant que co-auteur clôturent ce manuscrit.

Introduction et synthèse bibliographique

I. L'évolution du comportement animal

Lorsque l'on s'intéresse à l'évolution d'un trait phénotypique, comportemental ou non, deux grandes questions peuvent se poser.

La première concerne les forces évolutives mises en jeu lors de l'évolution de ce trait phénotypique, et son éventuelle valeur de survie. Est-ce que ce trait s'est propagé dans la population par la sélection naturelle ou par dérive génétique ? En cas de sélection naturelle, est-ce que ce trait donne un avantage aux individus qui le portent ? Et si oui, lequel ?

La deuxième question concerne les bases moléculaires et cellulaires de l'évolution de ce trait phénotypique. Quels changements sont à l'origine de la modification de ce trait : des mutations, des changements d'expression de gènes, des modifications cellulaires, physiologiques...

En ce qui concerne l'étude comparée des comportements animaux, Nikolaas Tinbergen a formalisé et formulé ses « quatre questions fondamentales en éthologie », qui en couvrent tous les aspects :

- Causalité immédiate : quels sont les facteurs internes ou externes qui déclenchent un comportement ?
- Fonction : quelle est la fonction de ce comportement, quelle est son utilité pour la survie de l'animal à court ou long terme ?
- Ontogenèse : comment ce comportement se met-il en place au cours du développement de l'individu ?
- Phylogenèse : comment ce comportement est-il apparu au cours de l'évolution, est-il partagé avec d'autres espèces ?

La causalité immédiate et l'ontogenèse sont regroupées sous le terme de « causes proximales » tandis que la fonction et l'évolution sont rassemblées sous le terme de « causes ultimes ». Ces quatre questions continuent encore à définir les axes de recherche de l'éthologie moderne de nos jours.

Dans cette première partie de l'introduction, nous allons voir quelques exemples d'études de l'évolution du comportement animal, en nous intéressant tout d'abord aux forces évolutives (causes ultimes), puis aux mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques (causes proximales) qui sous-tendent l'évolution du comportement.

A. Les forces évolutives dans l'évolution du comportement

Sélection : exemple de la coopération avec des individus non apparentés chez

Desmodus rotundus

Les comportements de coopération sont apparus chez de nombreuses espèces sociales, de clades différents (insectes, poissons, mammifères...).

La coopération envers les individus apparentés peut apparaître si le succès reproducteur de l'individu apparenté augmente assez et compense les coûts envers son propre succès reproducteur. Hamilton a introduit la notion de « fitness inclusive », qui est une mesure de la fitness d'un individu, prenant en compte ses propres descendants (fitness directe) et les descendants des individus apparentés (fitness indirecte). La coopération avec les individus non-apparentés permet d'augmenter la fitness directe s'il y a réciprocité (Hamilton, 1964).

Les chauves-souris vampires *Desmodus rotundus* se nourrissent en buvant le sang de mammifères. Elles ont peu de réserves énergétiques et sont contraintes de manger fréquemment. Des réseaux sociaux stables de 8 à 12 femelles se forment, où les individus s'échangent par régurgitation du sang en cas d'échec dans la recherche de nourriture. La coopération avec les individus apparentés augmente à la fois la fitness directe (survie immédiate) et indirecte (sélection de parentèle). Les chauves-souris ne coopèrent pas seulement avec les

individus apparentés. Leur réseau de coopération inclut aussi des individus non-apparentés, ce qui, grâce à la réciprocité, augmente leur fitness directe. Cependant, les chauves-souris peuvent aider des individus non-apparentés, alors même que des individus apparentés partagent le même nid (Wilkinson, 1984). Dans ce cas-là, les chauves-souris n'augmentent que leur fitness directe, alors qu'aider des individus apparentés présents augmenteraient aussi leur fitness indirecte.

Nous pouvons donc nous demander si aider les individus non-apparentés alors que des apparentés sont présents aurait un avantage sélectif ?

Pour chaque individu, Carter and Wilkinson, (2015) ont retiré le donneur principal, puis mesuré la quantité de nourriture reçue de congénères. Ils ont aussi mesuré la tendance ou non des sujets à nourrir des individus non apparentés. Les femelles ayant tendance à coopérer avec des individus non apparentés reçoivent plus de nourriture lorsque leur donneur principal est enlevé du groupe. La coopération avec les individus non apparentés prédit donc le succès des donations lorsque le donneur primaire est retiré. **Figure I.A.1A**

Retirer le donneur principal s'accompagne d'une réduction de la quantité de nourriture obtenue (**Figure I.A.1B**). Ceci montre que le donneur principal n'est pas immédiatement remplacé en cas d'absence. La quantité de nourriture reçue dépend alors du nombre de relations de coopération établies. Plus il est élevé, moins le coût lié à la perte du donneur principal est grand. Les coopérations avec les individus non-apparentés permettraient donc de créer et de maintenir un grand réseau de donneurs potentiels et d'améliorer la survie en cas de perte de donneurs.

La coopération pourrait avoir émergé à travers la sélection de parentèle, puis se stabiliser et se répandre aux individus non-apparentés grâce au bénéfice de fitness directe (Axelrod and Hamilton, 1981; Trivers, 1971).

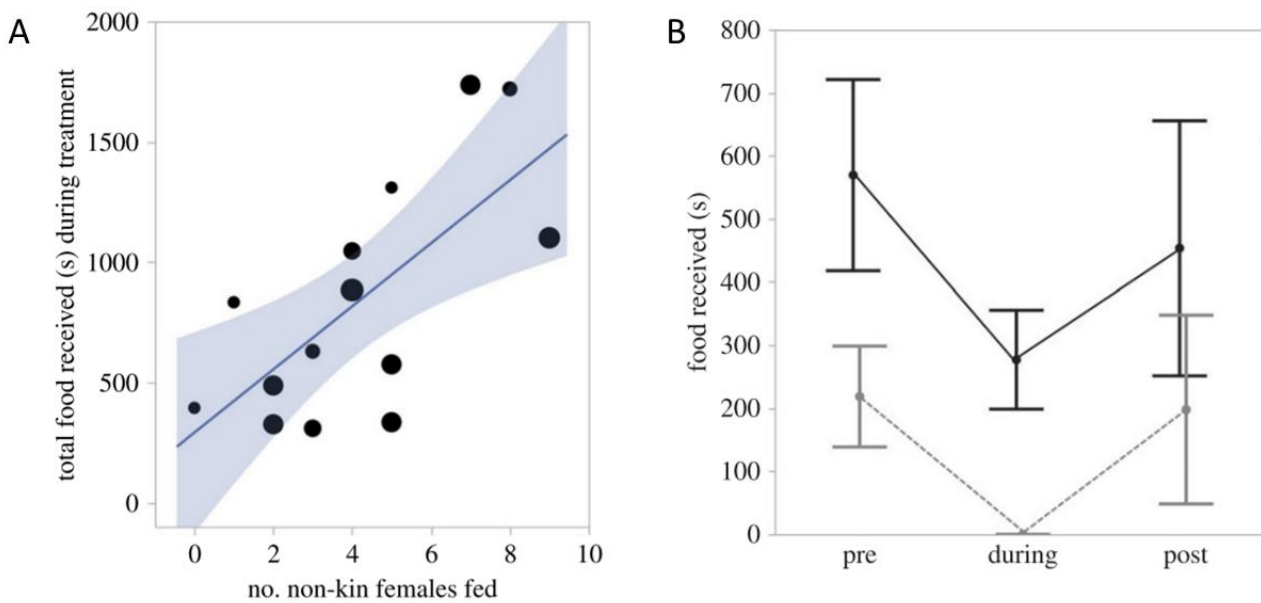


Figure I.A.1. Quantité de nourriture reçue après la disparition d'un donneur principal.

(A) Le nombre de femelles non apparentées nourries par un individu entre 2010 et 2014 prédit la quantité de nourriture reçue pendant la période d'absence du donneur principal. Plus un individu nourrit de femelles non apparentées, plus il recevra de nourriture lors de l'absence de son donneur principal.

(B) Moyenne de la quantité de nourriture perçue avant (pre), pendant et après (post) l'absence du donneur principal. La moyenne et les intervalles de confiance (95%) de la quantité de nourriture reçue au total (noir) et du donneur principal (gris). (Carter and Wilkinson, 2015)

Dérive : exemple de la communication chez *Brachyhypopomus occidentalis*

Les signaux de communication ont beaucoup de fonctions : défendre le territoire, attirer les partenaires sexuels, donner une indication de sa valeur sélective et éviter les reproductions inter-espèces. Les Mormyriiformes d’Afrique et les Gymnotiformes d’Amérique du Sud ont développé indépendamment une électroréception qui leur permet de communiquer et de localiser des objets de leur environnement. Ils possèdent un organe électrique qui produit un faible champ électrique (electric organ discharge, EOD) autour d’eux. Grâce à des électrorécepteurs situés sur leur peau, ils peuvent détecter les perturbations de leur propre champ électrique induites par des obstacles ou les champs électriques des congénères. Les EOD des poissons électriques diffèrent beaucoup selon les familles, les genres et les espèces (Sullivan et al., 2000). De multiples hypothèses, non exclusives ont été proposées pour expliquer cette divergence, dont la dérive génétique (Gallant et al., 2011), la sélection sexuelle (Arnegard et al., 2010; Feulner et al., 2009), et l’adaptation à des environnements avec différents prédateurs électro-sensibles (Stoddard, 1999).

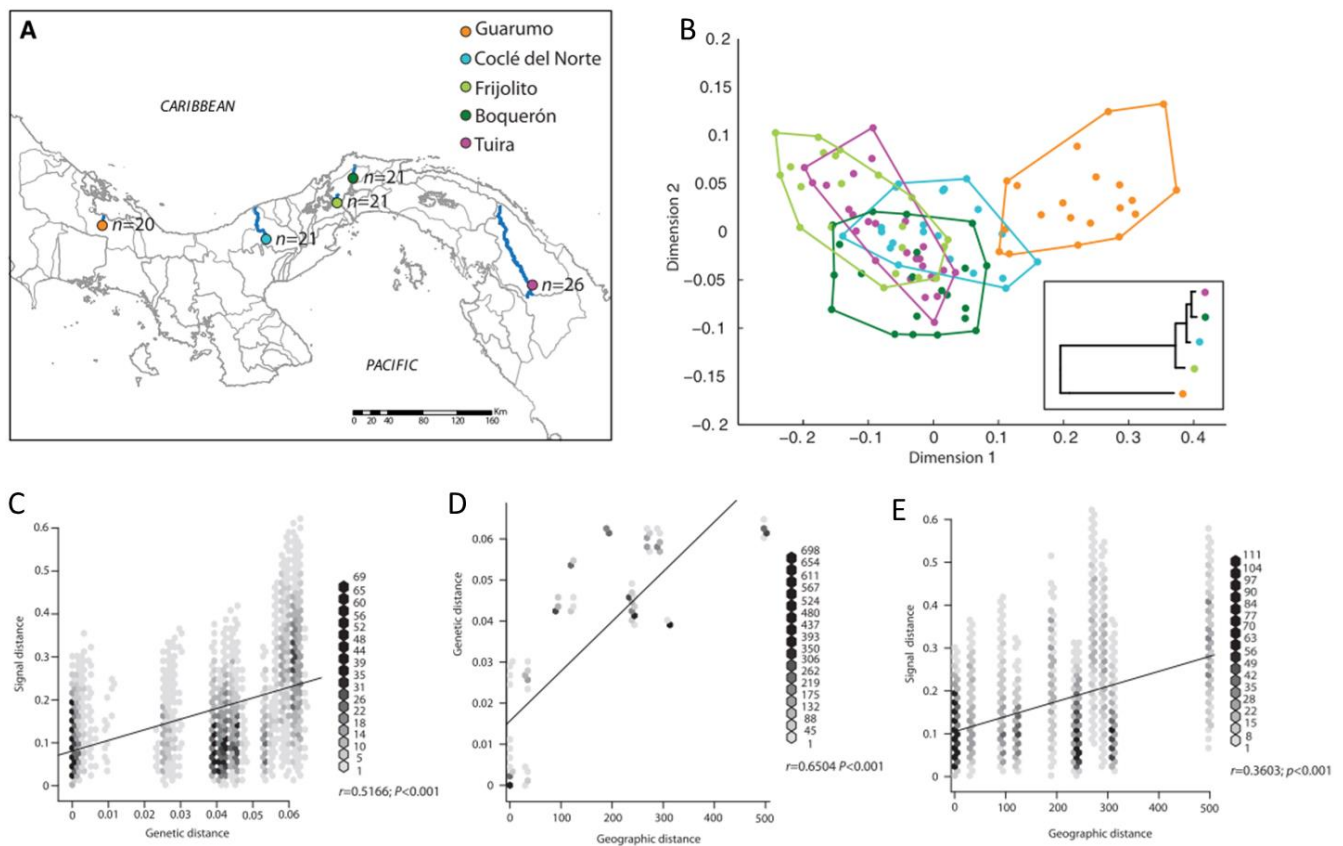


Figure I.A.2: Diversité des EOD chez *B. occidentalis* et les corrélations avec les distances génétiques et géographiques.

(A) Carte indiquant les cinq sites d’enregistrement et d’échantillonnage de *B. occidentalis* au Panama : Guarumo (orange), Coclé del Norte (bleu), Tuira (violet), Frijolito (vert clair) et Boquerón (vert foncé). Les rivières respectives sont indiquées en bleu. La taille de l’échantillonnage est indiquée pour chaque site. Les lignes grises indiquent les différents bassins versants au Panama.

(B) Polygones minimaux incluant les signaux EOD de chaque site d’enregistrement, dans une représentation bidimensionnelle du signal. Chaque point représente l’EOD d’un mâle enregistré ($n = 109$).

(C, D, E) Corrélations entre la divergence des signaux et la distance génétique (C), entre la distance génétique et la distance géographique (D), et entre la divergence des signaux et la distance géographique (E). Les couleurs les plus foncées indiquent une plus forte densité de points. (Picq et al., 2016)

Picq et al., (2016) se sont intéressés au poisson électrique *Brachyhypopomus occidentalis*, qui présente une histoire complexe de colonisation de l'Amérique centrale, menant à l'apparition de lignages très divergents (Picq et al., 2014) (Figure I.A.2A). Les signaux électriques produits par ces lignages sont aussi très différents (Figure I.A.2B). Picq et al., (2016) ont relevé une forte corrélation entre la divergence des signaux électriques et les distances génétiques et géographiques séparant les différents lignages (Figure I.A.2C-2E). Ceci suggère que les signaux divergents entre les populations de *B. occidentalis* ont évolué principalement grâce à la dérive, où des variations stochastiques et neutres se sont accumulées avec le temps dans ces populations isolées. Cependant, même si la force évolutive dominante ici est la dérive, l'implication des autres forces évolutives, comme la sélection n'est pas exclue.

D'autres études sur la souris *Scotinomys teguina* (Campbell et al., 2010), la grenouille *Allobates femoralis* (Amézquita et al., 2009) et le pouillot verdâtre (Irwin et al., 2008) ont aussi montré que la divergence acoustique intraspécifique est largement stochastique. La dérive a donc un rôle important dans l'évolution de la communication chez ces espèces.

La dérive peut donc être la force évolutive dominante lors de l'évolution d'un comportement.

B. Les bases moléculaires et cellulaires de l'évolution du comportement

Exemple du comportement de ponte chez *Drosophila suzukii*

Drosophila suzukii est une espèce nuisible pour l'agriculture et envahissante. Elle s'est propagée de l'Asie du Sud-Est à l'Europe et à l'Amérique du Nord au cours de la dernière décennie. Alors que la plupart des espèces du genre *Drosophila* pondent leurs œufs sur des fruits pourris, *Drosophila suzukii* pond sur des fruits frais. Figure I.B.1

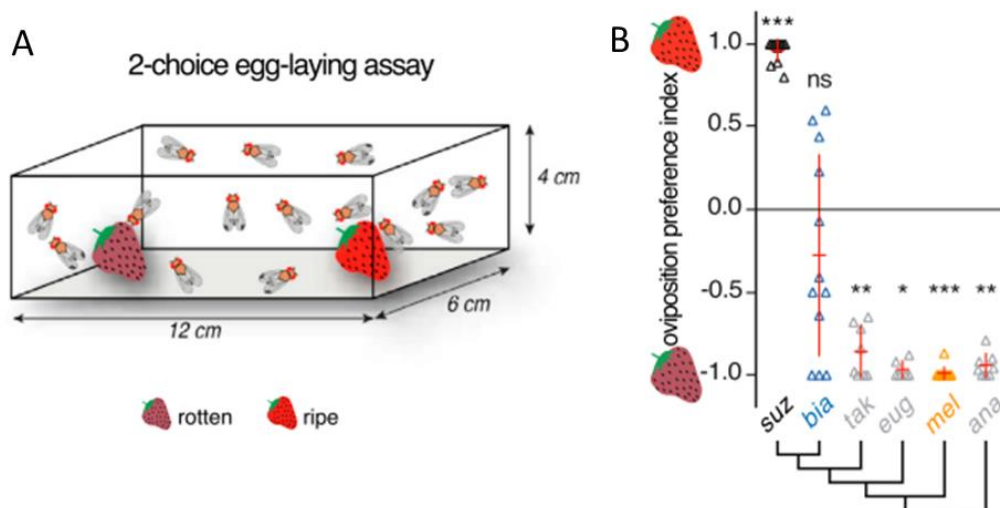


Figure I.B.1. Les femelles *D. suzukii* ont une préférence de ponte pour les stades précoces de la maturation des fraises.

(A) Test de choix de ponte sur fruits entiers. Dix femelles (mêlées avec cinq mâles) peuvent déposer leurs œufs sur deux substrats différents : des fraises fraîches ou pourries. Les œufs sont ensuite comptés sur les deux substrats.

(B) Préférence de ponte (mesurée avec le protocole décrit en A) de six espèces apparentées de drosophile. Alors que la plupart des espèces ont une préférence nette pour les fruits pourris, les femelles de *D. suzukii* ont une préférence radicalement différente. De manière intéressante, les femelles de *D. biarmipes*, une espèce très proche de *D. suzukii* ont une faible préférence, mais non significative, pour les fruits pourris. (Karageorgi et al., 2017)

Lorsque l'on donne le choix aux mouches entre de l'agarose de deux textures plus ou moins solides, *D. suzukii* pond préférentiellement sur les substrats plus solides. Les mouches préfèrent aussi les odeurs de fruits frais aux odeurs de fruits pourris. Les indices olfactifs et de texture permettent donc à *D. suzukii* de choisir et de pondre sur les fruits frais plutôt que pourris. L'ablation des neurones exprimant le co-récepteur *Orco*, nécessaire à l'olfaction, abolit la ponte induite par les odeurs. Le sens de l'olfaction est donc nécessaire à la ponte induite par les odeurs (Karageorgi et al., 2017).

La préférence de *D. suzukii* pour les fruits frais serait-elle liée à des changements dans les gènes des récepteurs olfactifs ?

L'olfaction chez les insectes est médiée par plusieurs types de protéines olfactives, dont les récepteurs olfactifs (ORs), une sous-famille des récepteurs ionotropiques exprimés dans les antennes (aIRs), et leurs protéines liant les odeurs associées (OBPs) (Sánchez-Gracia et al., 2009).

Ramasamy et al., (2016) se sont intéressés aux bases génétiques de la préférence de *D. suzukii* pour les fruits frais. Ils ont répertorié les gènes de l'olfaction chez plusieurs espèces de drosophile, dont *D. suzukii* et ont analysé les taux de variation des gènes inter-espèces. Les gènes d'OR et d'OBP de *D. suzukii* ont accumulé plus de duplications, quadruplications et pertes de fonctions que chez la plupart des autres espèces de drosophiles. Le nombre de mutations synonymes des gènes OR est aussi plus faible chez *D. suzukii* que chez son plus proche parent *D. biarmipes*, ce qui est le signe d'une sélection positive.

Chez *D. melanogaster*, les récepteurs OR5a et OR22a répondent aux molécules ethyl 3-hydroxybutyrate et ethyl/methyl hexanoate, des composés produits durant la fermentation de bactéries et de levures lorsqu'un fruit pourrit. Chez *D. suzukii*, ces gènes ont subi des mutations, ce qui s'accompagne d'une perte de leur fonction originelle. Ils ne répondent plus à ces composés issus de la fermentation des fruits pourris. Ce changement de structure et de fonction des récepteurs olfactifs a probablement participé au changement de préférence de *D. suzukii* pour les fruits frais. Figure I.B.2A et 2B

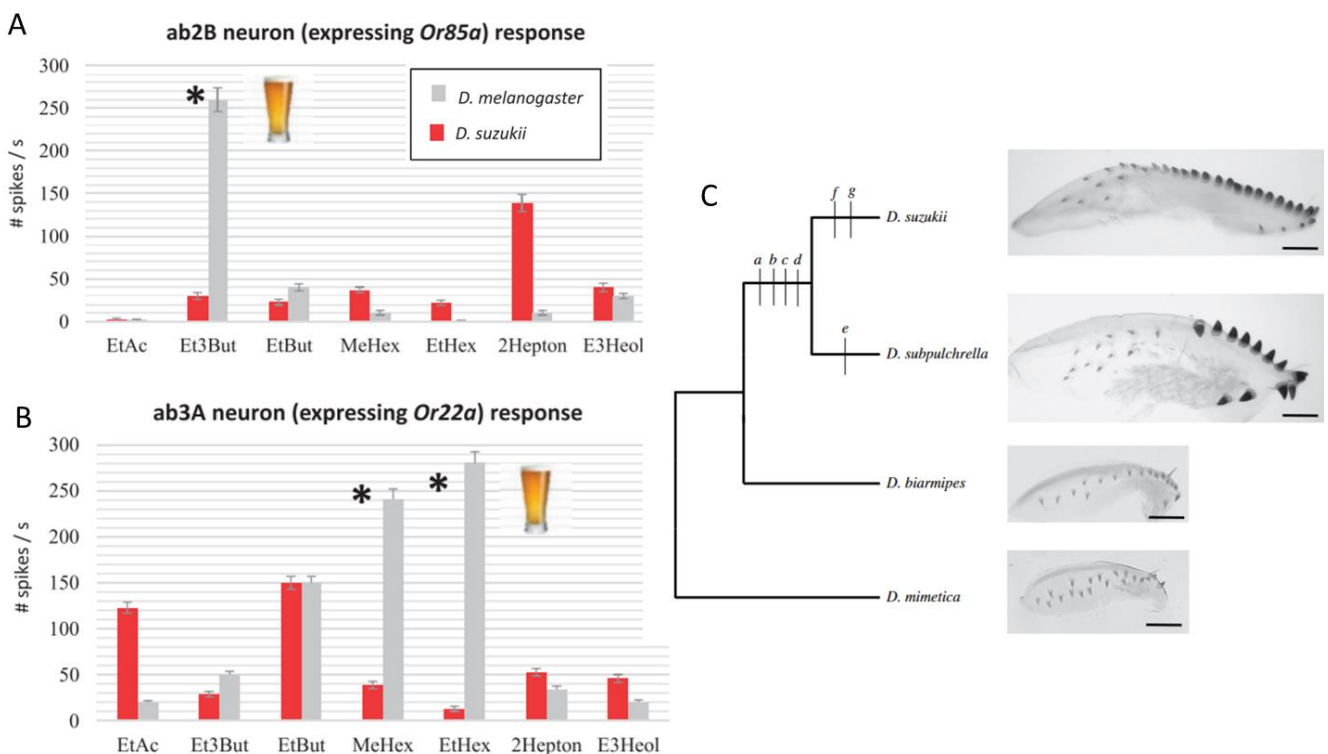


Figure I.B.2. Modifications neuronales et morphologiques chez *D. suzukii*.

(A, B) Réponses des neurones ab2B et ab3A chez *D. suzukii* comparées à celles de *D. melanogaster*. Les récepteurs Or85a et Or22a présentent un changement d'affinité pour certaines molécules odorantes. EtAc : ethyl acetate, Et3But : ethyl 3-hydroxybutyrate, EtBut : ethyl butyrate, MeHex : methyl hexanoate, EtHex : ethyl hexanoate, 2Hepton : 2 heptanone, E3Heol : (E)-3-hexenol. (Ramasamy et al., 2016)

(C) Modèle de l'évolution des ovipositeurs. Les lettres indiquent les changements évolutifs. (a) Augmentation de l'aire de l'ovipositeur. (b) Modification des pointes de l'ovipositeur (plus larges, pigmentées). (c) Ovipositeur plus pointu. (d) Capacité de perçage de la peau des framboises et des fraises. (e) Evolution du bulbe distal. (f) Augmentation du ratio longueur/largeur. (g) Capacité de perçage de la peau des raisins. Echelle, 50mm. (Atallah et al., 2014)

Le changement de lieu de ponte est aussi permis par une évolution de la morphologie de l'ovipositeur des femelles. Celui-ci est plus large et acéré chez *D. suzukii*, ce qui permet de percer la paroi, plus dure, des fruits frais (Atallah et al., 2014). [Figure I.B.2C](#)

Des modifications progressives de modalités sensorielles (olfactives, de texture) associées à des modifications physiques (ovipositeur) ont donc permis l'émergence d'un décalage des sites de pontes, depuis les fruits pourris vers les fruits plus frais chez *D. suzukii*.

Exemple des soins parentaux chez les primates du nouveau monde

L'ocytocine est un peptide agissant à la fois comme neurotransmetteur et comme hormone. Elle se fixe sur le récepteur OTXR et les récepteurs à la vasopressine AVPR1a, AVPR1b et AVPR2 avec une plus faible affinité (Koshimizu et al., 2012). Ces récepteurs sont couplés à des protéines G et leur activation induit une cascade de signalisation cellulaire. Les récepteurs activés sont phosphorylés, recrutent la β -arrestine, ce qui provoque leur internalisation. La β -arrestine recrute aussi des protéines et peut être le point de départ de cascades de signalisation intra-cellulaires (Luttrell et al., 2001). Chez les mammifères, l'ocytocine joue un rôle dans les contractions utérines lors de la parturition, l'éjection du lait lors de la lactation, et les comportements sociaux et reproducteurs comme les soins parentaux.

Les singes du nouveau monde (New World Monkeys, NWMs) présentent des comportements reproducteurs rares parmi les primates, comme le soin paternel (Kleiman, 1985) et la monogamie (Leutenegger, 1980).

Lee et al., (2011) ont trouvé une substitution T \rightarrow C chez quatre singes du nouveau monde appartenant à la famille des Cebidae, changeant une leucine en une proline dans la chaîne d'acides aminés de l'ocytocine (Pro⁸OXT). Dans le genre *Saguinus*, appartenant aussi à cette famille, une substitution supplémentaire est retrouvée, une isoleucine remplacée par une valine en position 3 (Val³Pro⁸OXT). Ces variants portent des marqueurs de sélection (Vargas-Pinilla et al., 2015).

Parreiras-E-Silva et al., (2017) ont mesuré la capacité d'activation des récepteurs OTXR par les différents variants de l'ocytocine (Leu⁸OXT, Pro⁸OXT et Val³Pro⁸OXT). Les trois variants agissent comme des agonistes pleins du récepteur OTXR, mais aucune différence d'activation des récepteurs n'est mesurée entre les trois variants ([Figure I.B.3A](#)). En revanche, les variants des NWMs recrutent moins la β -arrestine que le variant Leu⁸OXT et provoquent moins d'internalisation du récepteur. Ceci pourrait induire une signalisation de l'ocytocine plus longue dans le temps. [Figure I.B.3B et 3C](#)

Parreiras-E-Silva et al., (2017) ont ensuite traité des rats avec les différents variants de l'ocytocine, et ont mesuré les soins parentaux dans un test de récupération des petits. Les femelles traitées avec les variants de l'ocytocine des NWMs retrouvent leurs petits plus vite, montrant une motivation plus élevée. Chez les mâles, le traitement à l'ocytocine, tous variants confondus, diminue le temps de récupération. Le traitement au variant Val³Pro⁸OXT diminue encore plus le temps de récupération des petits. Le traitement aux variants de l'ocytocine des NWMs stimule donc ce soin parental chez le rat. [Figure I.B.4](#)

Les variations de séquence de l'ocytocine chez la famille Cebidae des singes du nouveau monde modifient donc la signalisation cellulaire des cellules réceptrices de l'ocytocine, et ont donc probablement participé à l'évolution du comportement de soin parental, amplifié chez cette famille.

L'étude des bases moléculaires et cellulaires de l'évolution d'un comportement passe donc par la recherche de gènes candidats, de leurs éventuelles modifications (expression, séquence), par l'étude des effets de ces modifications, et enfin par une validation fonctionnelle.

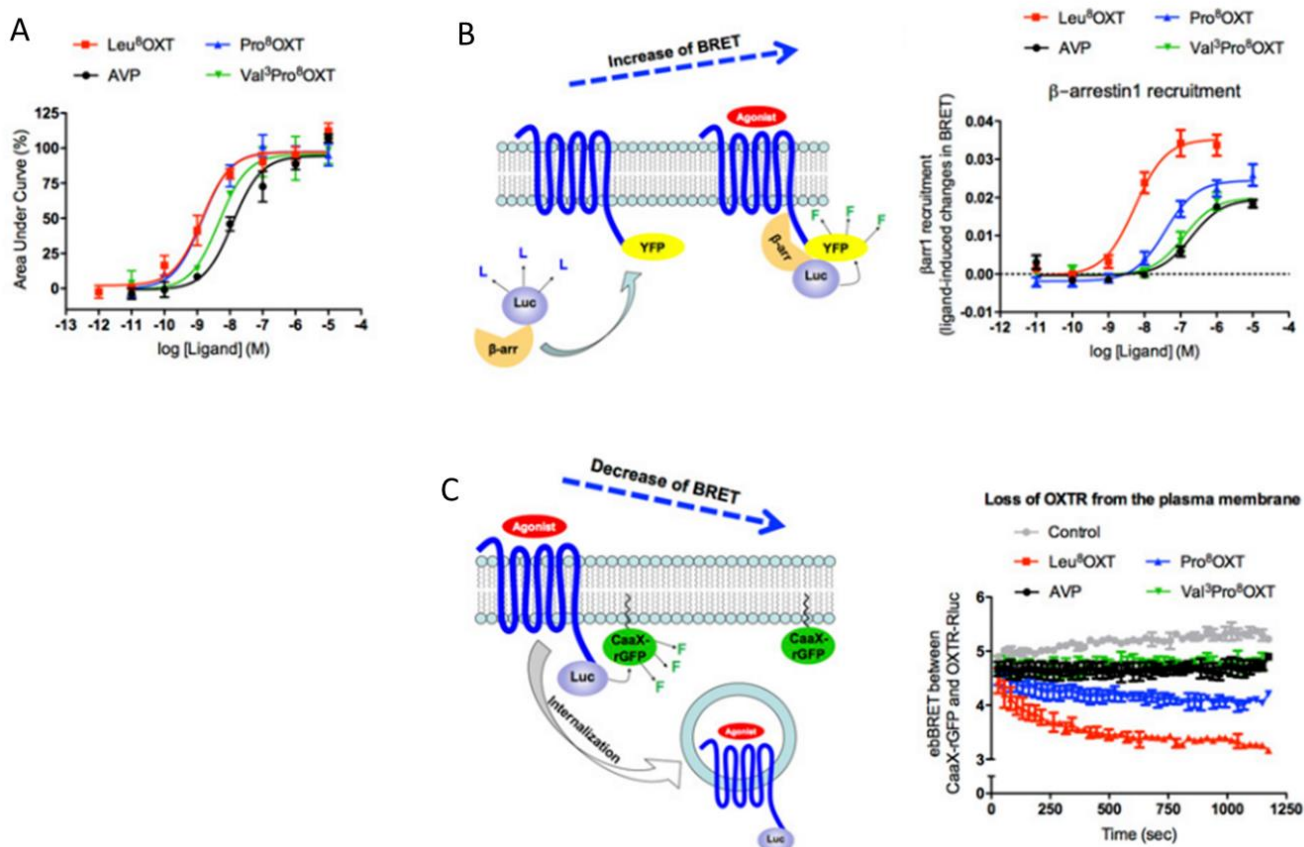


Figure I.B.3. Activation du récepteur OTXR, recrutement de la β -arrestin et l'internalisation du récepteur avec différentes formes d'oxytocine (OTX).

Les différentes formes de l'OTX et l'AVP ont été analysées fonctionnellement par : (A) la mobilisation du calcium, (B) le recrutement de la β -arrestin, et (C) la cinétique d'internalisation de OXTR induite par 100 nM de ligand. Le recrutement de la β -arrestin et l'internalisation du récepteur ont été mesurés par BRET, comme montré sur les schémas (B) et (C). (Parreiras-E-Silva et al., 2017)

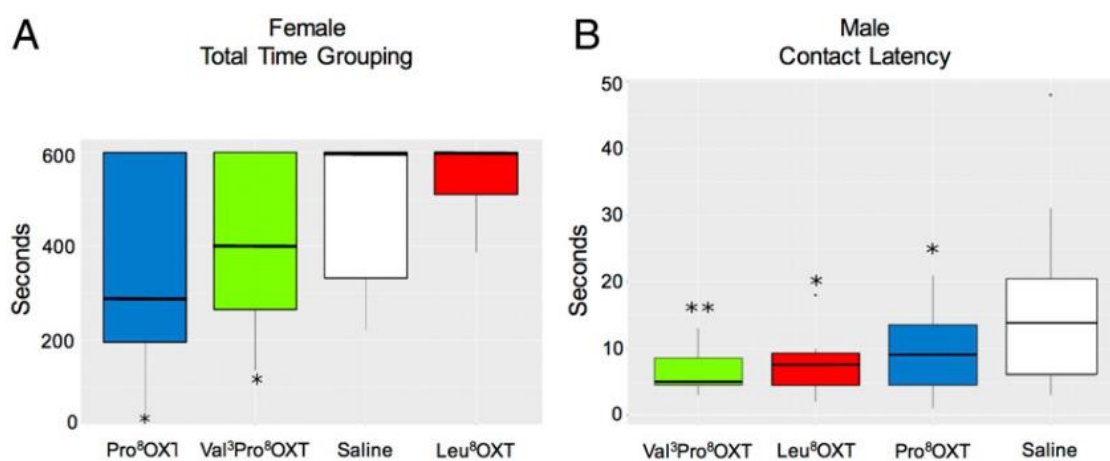


Figure I.B.4. Soins parentaux chez les rats traités avec l'oxytocine.

(A) Temps mis par les femelles pour regrouper tous les petits dans le nid. (Comparaisons avec Leu⁸OXT). (B) Temps de latence des mâles pour le premier contact avec les petits (comparaisons avec « saline »). (Parreiras-E-Silva et al., 2017)

II. Les systèmes monoaminergiques

Les monoamines sont des neurotransmetteurs dérivés d'acides aminés. On distingue notamment les catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline) et les tryptamines (sérotonine, mélatonine), respectivement dérivés de la tyrosine et du tryptophane. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline.

A. Le métabolisme des monoamines

Synthèse

La synthèse de la sérotonine (5-HT) se fait en deux étapes à partir du tryptophane. L'étape limitante est la réaction catalysée par la tryptophane hydroxylase (TPH). Les mammifères possèdent deux isoformes de la TPH (Walther and Bader, 2003), tandis que les poissons en possèdent quatre (TPH1a, TPH1b, TPH2 et TPH3) (Bellipanni et al., 2002; Ren et al., 2013; Teraoka et al., 2009). *tph1a* et *tph1b* sont issus d'une duplication, et *tph3*, dont la séquence ressemble à celle d'une tyrosine hydroxylase, semblerait être issu d'une duplication d'un gène *th* (Herculano and Maximino, 2014; Ren et al., 2013). Figure II.A.1

La première étape de la synthèse des catécholamines est catalysée par la tyrosine hydroxylase (TH). Deux gènes codant pour des TH ont été trouvés chez le poisson zèbre (*th1* et *th2*), issus d'une duplication (Candy and Collet, 2005).

Dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques, la dopamine (DA) est convertie en noradrénaline (NA) par la dopamine-β-hydroxylase (DBH) et la noradrénaline peut ensuite être convertie en adrénaline par la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT).

L'activité des enzymes de synthèse des monoamines peut être contrôlée par l'intensité de la neurotransmission du neurone monoaminergique lui-même. Par exemple, la destruction des terminaisons sérotoninergiques chez la souris induit une augmentation d'activité de la TPH (Stachowiak et al., 1986). L'activité de la TH est aussi modifiée suite à une inhibition chronique ou aigüe de la MAO-B (Lamensdorf and Finberg, 1997; Vrana et al., 1992).

Une fois synthétisées, les monoamines sont transportées dans des vésicules par l'isoforme 2 du transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2), puis libérées dans l'espace synaptique.

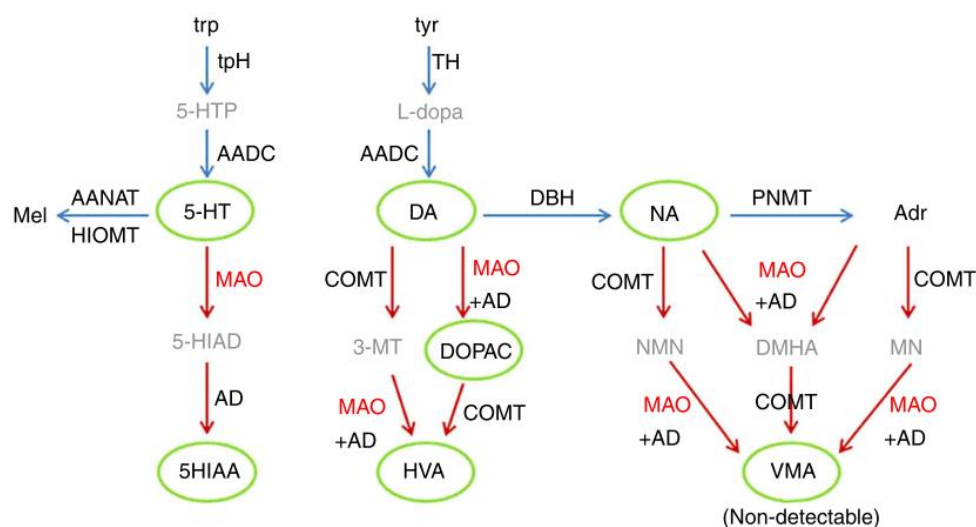


Figure II.A.1. Schéma des principales voies de synthèse et de dégradation des monoamines.
L'accent est mis sur les composés et l'enzyme étudiés (MAO en rouge). (Elipot et al., 2014a)

Récepteurs

Une fois libérées dans l'espace synaptique, les monoamines se fixent sur des récepteurs, situés sur les neurones post- ou pré-synaptiques.

Chez les mammifères, 12 sous-types de récepteurs à la sérotonine ont été identifiés. Ils peuvent être regroupés en plusieurs familles selon leurs séquences et leur pharmacologie (Nichols and Nichols, 2008):

- Les récepteurs couplés à une protéine Gi : 5-HT_{1A-F/5A}.
- Les récepteurs couplés à une protéine Gq : 5-HT_{2A-C}.
- Les récepteurs couplés à une protéine Gs : 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇
- Le récepteur 5-HT₃, un récepteur canal.

Chez le poisson zèbre, trois récepteurs à la sérotonine ont été identifiés, *htr1aa*, *htr1ab*, et *htr1bd*. Leur expression varie selon les zones du cerveau (Lillesaar, 2011; Norton et al., 2008). [Figure II.A.2](#)

Figure II.A.2. Aires d'expression des marqueurs liés à la 5-HT dans le cerveau chez le poisson zèbre adulte et/ou en développement. (Lillesaar, 2011)

	Pineal	Retina	Pretectal area	Posterior tuberculum/hypothalamus	Raphe	Reticular formation	Area postrema	Spinal cord	References
Early post-mitotic marker	-	-	-	-	<i>pet1</i>	<i>pet1</i>	-	<i>pet1</i> ^c	Lillesaar et al. (2009)
Mature markers									
Enzymes	<i>tph1a, tph1b, tph2</i>	<i>tph1a</i>	<i>tph2</i>	<i>tph1a, tph1b</i> ^b	<i>tph2</i>	<i>tph2</i>	-	<i>tph1a</i>	Bellipanni et al. (2002) Teraoka et al. (2004) Lillesaar et al. (2007)
	n.d.	n.d.	<i>aadc</i>	<i>aadc</i>	<i>aadc</i>	n.d.	n.d.	n.d.	Kaslin and Panula (2001) Filippi et al. (2010) Yamamoto et al. (2011)
	<i>mao</i>	n.d.	-	<i>mao</i>	<i>mao</i>	Mao activity	Mao activity	n.d.	Anichtchik et al. (2006) Sallinen et al. (2009)
Transporters	<i>serta</i>	<i>sertb</i>	<i>serta</i>	<i>sertb</i>	<i>serta</i>	n.d.	<i>sertb</i>	n.d.	Wang et al. (2006) Norton et al. (2008)
	-	-	<i>vmat2</i>	<i>vmat2</i>	<i>vmat2</i>	<i>vmat2</i> ^c	<i>vmat2</i> ^c	<i>vmat2</i>	Wen et al. (2008) Yamamoto et al. (2011)
Receptors	-	<i>htr1aa</i>	<i>htr1aa</i>	<i>htr1ab</i>	<i>htr1aa, htr1ab, (htr1bd)</i>	<i>htr1aa</i>	-	n.d.	Norton et al. (2008)
Transmitter	5-HT	5-HT	5-HT	5-HT	5-HT	5-HT	5-HT	5-HT	Rink and Guo (2004) Kaslin and Panula (2001) McLean and Fetcho (2004a,b) Lillesaar et al. (2009)

^a Note that only in very few cases a true co-expression has been shown.

^b *tph1b* is transiently expressed in a cell population in the posterior tuberculum. In the same area *tph1a* has been detected at later stages. It is not clear if these are the same cells.

^c The expression is based on presence of GFP transgene only and has not been confirmed by in situ hybridisation.

^d Only a few receptors of the type 1 family have been analysed in zebrafish.

Chez les mammifères, 5 sous-types de récepteurs à la dopamine ont été identifiés. Ils sont classés en deux groupes. Le premier groupe (D1), comprend les récepteurs D1 et D5, qui sont couplés à une protéine Gs. Le deuxième groupe (D2) comprend les récepteurs D2, D3 et D4, qui sont couplés à une protéine Gi (Callier et al., 2003). Le poisson zèbre possède 14 gènes de récepteurs dopaminergiques, dus notamment à la duplication du génome spécifique des téléostéens (Boehmier et al., 2004; Boehmler et al., 2007; Yamamoto et al., 2013; Yamamoto et al., 2015). [Figure II.A.3](#)

Les mammifères possèdent 9 récepteurs adrénérgiques organisés en trois familles, α 1, α 2 et β , chacune contenant trois récepteurs. Les récepteurs α 1 activent une protéine Gq, les récepteurs α 2 activent une protéine Gi/Go, et les récepteurs β activent une protéine Gs (Gnegy, 2012; Horzmann and Freeman, 2016). Cinq récepteurs α 2-adrénérgiques (*adra2a*, *adra2b*, *adra2c*, *adra2da* et *adra2db*) (Ruuskanen et al., 2005), 5 récepteurs β -adrénérgiques (*adrb1*, *adrb2a*, *adrb2b*, *adrb3a* et *adrb3b*) (Wang et al., 2009) ont été identifiés chez le poisson zèbre. Les poissons possèdent aussi au moins trois récepteurs adrénérgiques α 1 (Chen et al., 2007).

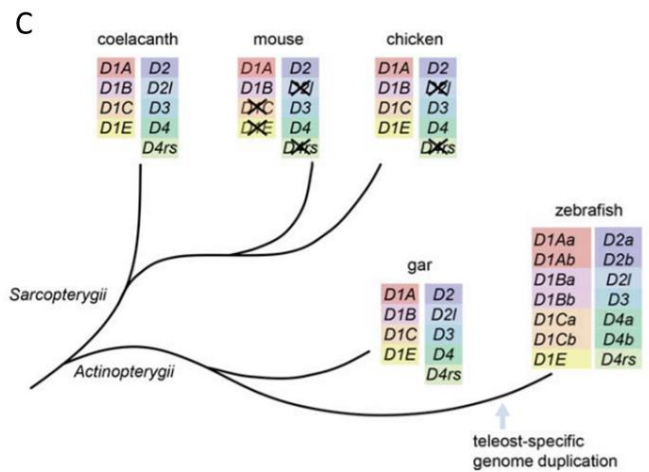
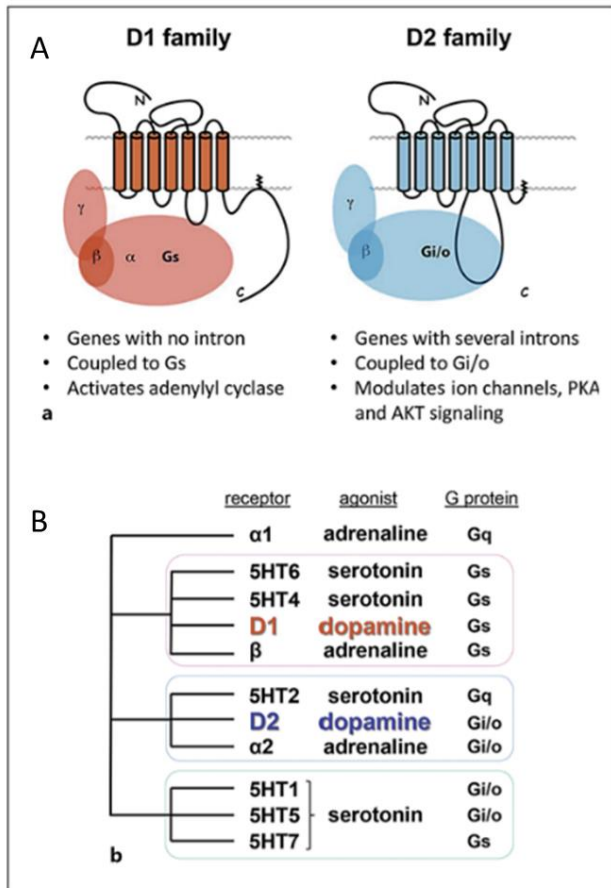


Figure II.A.3. Deux différentes classes de récepteurs dopaminergiques et un scénario évolutif hypothétique des gènes des récepteurs dopaminergiques chez les vertébrés.

(A) Schéma de la structure des récepteurs dopaminergiques des familles D1 et D2. Les deux familles présentent des caractéristiques différentes en termes de structure génomique, de protéines G couplées et d'effets physiologiques.

(B) Arbre phylogénétique simplifié montrant les relations entre les familles C1 et D2 et les autres récepteurs monoaminergiques chez les vertébrés. Les récepteurs partageant le même agoniste ne sont pas nécessairement proches.

(C) Scénario évolutif des récepteurs dopaminergiques. Le poisson zèbre possède des copies en plus de la plupart des sous-types de récepteurs, probablement dues à la duplication du génome spécifique aux téléostéens. La lignée des tétrapodes a perdu secondairement les gènes D2l et D4-rs, et les mammifères ont de plus perdu les gènes D1C et D1E. (Yamamoto et al., 2015)

Réabsorption

La sérotonine est récupérée du milieu extra cellulaire par deux systèmes de transport. Le premier est un système à haute affinité mais faible capacité et implique les transporteurs SERT. Le deuxième est un système à faible affinité et haute capacité et implique les transporteurs OCT1-3 (Organic cation transporter) et PMAT (plasma membrane monoamine transporter) (Duan and Wang, 2010). Le poisson zèbre possède deux isoformes de SERT : *slc6a4a* (*serta*) et *slc6a4b* (*sertb*), et les transporteurs OCT1, OCT2 et PMAT (Herculano and Maximino, 2014; Norton et al., 2008; Wang et al., 2006). Les sites d'expression de *serta* et *sertb* sont complémentaires. Entre autres, *serta* est exprimé dans le raphé et le prétegmentum, *sertb* dans l'hypothalamus (Lillesaar, 2011; Norton et al., 2008).

La dopamine est récupérée par DAT (dopamine transporter) et PMAT, et la noradrénaline par NET (norepinephrine transporter) et OCT3 (Duan and Wang, 2010).

L'activité des transporteurs contrôle la durée des signaux monoaminergiques, et donc l'intensité de la neurotransmission. En effet, les inhibiteurs de la recapture des monoamines sont connus pour augmenter les taux de monoamines synaptiques et pour amplifier la neurotransmission (Fuller and Wong, 1990; Kahlig and Galli, 2003). Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (SSRI) sont largement utilisés comme traitement pour des troubles psychiatriques comme la dépression, où la neurotransmission sérotoninergique est altérée.

Dégradation

Après sa recapture la sérotonine est dégradée en 5-HIAA par deux étapes. L'étape limitante est la réaction catalysée par la monoamine oxydase (MAO) (Cotzias and Dole, 1951). Contrairement aux mammifères, qui possèdent deux isoformes de la MAO, les poissons n'en possèdent qu'une (zMAO chez le poisson zèbre) (Anichtchik et al., 2006; Chen et al., 1994; Elipot et al., 2014a; Setini et al., 2005). **Figure II.A.4A**

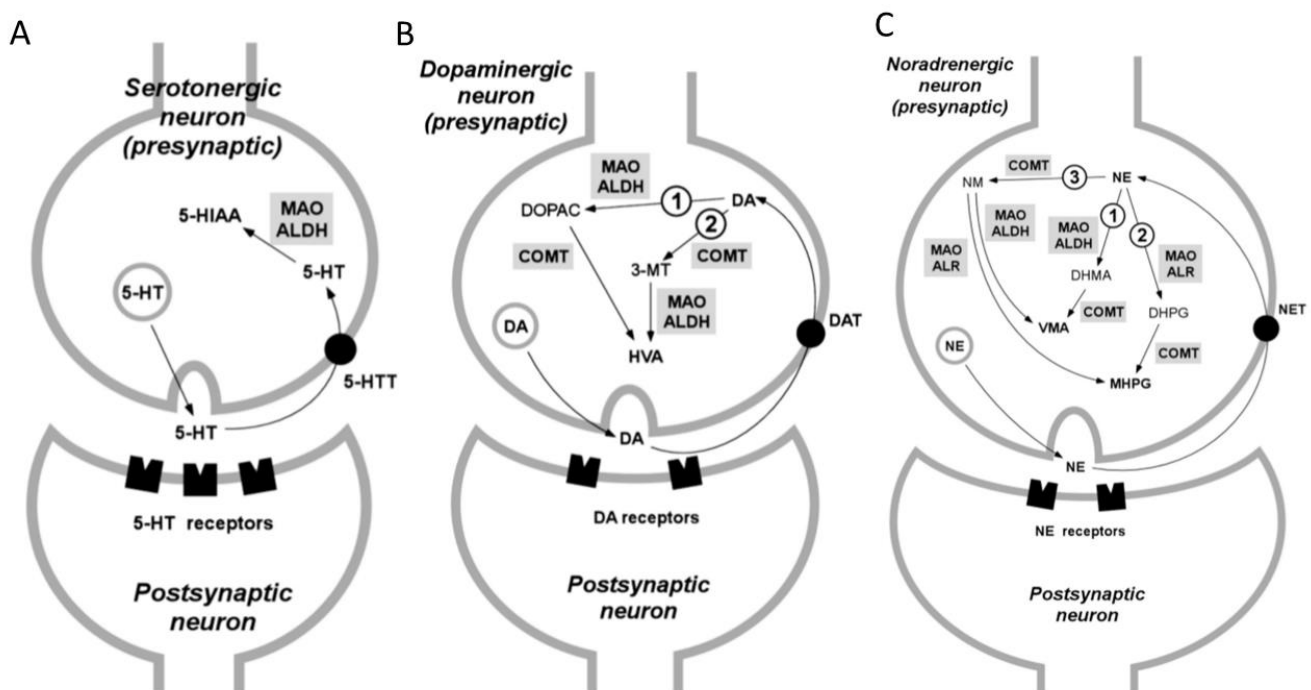


Figure II.A.4. Cycles synaptiques de la sérotonine, de la dopamine et de la noradrénaline.

(A) Cycle synaptique de la sérotonine (5-HT). Après la libération, l'activation du récepteur 5-HT et la recapture par le transporteur 5-HTT, la sérotonine est dégradée par la MAO (monoamine oxydase) et l'ALDH (aldéhyde déhydrogénase) en 5-hydroxyindole-3-acétique acid (5-HIAA).

(B) Cycle synaptique de la dopamine (DA). Après la libération, l'activation du récepteur DA et la recapture par le transporteur DAT, la dopamine est dégradée par deux principales voies : (1) La MAO et l'ALDH convertissent la DA en 3,4-dihydroxyphénylacétique acid (DOPAC); ce composé est ensuite dégradé par la catechol-O-méthyltransférase (COMT) en homovanillique acid (HVA). (2) La COMT métabolise la DA en 3-méthoxytyramine (3-MT), qui est ensuite convertie en HVA par la MAO et l'ALDH.

(C) Cycle synaptique de la noradrénaline (NE). Après la libération, l'activation du récepteur NE et la recapture par le transporteur NET, la noradrénaline est dégradée par trois principales voies. (1) La MAO et l'ALDH convertissent la NE en 3,4-dihydroxymandélique acid (DHMA); ce composé est ensuite dégradé par la COMT en vanillylmandélique acid (VMA). (2) La MAO et l'ALR (aldéhyde réductase) convertissent la NE en 3,4-dihydroxyphénylglycol (DHPG), qui est ensuite dégradé par la COMT en 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol (MHPG). (3) La COMT métabolise la NE en normétanéphrine (NM), qui est ensuite convertie soit en MHPG (via MAO/ALR) ou en VMA (via MAO/ALDH). (Bortolato et al., 2008)

Les catécholamines sont aussi dégradées par la MAO chez les mammifères. Chez les poissons, Aldeco et al., (2011) ont montré que la catalyse de la dopamine *in vitro* par la zMAO est efficace, et même plus que celle des MAO humaines. Cependant, *in vivo*, Saligaut et al., (1990) ont montré que le 3-MT (3-méthoxy-tyramine) semble être le principal métabolite de la dopamine, plus que le DOPAC (dihydroxy-3,4-phenylacetic acid) et l'HVA (homovanillic acid). De plus, seuls les taux de sérotonine sont augmentés après une inhibition de la zMAO, les concentrations de dopamine et de noradrénaline restent inchangées (Sallinen et al., 2009). Ceci suggère que chez les poissons, la dopamine et la noradrénaline sont plutôt métabolisées par la COMT que par la zMAO. Deux gènes de COMT ont été trouvés chez le poisson (Alazizi et al., 2011; Panula et al., 2010). **Figure II.A.4B**

Chez les rongeurs, la recapture de la sérotonine est très efficace (Stenfors and Ross, 2004), et une proportion considérable de sérotonine récupérée de l'espace synaptique serait dégradée en 5-HIAA (Stenfors and Ross, 2004). Les ratios 5-HIAA/5-HT et (DOPAC+HVA)/DA, qui représentent le « turnover » de la sérotonine et de la dopamine respectivement sont donc proportionnels à l'activité des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques respectivement et à l'intensité de la neurotransmission. L'utilisation de ces ratios comme indicateurs des activités 5-HT et DA est très répandue dans la littérature, en particulier celle des reptiles, et des poissons (exemples : Matter et al., 1998; Øverli et al., 2001). Cependant, un catabolisme des monoamines intra-neuronal, c'est-à-dire indépendant d'une sécrétion, peut se produire. Les ratios ne sont donc pas toujours de bons indicateurs de l'activité neuronale (Commissiong, 1985; Grahame-Smith, 1971). De plus, lorsque la chaîne sécrétion-recapture-dégradation est rompue, par exemple par un traitement avec un inhibiteur de la recapture ou de la dégradation des neurotransmetteurs, les ratios sont modifiés mais ne sont plus corrélés avec l'activité des neurones. Par exemple, un traitement qui inhibe la recapture de la sérotonine (fluoxétine), cause une réduction des taux de 5HIAA et du ratio 5HIAA/5HT (Winberg and Thörnqvist, 2016). Pourtant, un tel traitement augmente la neurotransmission.

Contrôle de l'activité des neurones :

Le contrôle de l'activité des neurones monoaminergiques peut être intrinsèque, via des autorécepteurs qui exercent un rétrocontrôle sur l'activité des neurones.

Les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal des mammifères possèdent des autorécepteurs négatifs : 5-HT_{1A}, qui sont situés dans la partie somato-dendritique des neurones, et 5-HT_{1B}, situés au niveau des terminaisons axonales (Riad et al., 2000) (**Figure II.A.5**). L'activation de ces autorécepteurs par des agonistes (buspirone, gepirone, ipsapirone ou 8-OH-DPAT) induit une diminution des concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'hippocampe, l'une des cibles des neurones sérotoninergiques chez les rongeurs (Matos et al., 1996; Nomikos et al., 1992; Sharp et al., 1989). La sérotonine libérée par les neurones sérotoninergiques, dans la fente synaptique ou au niveau des dendrites (Andrade et al., 2015) active ces autorécepteurs négatifs, ce qui induit des courants membranaires via des canaux potassiques, une hyperpolarisation et ainsi une inhibition des neurones sérotoninergiques (Aghajanian and Lakoski, 1984; Andrade et al., 2015). L'activité des neurones sérotoninergiques est donc régulée par les autorécepteurs inhibiteurs 5-HT_{1A} (somato-dendritique) et 5-HT_{1B} (terminal). L'activité des neurones sérotoninergiques du raphé dorsal peut aussi être modulée positivement par d'autres autorécepteurs, comme les récepteurs 5-HT_{2B} (Belmer et al., 2018). Le même mécanisme de rétrocontrôle par des autorécepteurs est présent dans le système dopaminergique. Par exemple, les autorécepteurs D₂ inhibent la sécrétion de dopamine, augmentent le transport par DAT et inhibent l'activité de la TH (Christopher P Ford, 2014).

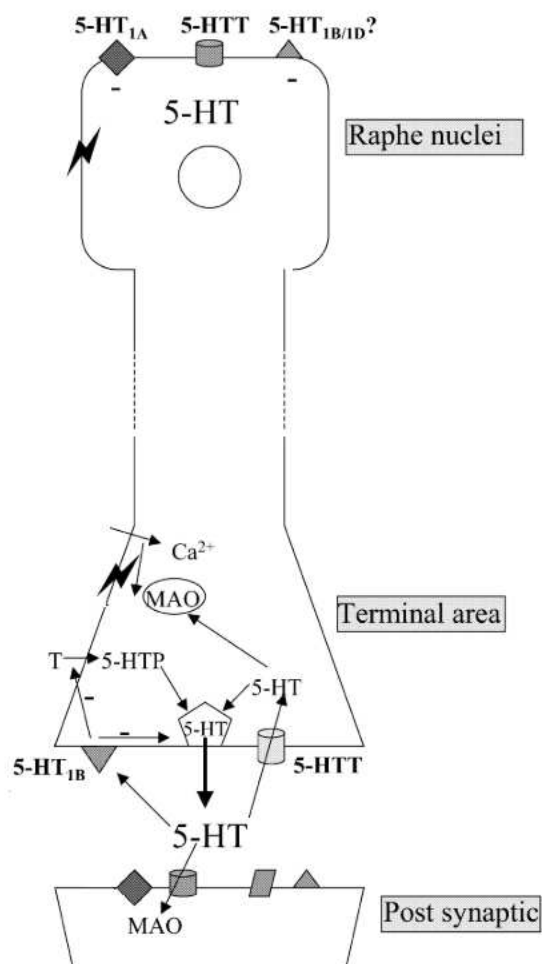


Figure II.A.5. Illustration schématique de la localisation des autorécepteurs sérotoninergiques et de leurs effets sur la neurotransmission sérotoninergique.

5-HTT: 5-HT reuptake mechanism; T: tryptophan; MAO: mitochondrial monoamine oxidase. (Stenfors and Ross, 2004)

Le contrôle des neurones monoaminergiques peut aussi se faire par d'autres systèmes de neurotransmetteurs. Ci-dessous quelques exemples concernant la modulation des neurones sérotoninergiques du raphé des mammifères :

Les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal reçoivent des projections noradrénergiques du locus cœruleus (Baraban and Aghajanian, 1981; Levitt and Moore, 1979). Ils sont sous activation tonique via les récepteurs α 1-adrénergiques (Baraban and Aghajanian, 1980) ou subissent une inhibition par les récepteurs α 2-adrénergiques (Numazawa et al., 1995; Raiteri et al., 1990; Tao and Hjorth, 1992; Trendelenburg et al., 1994).

Des interneurones et des afférences GABAergiques provenant de plusieurs parties du cerveau inhibent aussi l'activité des neurones sérotoninergiques. Les interneurones sont activés par la sérotonine libérée par les neurones sérotoninergiques (Hernández-Vázquez et al., 2019; Kusek et al., 2015; Nishikawa and Scatton, 1985). Le système endocannabinoïde module aussi l'activité des neurones sérotoninergiques (Haj-Dahmane and Shen, 2011).

La modulation de l'activité des neurones monoaminergiques chez les poissons est relativement peu connue, mais les systèmes monoaminergiques des mammifères et des poissons présentent beaucoup de similitudes, même s'ils ne sont pas strictement homologues pour la plupart (Panula et al., 2006). Entres autres, les neurones sérotoninergiques du raphé reçoivent des projections adrénérgiques du locus cœruleus (Ma, 1994), ils expriment les récepteurs α 2-adrénergiques et les autorécepteurs 5-HT_{1A} (Ampatzis et al., 2008; Norton et al., 2008).

B. Anatomie des systèmes monoaminergiques

Chez les mammifères

Le système sérotoninergique

Les cellules sérotoninergiques sont identifiées grâce à leur expression de la TPH. D'autres marqueurs peuvent être utilisés, comme AADC, SERT ou MAO, mais ces marqueurs ne sont pas spécifiques des neurones sérotoninergiques, contrairement à la TPH.

Les cellules sérotoninergiques du cerveau des mammifères sont situées dans le raphé. On les regroupe en neuf noyaux numérotés B1-9 (Dahlstöm and Fuxe, 1964; Lesch and Waider, 2012), pouvant être répartis en deux groupes : un groupe caudal (B1-3) et un groupe rostral (B4-9) comprenant le raphé dorsal (B6-7) et le raphé médian (B5, B9-8). **Figure II.B.1 et II.B.2**

Les neurones du groupe rostral projettent dans le cerveau antérieur, où leurs terminaisons multiples innervent de nombreuses régions comme le cortex, l'hippocampe (Köhler and Steinbusch, 1982), le noyau caudé, la substance noire (Imai et al., 1986), l'hypothalamus (Petrov et al., 1992) ou l'amygdale (Petrov et al., 1994). Le système sérotoninergique influence ainsi de nombreuses fonctions, comme la cognition, les états émotionnels, le contrôle moteur, etc...

Les neurones du groupe caudal projettent principalement dans la moelle épinière et le cervelet, et sont impliqués dans l'activité motrice, le contrôle de la douleur et du système nerveux autonome (Lesch and Waider, 2012).

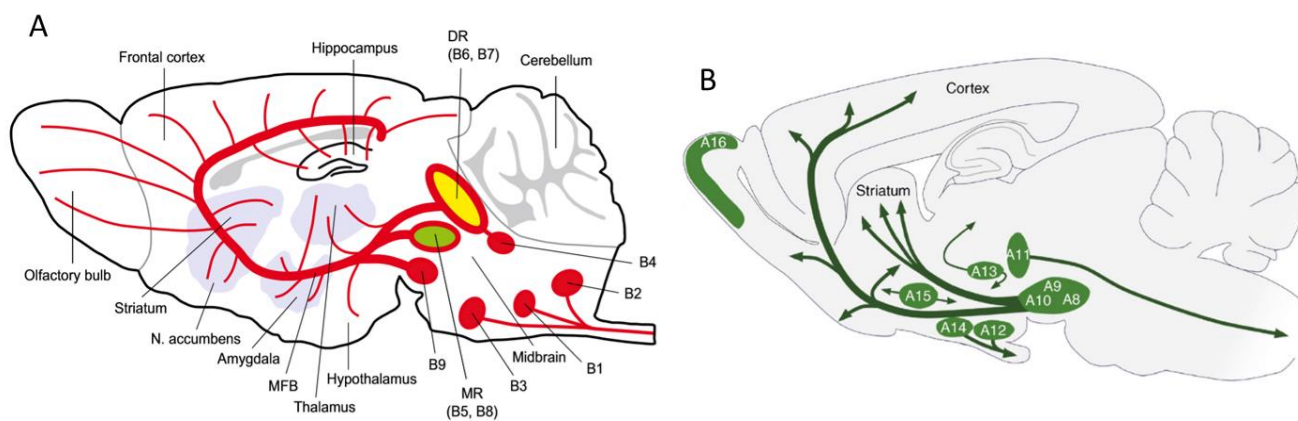


Figure II.B.1. Les systèmes 5-HT et DA du cerveau des rongeurs.

(A) Les neurones 5-HT sont organisés en neuf noyaux dans le raphé, B1 à B9. Les noyaux en position la plus caudale (B1–B3) projettent dans la moelle épinière et la périphérie. Les noyaux en position plus rostrale sont composés des groupes de neurones du raphé dorsal (B6 and B7; en jaune) et du raphé médian (B5 and B8; en vert). Ils projettent dans différentes zones du cerveau, qui se chevauchent. DR : dorsal raphe nucleus; MFB : medial frontal bundle; MR : median raphe nucleus. (Lesch and Waider, 2012)

(B) Les neurones dopaminergiques du cerveau des mammifères sont localisés dans neuf groupes de cellules distincts, distribués depuis le mésencéphale jusqu'aux bulbes olfactifs. Les projections principales des groupes sont représentées par les flèches. (Björklund and Dunnett, 2007)

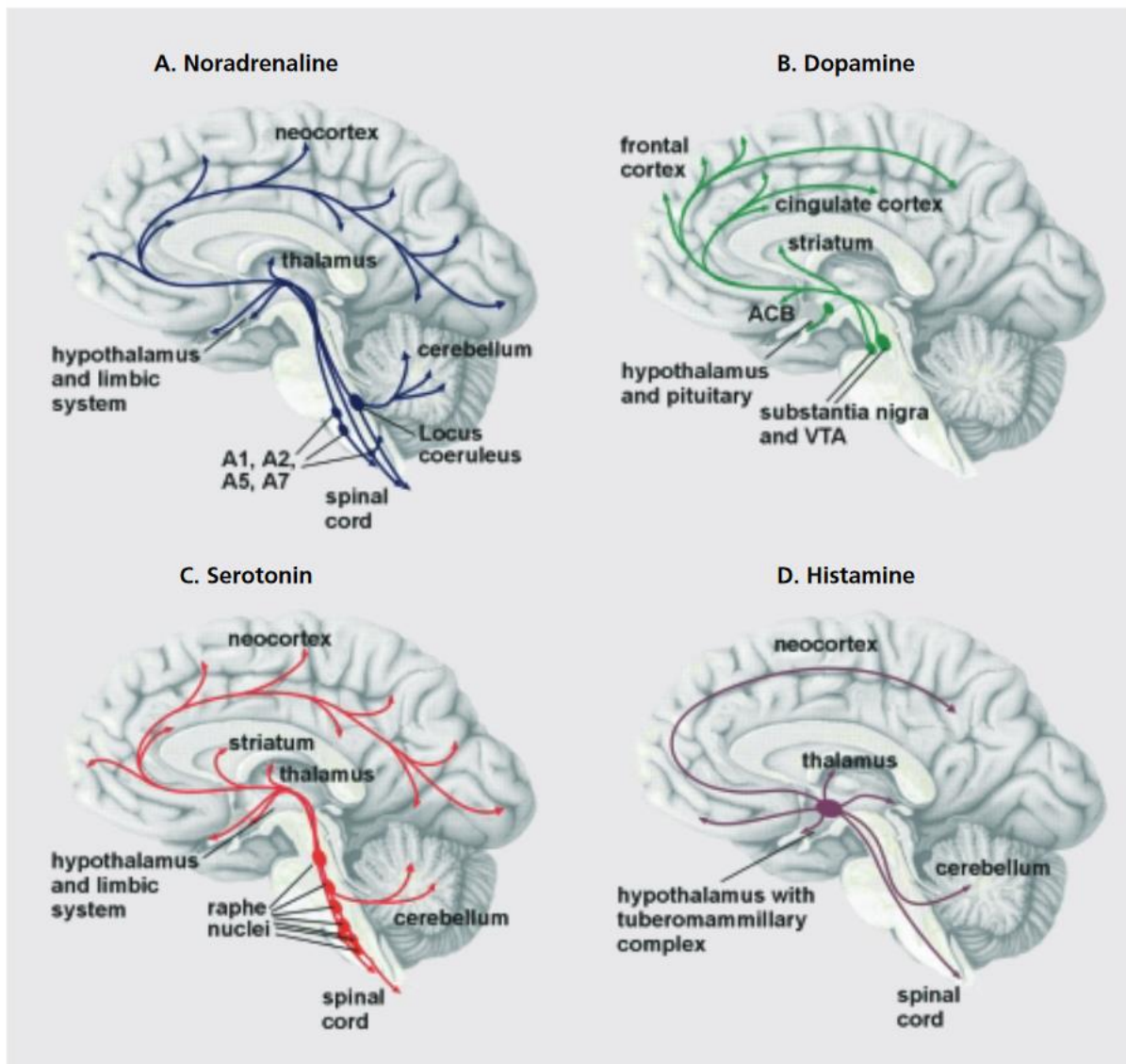


Figure II.B.2. Les neurones monoaminergiques et leurs projections dans le cerveau humain.

A. Noradrénaline. Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus projettent dans les régions limbiques et corticales, et dans le thalamus, le cervelet et la moelle épinière. Ils jouent un rôle important dans la régulation de l'humeur et de l'attention. Les neurones noradrénergiques des groupes A1, A2, A5, et A7 projettent dans des régions plus restreintes et interviennent dans des fonctions autonomes.

B. Dopamine. Les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale (VTA) projettent dans le striatum et le néocortex. Ils sont importants dans l'initiation des mouvements et les processus émotionnels. De plus, il existe un groupe de cellules dopaminergiques dans l'hypothalamus qui régule des processus neuroendocrines.

C. Sérotonine. Les neurones sérotoninergiques sont localisés dans les noyaux du raphé et projettent dans presque toutes les parties du cerveau. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions, dont la régulation des processus émotionnels.

D. Histamine. Les neurones histaminergiques sont localisés dans le complexe tuberomammillaire de l'hypothalamus. Ils projettent dans toutes les régions du cerveau et sont importants pour la veille. (Fuchs and Flügge, 2004)

Le système dopaminergique

Le marqueur le plus utilisé et le plus fiable pour identifier les cellules dopaminergiques est la TH, même si son expression dans les neurones dopaminergiques n'est pas toujours stable, et qu'il arrive que certaines cellules TH-positives ne contiennent ni dopamine ni noradrénaline (Björklund and Dunnett, 2007). D'autres marqueurs peuvent être utilisés en complément pour identifier les neurones dopaminergiques, comme AADC (aromatic amino acid decarboxylase).

Des neurones dopaminergiques sont détectés dans diverses régions du cerveau des mammifères, et sont classés en 9 groupes de cellules numérotés A8-16. **Figure II.B.1 et II.B.2**

Les groupes A8-10, situés dans le mésencéphale, sont les plus étudiés. Ils appartiennent à la substance noire pars compacta (A9), à l'aire tegmentale ventrale (A10), et au tegmentum ventrolatéral caudal de la substance noire (A8). Ces groupes de neurones et leurs projections forment les voies dopaminergiques principales du cerveau. D'autres voies dopaminergiques mineures partent des groupes A11-14 et constituent le système dopaminergique du diencephale.

Les projections partant des groupes A8-10 sont divisées en trois voies (Zeiss, 2005) :

- La voie méso-striatale (ou nigrostriatale) part du groupe A9, innerve le striatum dorsal et est impliquée dans l'activité motrice.
- La voie mésolimbique part essentiellement du groupe A10, projette dans le striatum ventral et module la motivation.
- La voie mésocorticale part essentiellement du groupe A10, projette dans diverses régions du cortex, les bulbes olfactifs, l'amygdale, le locus cœruleus, et est impliquée dans l'apprentissage et la mémoire.

Le système noradrénergique

Le marqueur utilisé pour identifier des neurones noradrénergiques est la DBH, l'enzyme catalysant la conversion de la dopamine en noradrénaline. La DBH n'est pas présente dans les neurones dopaminergiques.

Il y a 7 groupes de cellules noradrénergiques chez les mammifères, localisés dans le tronc cérébral (Dahlström and Fuxe, 1964), dont le locus cœruleus, le noyau noradrénergique le plus étudié. Les neurones noradrénergiques projettent dans de nombreuses régions du cerveau, comme le raphé, l'hypothalamus, le cortex, le cervelet, etc... (Swanson and Hartman, 1975).

Chez les poissons

Tous les systèmes de neurotransmission monoaminergiques majeurs des mammifères ont été décrits chez le poisson (Kaslin and Panula, 2001).

Le système sérotoninergique

Chez les amniotes, les neurones sérotoninergiques sont seulement présents dans le raphé, alors que chez les anamniotes, des corps cellulaires 5-HT sont aussi localisés dans les aires prétegmentales et le cerveau antérieur basal. Des noyaux sérotoninergiques ont été identifiés dans la glande pinéale, le complexe prétegmental, les noyaux antérieur, intermédiaire et postérieur de l'organe paraventriculaire (hypothalamus), le raphé dorsal, médian et ventrolatéral, le raphé inférieur, le raphé caudal, la medulla oblongata et l'area postrema (Herculano and Maximino, 2014; Kaslin and Panula, 2001; Lillesaar, 2011; Panula et al., 2010). **Figure II.B.3A et 3B**

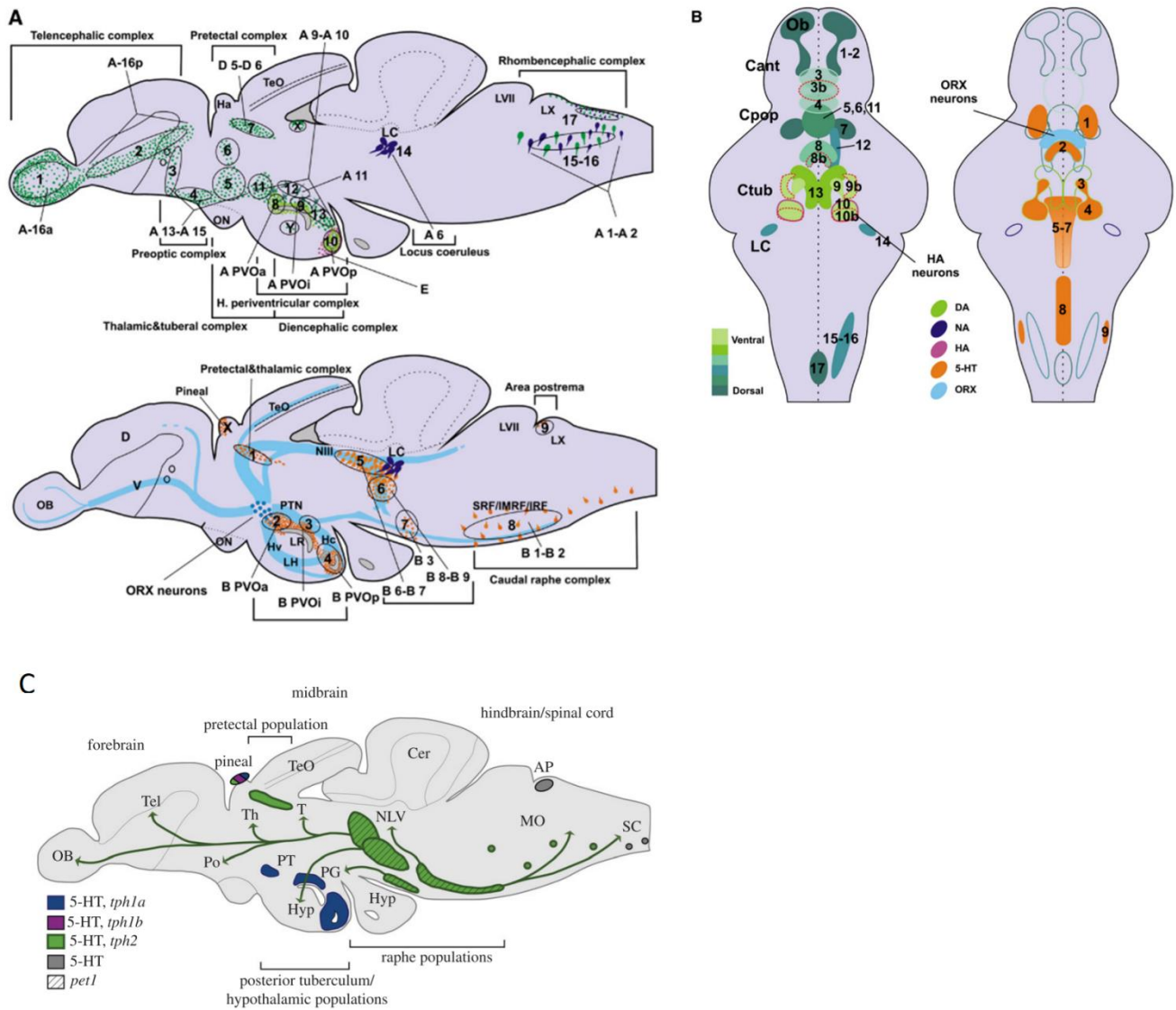


Figure II.B.3. Les systèmes monoaminergiques chez le poisson.

(A) Vue sagittale schématique d'un cerveau de poisson zèbre adulte montrant les groupes de cellules dopaminergiques (vert), noradrénergiques (bleu foncé), sérotoninergiques (orange), histaminergiques (violet), et orexinergiques (bleu clair), numérotés selon la direction rostro-caudale. Seules les populations catécholaminergiques positives à th1 sont représentées ici. Les innervations des fibres hypocretinergiques sont montrées en bleu clair sur le schéma du bas.

(B) Vue horizontale schématique d'un cerveau de larve de poisson zèbre (72 hpf) illustrant les populations aminergiques et hypocretinergiques, numérotées comme en (A). Sur le panneau de gauche, les couleurs des populations catécholaminergiques sont selon leur position sur l'axe dorso-ventral (foncé : plus dorsal, clair : plus ventral). Les populations th2 sont encerclées par un trait rouge et marquées par un suffixe b. Panneau de gauche : 1: olfactory bulb (Ob); 2: ventral telencephalic nuclei (Vv, Vd and Vs); 3-4: parvocellular preoptic nucleus, anterior part (PPa); 5: parvocellular preoptic nucleus, posterior part (PPp); 6: anterior, intermediate, ventrolateral and ventromedial thalami nuclei (A, I, VM and VL); 7: periventricular pretectal nucleus, ventral part (PPv); 8: paraventricular organ, anterior part (PVOa); 9: paraventricular organ, intermediate part; 10: paraventricular organ, posterior part (PVOp); 11: periventricular nucleus of posterior tuberculum (TPp); 12: posterior tuberculum (PTN); 13: periventricular hypothalamus and posterior tuberculum (PTN); 14: locus coeruleus (LC); 15-16: vagal lobe (LX), internal retinal formation (IRF); 17: vagal lobe (LX), area postrema (AP). Panneau de droite : 1: pretectal, 2-4: hypothalamic periventricular complex, 5-7: rostral raphe complex, 8: caudal raphe complex, 9: area postrema complex. Abbreviations: Cant—anterior commissure, Cpop—postoptic commissure, Ctub—the commissure of the posterior tuberculum, D—dorsal telencephalic area, E— histaminergic cell group, Ha—habenula, Hc—caudal zone of periventricular hypothalamus, Hv—ventral zone of periventricular hypothalamus, IMRF—intermediate reticular formation, IRF—inferior reticular formation, LC—locus coeruleus, LH—lateral hypothalamic nucleus, LR—lateral recesses of the diencephalic ventricle, LVII—facial lobe, LX—vagal lobe, NIII—oculomotor nucleus, NIn—interpeduncular nucleus, OB—olfactory bulb, ON—optic nerve, PTN—posterior tuberculum,

PVOa, i, p—anterior, intermediate and posterior parts of the paraventricular organ, SRF—superior reticular formation, V—ventral telencephalic area, TeO—optic tectum. (Panula et al., 2010)

(C) Schéma illustrant la localisation des neurones sérotoninergiques du cerveau chez le poisson zèbre adulte (vue latérale) et leurs projections. Les cellules 5-HT immunopositives sont aussi présentes dans la rétine (non montré). Les principales projections provenant du raphé sont montrées. AP, area postrema; Cer, cerebellum; Hyp, hypothalamus; MO, medulla oblongata; NLV, nucleus lateralis valvulae; OB, olfactory bulb; PG, preglomerular complex, Po, preoptic region; PT, posterior tuberculum; SC, spinal cord; Tel, telencephalon; TeO, tectum opticum; Th, thalamus; V, ventral telencephalic area. (Gaspar and Lillesaar, 2012)

Les populations de neurones sérotoninergiques de l'hypothalamus et du raphé n'expriment pas les mêmes gènes. Les neurones de l'hypothalamus expriment *tph1a* et *sertb*, tandis que les neurones du raphé expriment *tph2* et *serta* (Lillesaar, 2011). Ces deux groupes sont aussi différents en termes de développement. Le développement des neurones 5-HT du raphé dépend du facteur de transcription *pet1* (Lillesaar et al., 2007), alors que celui des neurones de l'hypothalamus dépend de *etv5b* et *fezl* (Bosco et al., 2013; Rink and Guo, 2004), suggérant des origines développementales distinctes.

Comme les neurones 5-HT du raphé sont les seuls à exprimer *pet1*, Lillesaar et al., (2009) ont pu identifier les projections spécifiques du raphé, et les distinguer des projections des neurones 5-HT de l'hypothalamus. Les neurones 5-HT du raphé dorsal innervent les bulbes olfactifs, le télencéphale (particulièrement les homologues de l'amygdale basolatérale et de l'hippocampe), le thalamus, la région préoptique. Le raphé médian projette dans l'hypothalamus, et le raphé ventrolatéral dans le complexe préglomérulaire. Le raphé caudal projette dans le cerveau postérieur et la moelle épinière (Gaspar and Lillesaar, 2012; Lillesaar, 2011; Lillesaar et al., 2009; McLean and Fetcho, 2004). [Figure II.B.3C](#)

Le système dopaminergique

Deux systèmes de classifications des neurones dopaminergiques sont utilisés. Rink and Wullimann, (2002) les classent en 8 populations, Sallinen et al., (2009) en 17 populations. Les deux classifications sont cohérentes et localisent les neurones dopaminergiques dans les bulbes olfactifs, le subpallium, le tubercule postérieur, l'hypothalamus et le prétectum (Schweitzer et al., 2012). La substance noire et l'aire tegmentale ventrale des mammifères sont absentes dans le cerveau du poisson zèbre. [Figure II.B.3](#)

Les neurones dopaminergiques innervent de nombreuses zones du cerveau, comme l'hypothalamus, le tectum, le thalamus, les bulbes olfactifs, la moelle épinière, etc... (Schweitzer et al., 2012). Les projections des différentes aires sont détaillées dans la [Figure II.B.4](#).

Figure II.B.4. Aires de projection des neurones catécholaminergiques chez la larve de poisson zèbre de 4 jours. (Schweitzer et al., 2012)

	CA Group	Projection Target Area
Dopaminergic	Retinal amacrine cells	local (retina)
	Olfactory bulb	local (OB)
	Subpallium	local (SP), ac, dTHA, HYP
	Anterior preoptic	local (PO), poc, eht, HYP
	Preoptic	local (PO), eht, HYP
	Pretectum	local (PT), pc, vTHA, TEC
	DC1	local (vTHA), poc, PT, HYP, TEC,
	DC2—post. tuberculum	SP, poc, lat. DC, PT, eht, HYP, TEC, HB, SC
	DC4—post. tuberculum	SP, poc, PT, eht, HYP, TEC, HB, SC
	DC5—hypothalamus	poc, PT, eht, pc, HYP, TEC, LC, HB, SC
	DC6—hypothalamus	local (HYP), eht, HB
	DC3—hypothalamus	local (HYP), eht
	DC7—hypothalamus	local (HYP), posterior recess
Noradrenergic	Locus coeruleus	local (LC), OB, SP, ac, poc, lat. DC, PT, pc, POT, HYP, TEC, HB, SC
	Medulla oblongata—interfascicular zone	local (MO), HB, SC
	Medulla oblongata—vagal area	local (MO), SP, ac, vTHA, POT, HYP, HB
	Medulla oblongata—area postrema	local (AP), OB, SP, ac, poc, lat. DC, PT, pc, POT, HYP, TEC, HB, SC
	Sympathetic ganglia	local

The anatomical target areas of catecholaminergic projections are summarized based on the data reported by Tay et al., (2011). Target areas are specified as anatomical brain regions or major axonal tracts.

Abbreviations: ac, anterior commissure; act, anterior CA tract; AP - area postrema; DC diencephalon; dTHA dorsal thalamus; dorsal; eht, endohypothalamic tract; HB hindbrain; HYP - hypothalamus; LC - locus coeruleus; lat. lateral; MO - medulla oblongata interfascicular zone and vagal area; OB - olfactory bulb; pc, posterior commissure; PO - preoptic region; POT - posterior tuberculum; poc, postoptic commissure; PT - pretectum; SC spinal cord; SP - subpallium; TEC - tectum; vTHA. ventral thalamus.

Le système noradrénergique

Les neurones noradrénergiques chez le poisson sont localisés dans un petit groupe, qui semble être homologue au locus cœruleus des mammifères. Les voies et les cibles des neurones noradrénergiques de ce cluster sont similaires à celles des autres vertébrés. Les régions innervées sont, entre autres le raphé, l'hypothalamus, l'aire préoptique, le torus semicircularis, le noyau suprachiasmatique, le cervelet, les bulbes olfactifs (Ma, 1994). Des cellules noradrénergiques en position plus caudale ont aussi été localisées depuis le lobe vagal à la jonction médullospinale et dans l'area postrema (Ma, 1997). **Figure II.B.3**

Les systèmes monoaminergiques des poissons sont donc très similaires à ceux des mammifères. Les plus grosses différences sont la présence de neurones sérotoninergiques dans le diencéphale, de neurones dopaminergiques dans le télencéphale, et l'absence de neurones dopaminergiques dans le midbrain (aire tegmentale ventrale et substance noire) chez le poisson.

C. Les fonctions des systèmes monoaminergiques

Les systèmes monoaminergiques interviennent dans de nombreuses fonctions, aussi bien comportementales, physiologiques que développementales.

Les fonctions comportementales

Les souris ou poissons KO pour des « gènes » sérotoninergiques ou dopaminergiques présentent des comportements anormaux, comme une augmentation des comportements agressifs, et une réponse au stress excessive, et des comportements sociaux affectés (Cases et al., 1995; Chen et al., 2004; Kacprzak et al., 2017; Tanaka et al., 2018a). De même, les monoamines interviennent dans le contrôle de la locomotion (Beninger, 1983; Brocco et al., 2002; Gabriel et al., 2009; Pearlstein, 2013; Perrier and Cotel, 2015). L'implication des systèmes monoaminergiques dans l'agressivité, la réponse au stress, les comportements sociaux et la locomotion sera développée en détail dans le chapitre III. de l'introduction.

L'éveil et le sommeil :

L'activité des neurones monoaminergiques change au cours du cycle de sommeil. Elle est en général forte pendant l'éveil, moyenne pendant le sommeil NREM (no rapid eye movement) et cesse pendant le sommeil REM (rapid eye movement) (Scammell et al., 2017). Des agonistes $\alpha 1$ -noradrénergiques ou l'activation du locus cœruleus activent l'éveil, alors que des agonistes $\alpha 2$ entraînent un état de sédation (Carter et al., 2010; Scammell et al., 2017). Ces résultats montrent l'implication du locus cœruleus dans le maintien de l'éveil et de l'attention. Le système dopaminergique stimule aussi l'éveil (Wisor et al., 2001). Le rôle du système sérotoninergique est plus controversé. L'activation des neurones 5-HT stimulerait l'éveil, mais des expériences d'ablation ou d'activation du raphé chez la souris et le poisson zèbre ont montré au contraire un rôle activateur de la sérotonine sur le sommeil (Oikonomou et al., 2019). Cependant, comme les neurones sérotoninergiques interviennent aussi dans la régulation de la température, l'effet activateur du sommeil de la sérotonine pourrait être due à l'hypothermie induite (Murray et al., 2015).

La prise alimentaire :

De nombreuses études ont montré un effet inhibiteur de la sérotonine sur la prise alimentaire. Par exemple, l'administration de tryptophane ou de 5-HTP (précurseurs de la sérotonine) réduit la prise alimentaire (Blundell and Leshem, 1975; Latham and Blundell, 1979), de même que l'administration d'inhibiteurs de recapture de la sérotonine (Goudie et al., 1976). La sérotonine agit au niveau central sur les neurones à neuropeptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire en inhibant l'activité des neurones orexigènes NPY/AgRP (Heisler et al., 2006) et activant les neurones anorexigènes à POMC (Heisler et al., 2006; Sohn et al., 2011), entres autres. **Figure II.C.1**

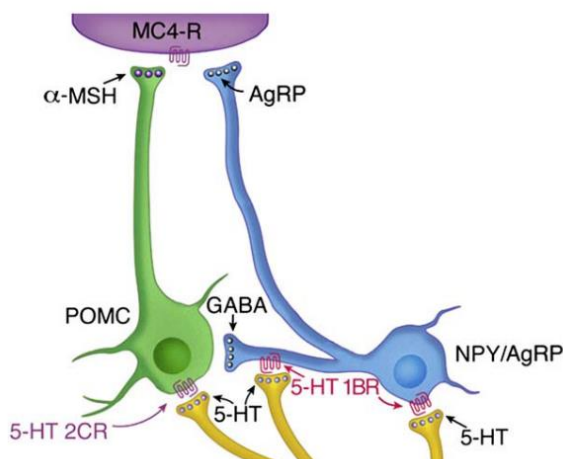


Figure II.C.1. Schéma des sites d'action de la 5-HT sur la voie mélanocortine.

La 5-HT hyperpolarise et inhibe les neurones AgRP, et diminue leur inhibition sur les neurones POMC en activant les récepteurs 5-HT1BRs. La 5-HT active aussi les neurones POMC par les récepteurs 5-HT2CRs. Ceci mène à l'augmentation de la libération de α -MSH et à la diminution de la libération de AgRP au niveau des récepteurs Mc4r. (Heisler et al., 2006)

La reproduction :

Les monoamines sont aussi impliquées dans le contrôle de la reproduction et ont notamment une influence sur les comportements reproducteurs. Chez les mammifères, toutes les aires cérébrales contrôlant les comportements sexuels (hypothalamus, l'aire préoptique, l'amygdale, les bulbes olfactifs) reçoivent des afférences sérotoninergiques. Une augmentation de l'activité sérotoninergique centrale inhibe les comportements sexuels, tandis que la réduction des voies sérotoninergiques les facilite (Albinsson et al., 1996; Olivier et al., 2011). La neurotransmission sérotoninergique exercerait donc une action inhibitrice sur les comportements sexuels chez les mammifères. Chez les poissons très peu d'études ont été réalisées sur l'implication des monoamines dans les comportements reproducteurs, en revanche, il est connu que la sérotonine influence la reproduction des poissons en modulant entre autres, la sécrétion des hormones sexuelles et la maturation des oocytes (Prasad et al., 2015).

Les fonctions physiologiques périphériques

Les monoamines ne sont pas uniquement localisées dans le cerveau. Beaucoup d'organes, comme le tube digestif, les plaquettes, les vaisseaux sanguins, les tissus adipeux et le pancréas produisent ou absorbent la sérotonine (Eddahibi et al., 2006; Gershon, 2000; Paulmann et al., 2009; Stunes et al., 2011; Walther et al., 2003). Les catécholamines sont aussi sécrétées en périphérie. Les monoamines ont de très nombreuses cibles périphériques. Nous allons nous focaliser sur les rôles physiologiques de la sérotonine.

Dans le tube digestif, la sérotonine est produite dans les cellules entérochromaffines par la TPH1 (Côté et al., 2003) et dans les neurones sérotoninergiques du système nerveux entérique par la TPH2 (Neal et al., 2009). La délétion de TPH1, qui élimine la sérotonine des cellules chromaffines ne modifie pas la motilité intestinale, contrairement à la délétion de TPH2, qui la réduit (Li et al., 2011). La sérotonine provenant du système nerveux entérique est donc nécessaire à la motilité intestinale. Elle active aussi la croissance et le renouvellement de la muqueuse intestinale (Gross et al., 2012). La sérotonine provenant des deux sources (cellules entérochromaffines et neurones) intervient dans la sécrétion de mucus par l'épithélium intestinal (Mawe and Hoffman, 2013).

Les cellules entérochromaffines possèdent le plus gros stock de sérotonine de l'organisme (Gershon, 2013; Mawe and Hoffman, 2013). Elles sécrètent de la sérotonine dans la circulation sanguine, qui agit sur de nombreux tissus de l'organisme en tant que facteur endocrine.

La sérotonine plasmatique intervient à de nombreuses étapes de la régulation du métabolisme. Elle active la sécrétion de l'insuline par les cellules β -pancréatiques (Paulmann et al., 2009), active la lipolyse dans les adipocytes, la néoglucogénèse dans les cellules hépatiques (Sumara et al., 2012), la glycolyse dans les muscles, et inhibe l'absorption de glucose plasmatique par les cellules hépatiques et les adipocytes (El-Merahbi et al., 2015). La sérotonine plasmatique permet donc de contrer les effets délétères d'un jeûne (Sumara et al., 2012).

Figure II.C.2

La sérotonine intervient dans le fonctionnement de nombreux autres organes et cellules. Par exemple, elle est nécessaire à l'agrégation des plaquettes (Walther et al., 2003), la fonction cardiaque (Abzalov et al., 2015; Côté et al., 2003; Mialet-Perez et al., 2018; Nebigil and Maroteaux, 2001), elle inhibe la prolifération des ostéoblastes (Yadav et al., 2008), module la vasoconstriction et la vasodilatation (Berger et al., 2009), et intervient dans les réactions immunitaires (Nicole and Randy, 2013; Shajib and Khan, 2015). **Figure II.C.3**

La sérotonine intervient donc dans beaucoup de grandes fonctions de l'organisme, comme le métabolisme, la coagulation, la régulation de la masse osseuse, la digestion, l'immunité.

Les études décrites plus haut ont été réalisées chez les mammifères. Chez les poissons, moins d'études existent, mais l'implication de la sérotonine a tout de même été démontrée, comme chez les mammifères, dans les contractions intestinales (Velarde et al., 2010), l'immunité (Khan and Deschaux, 1997), la modulation du taux de glucose plasmatique (Caamaño Tubío et al., 2010) et du rythme cardiaque (Stoyek et al., 2017).

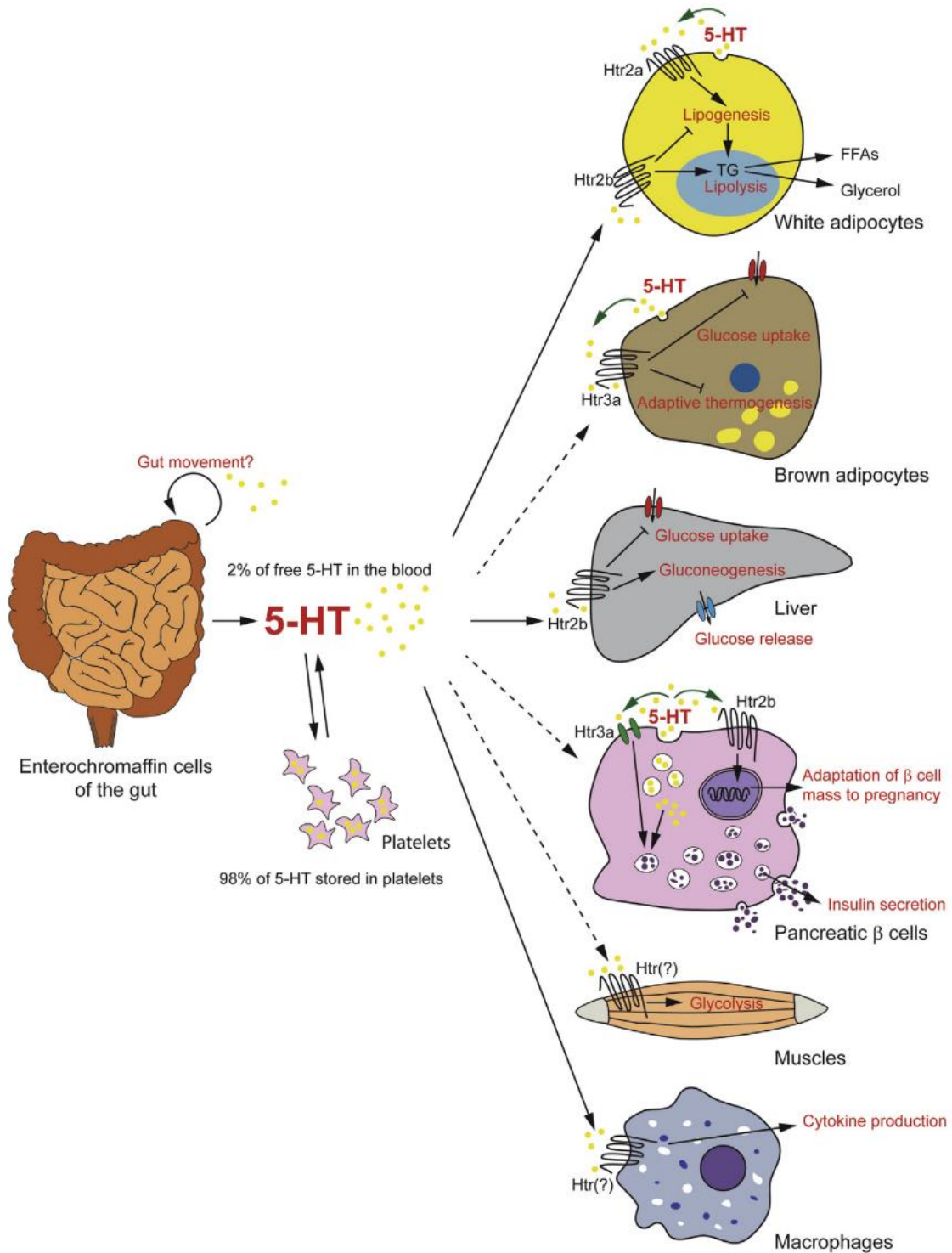


Figure II.C.2. Régulation du métabolisme par la sérotonine périphérique.

La majeure partie de la sérotonine est produite par les cellules entérochromaffines de l'intestin (GDS), où elle peut agir localement ou entrer dans la circulation sanguine générale. Dans le sang, la sérotonine est capturée et stockée dans les plaquettes. Seulement 2% de la sérotonine sanguine est libre dans le plasma et peut agir directement comme hormone. Dans les adipocytes blancs, la sérotonine active la lipolyse et la sécrétion d'acides gras libres (FFAs) et de glycérol. De la sérotonine peut aussi être produite par les adipocytes et régule la lipogenèse. Dans les adipocytes bruns, la sérotonine inhibe la thermogénèse et l'absorption de glucose. Dans le foie, la sérotonine active la néoglucogénèse et inhibe l'absorption de glucose. La sérotonine peut aussi être produite par les cellules β pancréatiques. La sérotonine produite localement active la sécrétion d'insuline et l'expansion des cellules β pancréatiques lors de la grossesse. La sérotonine périphérique pourrait aussi activer la glycolyse dans les muscles squelettiques, et moduler la production de cytokines par les macrophages. (El-Merahbi et al., 2015)

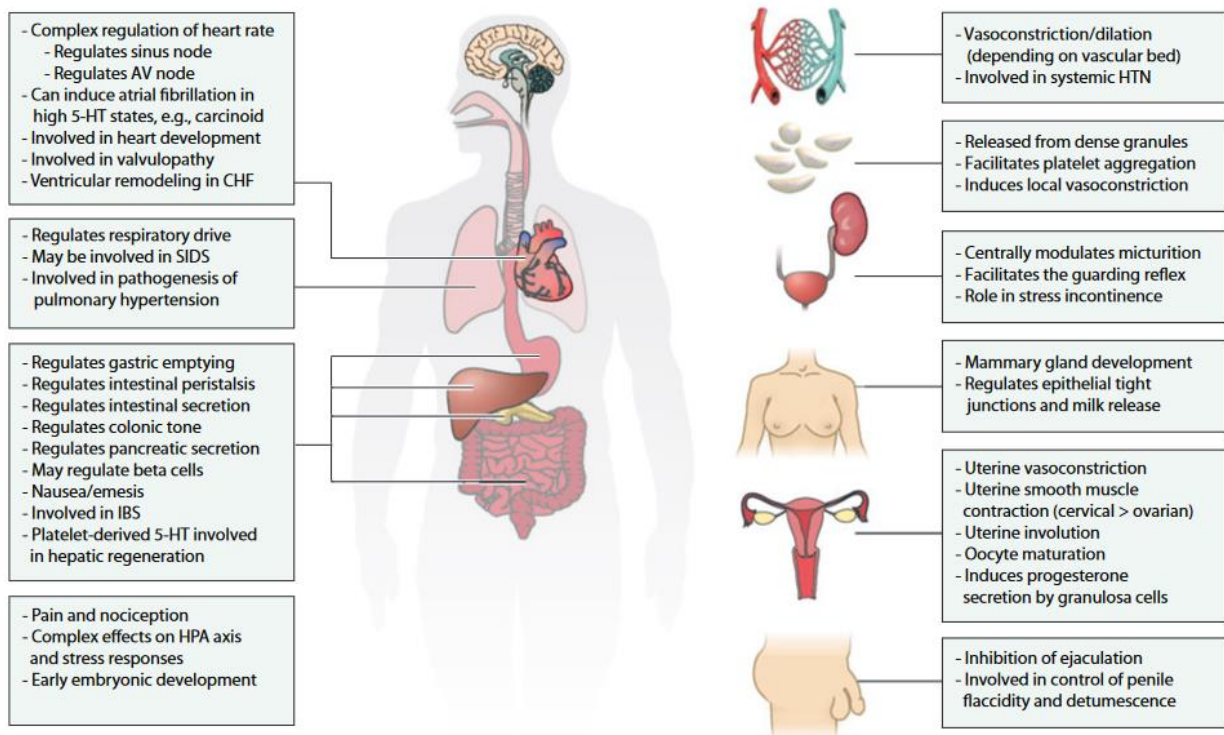


Figure II.C.3. Nombreux effets de la sérotonine en dehors du système nerveux central.

5-HT, serotonin; AV, atrioventricular; CHF, congestive heart failure; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal; HTN, hypertension; IBS, irritable bowel syndrome; SIDS, sudden infant death syndrome. (Berger et al., 2009)

Les fonctions développementales

La sérotonine joue un rôle dans beaucoup d'étapes du développement des réseaux neuronaux.

Un traitement à un inhibiteur de la TPH (pCPA) induit une réduction de la prolifération des cellules de la glie radiaire dans l'organe paraventriculaire chez le poisson zèbre (Pérez et al., 2013). Chez les mammifères l'inhibition de la synthèse de la sérotonine ou des lésions du raphé induisent aussi une diminution de cellules en prolifération dans le gyrus denté de l'hippocampe et la zone subventriculaire (Brezun and Daszuta, 1999; Brezun and Daszuta, 2000). La sérotonine est donc impliquée dans le contrôle de la neurogenèse.

De nombreuses études rapportent également l'implication de la sérotonine dans la différenciation des neurones, la croissance axonale et du corps cellulaire, la synaptogénèse et l'expression de récepteurs (Lauder, 1993; Lauder et al., 2000; Shemer et al., 1991; Van Kesteren and Spencer, 2003; Whitaker-azmitia et al., 1996; Whitaker-Azmitia and Azmitia, 1986). Par exemple, l'inhibition de la MAO au cours du développement induit une réduction de l'innervation 5-HT dans le cortex (Whitaker-Azmitia et al., 1994). [Figure II.C.4](#) et [II.C.5](#)

Le système sérotoninergique régule donc son propre développement. Mais il régule aussi le développement de ses cibles (Pronina et al., 2003; Vitalis et al., 2007; Vitalis et al., 2013). En effet, l'inhibition de la synthèse de sérotonine pendant le développement chez la souris entraîne un développement anormal des couches du néocortex, avec des altérations dans la croissance et la différenciation des neurones du cortex (Khozhai and Otellin, 2006). [Figure II.C.6](#)

Les autres monoamines interviennent aussi dans le développement du système nerveux (Levitt et al., 1997). Par exemple, la déplétion des neurones dopaminergiques qui innervent le striatum induit des défauts dans le développement du striatum (Lauder, 1993).

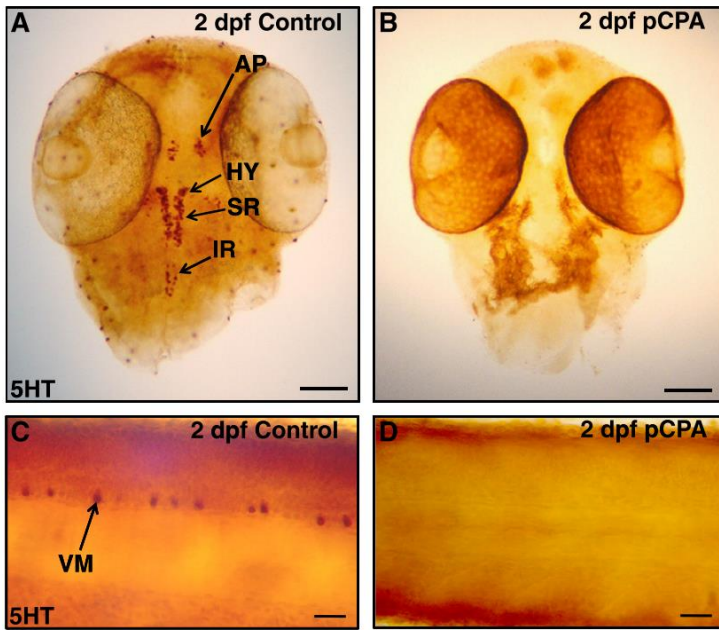


Figure II.C.4. Marquage aux anticorps anti-sérotonine chez des embryons de 2 dpf sous traitement ou non au pCPA.

(A) Image en vue dorsale de la tête de poisson zèbre contrôle de 2 dpf montrant les cellules sérotoninergiques labellisées. AP; hypothalamus, HY; superior raphe, SR; and inferior raphe, IR. (B) Même image pour un embryon traité avec 25 μ M pCPA à 1 dpf, ne montrant aucun marquage sérotoninergique. (C) Image latérale de la moelle épinière d'un poisson zèbre contrôle de 2 dpf montrant les cellules sérotoninergiques ventromédiales (VM). (D) Même image pour un embryon traité avec 25 μ M pCPA à 1 dpf, ne montrant aucun marquage sérotoninergique. Echelles: A, B=95 μ m; C, D=50 μ m. (Airhart et al., 2012)

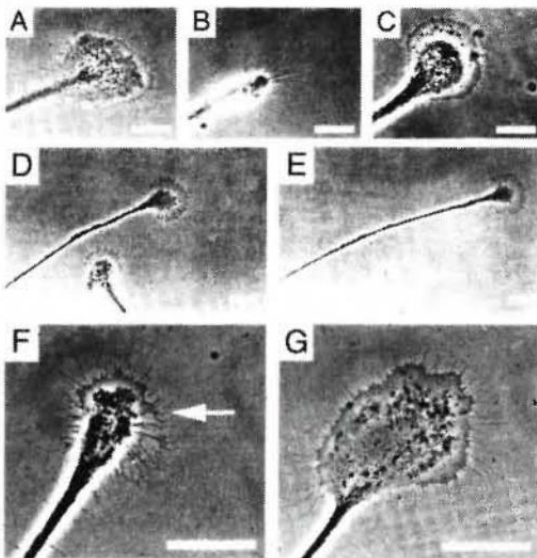


Figure II.C.5. La sérotonine induit la rétraction des cônes de croissance.

(A-C). Une application de sérotonine induit la rétraction des cônes de croissance. (A) Un cône de croissance d'une cellule cérébrale géante (CGC) avant l'application de sérotonine. (B) à 8 min après application de sérotonine (10^{-5} M), le cône de croissance s'est rétracté. (C) Deux heures plus tard, le cône de croissance est revenu à son état initial. (D-E) La libération spontanée de sérotonine provoque la rétraction du cône de croissance. (D) un cône de croissance d'une CGC (bas) approche le neurone d'une autre CGC (top), et (E) se rétracte spontanément. (F-G) La libération induite de sérotonine induit la rétraction du cône de croissance. (F) La stimulation intracellulaire du soma d'une CGC induit la rétraction de son cône de croissance (flèche). (G) Comme en (F) mais avec la présence d'antagoniste sérotoninergique (methysergide à 10^{-5} M). Le cône de croissance ne rétracte pas. Echelle : 25 μ m. (Van Kesteren and Spencer, 2003)

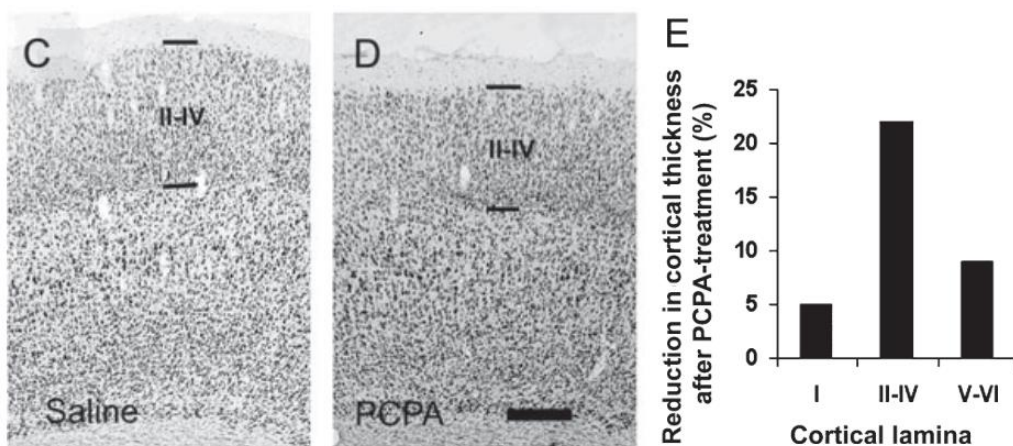


Figure II.C.6. Effets développementaux d'un traitement au pCPA.

(C et D) Section du cortex cérébral d'animaux traités (D) ou non (C) au pCPA. (E) Réduction de l'épaisseur du cortex exprimée en pourcentage. Echelle, 0.25 mm. (Vitalis et al., 2007)

Les monoamines ne sont pas seulement impliquées dans le développement du cerveau. Elles jouent aussi un rôle dans la morphogénèse d'autres organes, comme le cœur (Yavarone et al., 1993), les dents et le squelette craniofacial (Moiseiwitsch, 2000; Moiseiwitsch et al., 1998) et les yeux (Ori et al., 2013).

La présence de la MAO et des monoamines peuvent être détectée à des stades très précoces du développement, même avant l'apparition des premiers neurones. Une activité MAO a été mesurée dans des œufs non fertilisés de plusieurs espèces de téléostéens (Nicotra and Senatori, 1989; Senatori et al., 1990). Ceci est également vrai chez *Astyanax*, puisque des transcrits *mao* d'origine maternelle sont détectés dans des embryons au stade 2 cellules. De façon très intéressante, ces transcrits sont différenciellement exprimés chez les deux morphes (données non publiées de l'équipe, Julien Leclercq et al. ; voir aussi (Torres-Paz et al., 2019). Les monoamines pourraient agir à des stades précoces de l'embryogénèse. D'ailleurs, (Colas et al., 1999) ont montré chez la drosophile que la sérotonine déclenchait les changements d'adhérence cellulaire nécessaires à l'intercalation des cellules lors de la gastrulation.

Pathologies liées aux monoamines

Beaucoup de pathologies psychiatriques et neurodégénératives sont liées à un dérèglement des systèmes monoaminergiques. Il est impossible et hors de propos de décrire ici en détail la littérature sur le sujet, mais nécessaire de le mentionner.

On peut citer par exemple la dépression. La théorie monoaminergique de la dépression postule que l'origine de la dépression est un déficit de neurotransmission monoaminergique (sérotonine, dopamine et noradrénaline) et est basée sur beaucoup d'études montrant un lien entre la dépression et des modifications des systèmes monoaminergiques (Dean and Keshavan, 2017; Perez-Caballero et al., 2019). Les médicaments utilisés pour soigner la dépression agissent sur les systèmes monoaminergiques et sont par exemple des inhibiteurs de MAO, ou de recapture de la sérotonine.

Les désordres anxieux, comme le stress post traumatique sont aussi liés aux monoamines (Hidalgo and Davidson, 2000), de même que d'autres maladies psychiatriques, comme la schizophrénie (Akhondzadeh, 2001; Hökfelt et al., 1974) et les désordres du spectre autistique (Cook and Leventhal, 1996; Whitaker-Azmitia, 2005).

La cause de la maladie de Parkinson est une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire, entraînant un dysfonctionnement du circuit des ganglions de la base. D'autres maladies neurodégénératives, comme la maladie de Huntington et la maladie d'Alzheimer sont aussi liées aux monoamines (Cepeda et al., 2018; Šimić et al., 2018).

D. La monoamine oxydase (MAO)

Les MAOs des mammifères

La monoamine oxydase est une flavoprotéine qui catalyse la déamination oxydative des amines biogènes et est située dans la membrane extérieure des mitochondries des neurones, des cellules de la glie et d'autres cellules, comme les plaquettes, les hépatocytes et les cellules rénales (Berry et al., 1994; Levitt et al., 1982).

La monoamine oxydase des mammifères existe sous deux isoformes, MAO-A et MAO-B. Les deux gènes sont situés sur le chromosome X et proviennent probablement d'une duplication (Grimsby et al., 1991; Shih et al., 1988). Les deux formes diffèrent par leur spécificité de substrats et d'inhibiteurs. La MAO-A oxyde principalement la sérotonine et la noradrénaline et est inhibée par de faibles concentrations de clorgyline, et la MAO-B préfère la phenylethylamine (PEA) et la benzylamine et est inhibée par de faibles concentrations de pargyline et de deprenyl. La dopamine et la tyramine sont dégradées par les deux formes (Shih et al., 1999). Chaque isoenzyme lie covalamment le cofacteur FAD.

Binda et al., (2002) ont en premier déterminé la structure aux rayons X de la MAO-B humaine. Elle possède un domaine globulaire et une hélice α en C-terminal permettant l'ancrage à la membrane des mitochondries. La troncature du domaine C-terminal induit une baisse significative de l'activité enzymatique de la MAO-B (Rebrin et al., 2001). Son et al., (2008) ont aussi noté une diminution d'activité de la MAO-A lorsqu'elle est solubilisée et ont suggéré que les fluctuations du domaine globulaire, indépendantes de la membrane (par mouvement Brownien) provoque des changements de conformation proche de l'entrée du site actif et induisent son ouverture. L'entrée du site actif de la MAO-A est formée par les résidus V93-E95, Y109-P112, et F208-N212, formant trois boucles. L'espace entre les boucles est trop étroit pour que les substrats puissent passer. Des changements conformationnels de ces boucles sont donc nécessaires à l'activité enzymatique (Son et al., 2008). **Figure II.D.1**

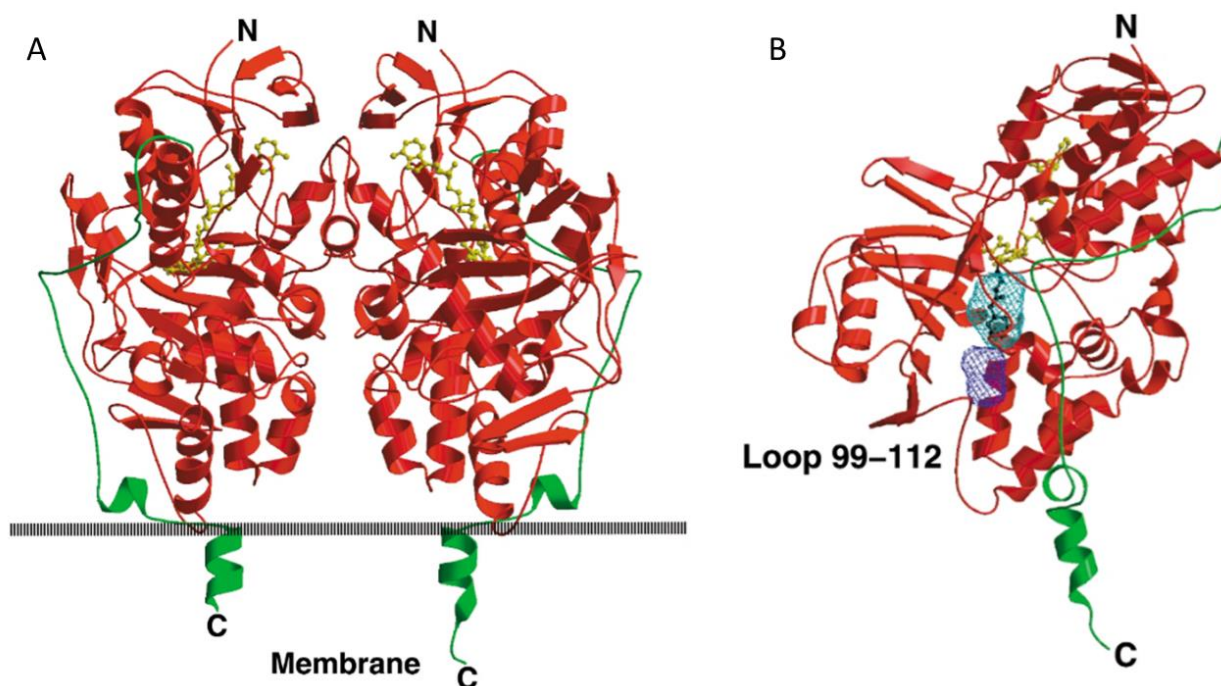


Figure II.D.1. Structure de la MAO-B humaine.

(A) Schématisation en rubans du dimère de la MAO-B avec l'axe vertical dans le plan de la feuille. Les lettres 'N' et 'C' indiquent respectivement les parties N-terminales et C-terminales. Les résidus 4 à 460 sont en rouge, et la queue C-terminale (résidus 461 à 500) sont en vert. Le dimère est ancré dans la membrane externe mitochondriale par la queue C-terminale et les résidus voisins de chaque monomère. La frontière avec la membrane est montrée en gris, et le cofacteur FAD est montré en jaune.

(B) Le chemin des substrats depuis la surface de la protéine jusqu'à la flavine est constitué de cavités. La cavité d'entrée (bleu) est adjacente au site actif (cyan), et est derrière la boucle 99-112. La pargyline (inhibiteur covalent) est en noir. Le modèle a été tourné de 90° selon l'axe vertical dans le plan de la feuille, par rapport au schéma en (A). (Binda et al., 2002)

Dans le cerveau humain, la MAO-A est retrouvée principalement dans la substance noire, le locus cœruleus, le striatum et d'autres aires contenant des neurones catécholaminergiques (Di Monte et al., 1996; Westlund et al., 1993). La MAO-B est retrouvée dans les mêmes régions en moindre quantité, mais est plus abondante que la MAO-A dans le raphé (Konradi et al., 1988).

La réaction catalysée par la MAO produit de l' H_2O_2 , qui est une espèce réactive de l'oxygène qui peut générer des dommages cellulaires. **Figure II.D.2**

Dans le cœur des mammifères, la production de H_2O_2 augmente avec l'âge et induit des dommages (Deshwal et al., 2017). Maurel et al., (2003) ont montré que cette augmentation pourrait être due majoritairement à l'activité de la MAO-A, qui augmente aussi avec l'âge. La MAO pourrait aussi contribuer à la dysfonction mitochondriale dans la maladie de Parkinson (Cohen et al., 1997), et l'apparition ou l'aggravation de cancers

(Shih, 2018). De plus, un traitement au deprenyl est connu pour prolonger la durée de vie de plusieurs espèces animales (Kitani et al., 2002).

Ceci suggère donc que l'activité enzymatique de la MAO entraîne un stress oxydatif qui pourrait être délétère sur le long terme.

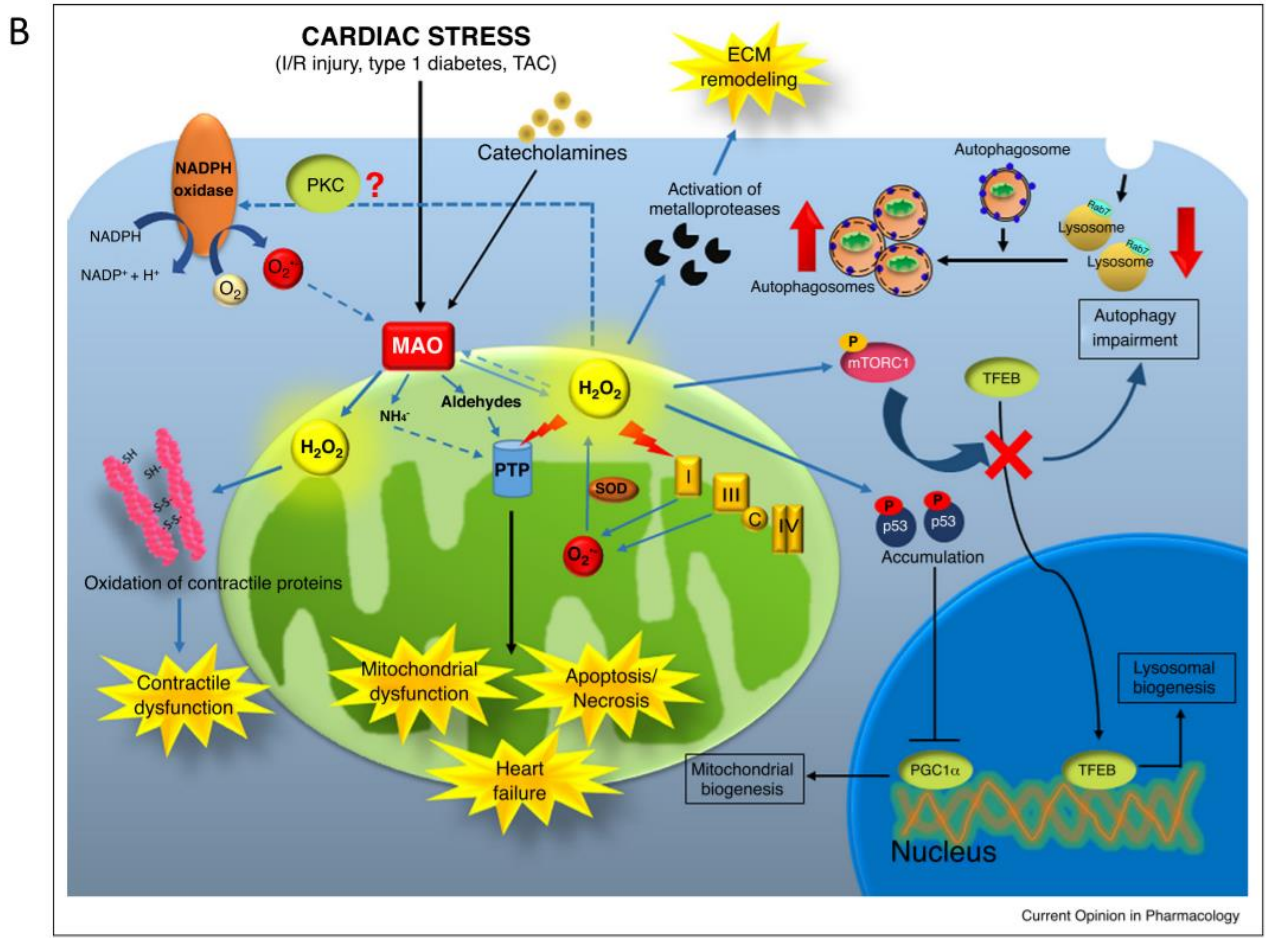
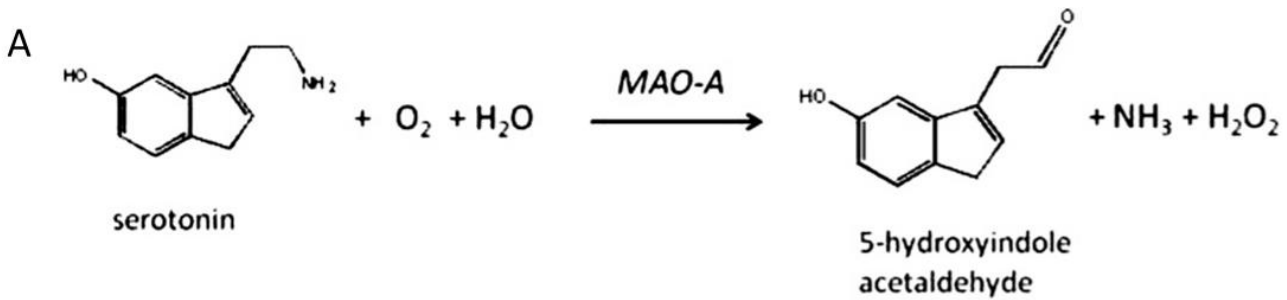


Figure II.D.2. Représentation schématique des effets impliquant la MAO dans le myocarde malade.

(A) Réaction enzymatique de la MAO-A produisant de l'H₂O₂.

(B) Une up-régulation de l'activité de la MAO, par exemple due à une disponibilité des substrats plus importante, provoque une augmentation de la formation de H₂O₂ et d'aldéhydes qui peuvent directement affecter le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire et l'ouverture du PTP (permeability transition pore), menant à la mort du cardiomyocyte, des dommages oxydatifs de la mitochondrie et une insuffisance cardiaque. De plus, l'activation excessive de la MAO-A active p53 et son accumulation, ce qui inhibe PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1α), un régulateur central de la biogénèse des mitochondries. L'H₂O₂ formé par la MAO-A active mTORC1 qui bloque la translocation au noyau du facteur de transcription EB (TFEB), le régulateur de la biogénèse des lysosomes, causant une déficience de l'autophagie et une accumulation d'autophagosomes, de protéines ubiquitinylées et de mitochondries fragmentées. De plus, les ROS (espèces réactives de l'oxygène) produites par la MAO remodelent la matrice extracellulaire via l'activation des metalloprotéases. (Deshwal et al., 2017)

La MAO des poissons

Les téléostéens ne possèdent qu'une seule MAO, homologue à celles des mammifères avec lesquelles elle partage 70% d'identité et la même organisation introns-exons (Anichtchik et al., 2006; Chen et al., 1994; Setini et al., 2005). Comme celles des mammifères, la MAO des poissons est présente dans de nombreux tissus et dégrade la tyramine, la sérotonine, la PEA, la dopamine (Aldeco et al., 2011; Anichtchik et al., 2006; Chen et al., 1994; Setini et al., 2005).

La MAO est exprimée dans de nombreuses zones du cerveau, dont le télencéphale, le noyau suprachasmatique, l'habenula, l'hypothalamus, le raphé, le locus coeruleus, le lobe vagal... (Anichtchik et al., 2006).

L'activité de la MAO des poissons est inhibée par la clorgyline et le deprenyl, mais l'intensité de l'inhibition n'est pas toujours cohérente entre les études. Certaines études montrent une inhibition complète de la MAO des poissons par ces inhibiteurs (Setini et al., 2005), alors que d'autres montrent seulement une inhibition partielle (Anichtchik et al., 2006).

Déficiences MAO

Un déficit d'activité enzymatique MAO peut être provoqué par des traitements pharmacologiques ou des manipulations génétiques. Dans les deux cas, on observe une hausse des taux de sérotonine, noradrénaline et dopamine et une baisse des taux de leurs métabolites dans le cerveau, aussi bien chez les mammifères que chez les poissons (Cases et al., 1995; Chen et al., 2004; Popova et al., 2001; Sallinen et al., 2009). En plus des modifications de neurochimie, les déficiences MAO s'accompagnent de modifications du comportement.

La perte combinée des gènes MAO-A et MAO-B à cause d'une délétion dans le chromosome X, incluant aussi la perte du gène de la maladie de Norrie, a été décrite chez quelques patients. En plus des symptômes de la maladie de Norrie, ces patients présentaient une déficience intellectuelle sévère, un comportement autistique et des crises d'épilepsie (Collins et al., 1992). En 1993, Brunner et al., (1993) ont décrit une famille avec une mutation ponctuelle dans le gène de la MAO-A, entraînant des déficits intellectuels liés à l'X. Les hommes de cette famille porteurs de la mutation présentaient aussi ces comportements agressifs et violents induits par le stress et une impulsivité. Plus tard, Piton et al., (2014) ont décrit une autre mutation dans le gène de la MAO-A dans une autre famille, avec les mêmes symptômes. Après séquençage du gène de la MAO-A, quatre polymorphismes ont été particulièrement étudiés comme de potentiels biomarqueurs/facteurs de risque pour des déficits psychiatriques, dont certains induisent une modification de l'expression de *MOA-A* (Bortolato and Shih, 2011).

Une déficience MAO-A chez la souris est aussi associée à des comportements violents (Cases et al., 1995; Scott et al., 2008), des troubles autistiques, une réduction de l'activité d'exploration (Godar et al., 2011), et des comportements de stress exagérés (Kim et al., 1997). Une réduction de l'activité MAO-A en revanche ne provoque pas de modifications de l'agressivité, mais affecte les comportements sociaux et l'anxiété (Bortolato et al., 2011). [Figure II.D.3](#)

Une déficience de la MAO-B provoque des changements de comportement plus modestes. Les souris MAO-B KO auraient une réduction des comportements anxieux dans le « elevated plus maze » et une tendance à explorer plus intensément les nouveaux objets (Bortolato and Shih, 2011).

Les phénotypes ou symptômes des doubles mutants MAO-A KO et MAO-B KO dépassent en gravité les symptômes des simples mutants même combinés, ce qui suggère que lors de l'absence de l'une des isoenzymes, l'autre prend partiellement en charge son rôle catalytique. Les doubles mutants KO présentent une forte agressivité, et des niveaux d'anxiété élevés (Chen et al., 2004).

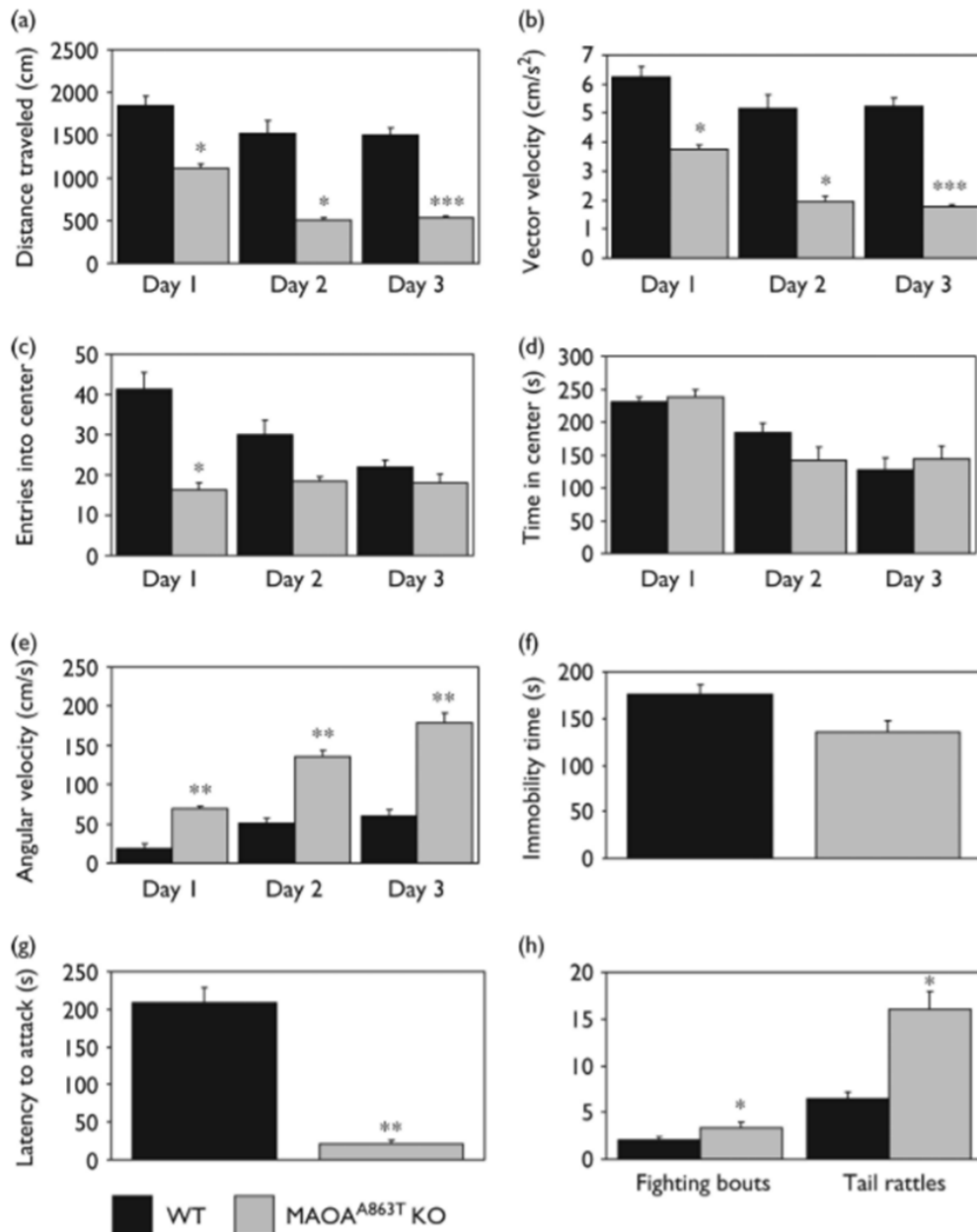


Figure II.D.4. Les altérations comportementales chez la souris MAOA KO.

Les souris MAOA KO présentent une activité locomotrice diminuée dans un nouvel environnement ouvert, indiqué par une distance parcourue réduite (a) et une accélération (cm/s^2) réduite (b) pendant les premières 5 min dans l'environnement. Bien que les souris MAOA KO entrent dans la zone centrale moins de fois le premier jour (c), elles n'y passent pas significativement moins de temps (d). Les souris MAOA KO présentent aussi une vitesse angulaire plus élevée (cm/s) (e). Les souris MAOA KO ne passent pas significativement moins de temps immobile dans un test de suspension par la queue (f). Les souris MAOA KO ont une agressivité augmentée dans le test résident-intrus, mesurée par la latence avant la première attaque (g), et le nombre de séquences d'agression et de battements de queue (h). (Scott et al., 2008)

III. Le modèle *Astyanax mexicanus*

A. Deux morphotypes, différentes populations

Le poisson characidé *Astyanax mexicanus* existe sous deux formes, ou morphotypes, interfertiles : des poissons de surface vivant dans les rivières et les points d'eau d'Amérique centrale, et des poissons cavernicoles vivant dans 30 grottes au Nord-Est du Mexique (Elliott, 2018; Mitchell et al., 1977). On suppose que l'ancêtre commun aux deux morphes, probablement ressemblant à un poisson de surface, aurait colonisé les grottes il y a environ 20 000 ans. Les poissons se seraient ensuite adaptés à l'obscurité constante de l'environnement cavernicole (Fumey et al., 2018; Policarpo et al., 2020).

Les grottes sont divisées en trois groupes géographiques, El Abra, Micos et Guatemala, dans lesquels les populations cavernicoles dériveraient d'évènements de colonisation indépendantes (Bradic et al., 2012). **Figure III.A.**

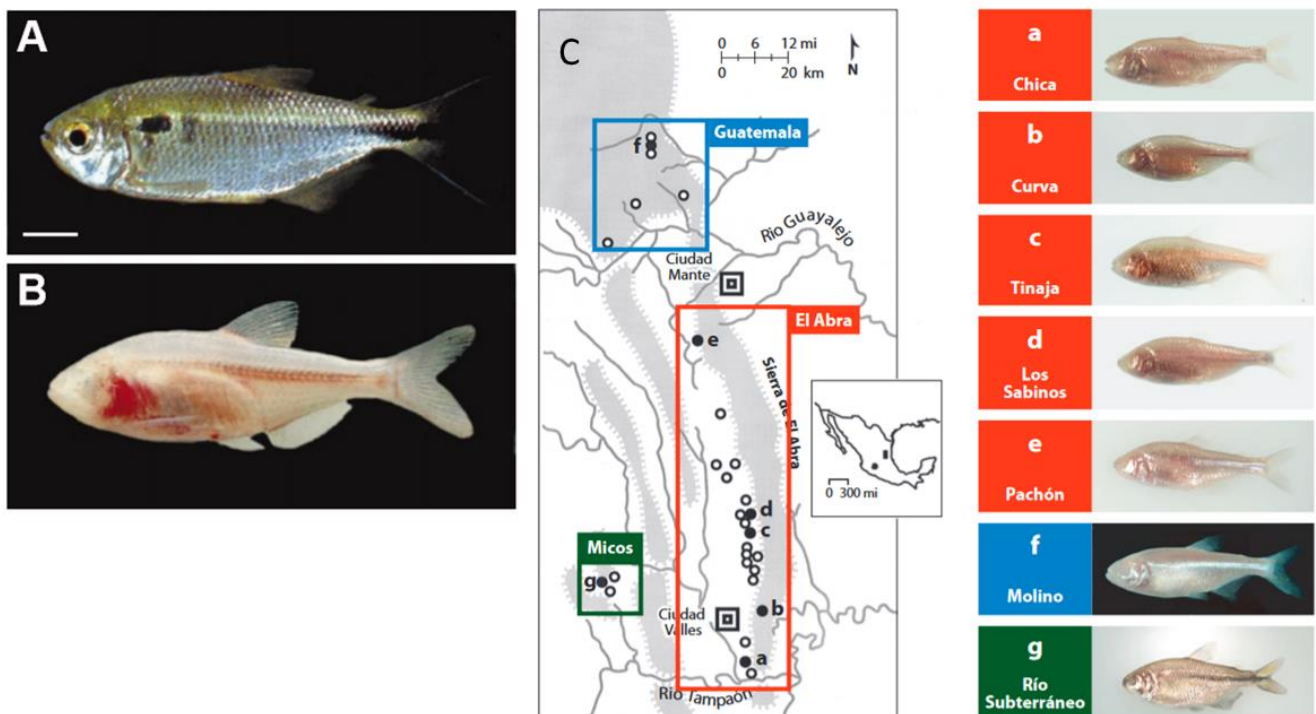


Figure III.A. Différents morphotypes et populations de l'espèce *Astyanax mexicanus*

Les formes de surface (A) et cavernicoles (B) d'*Astyanax mexicanus*. Echelle 1 mm. (Jeffery et al., 2000)

(C) Gauche : Une carte montrant la région contenant 29 populations différentes d'*Astyanax* cavernicoles dans le Nord-Est du Mexique. Les cercles indiquent la position approximative des grottes avec les *Astyanax* cavernicoles. Les cercles pleins (a–g) indiquent les populations cavernicoles dont certains individus sont montrés sur la droite. Les groupes Guatemala, El Abra, et Micos sont indiqués sur la carte. Icône insérée : carte du Mexique montrant la région Nord-Est (rectangle plein). Droite : exemples de poissons cavernicoles différents. (Jeffery, 2009)

B. Environnement naturel

Caractéristiques du milieu cavernicole :

Les *Astyanax* cavernicoles vivent dans des grottes qui se sont formées par érosion karstique. **Figure III.B** Concernant les aspects abiotiques, le milieu cavernicole est un environnement tamponné, avec peu de variation de température, de pH et de salinité (Mitchell et al., 1977).

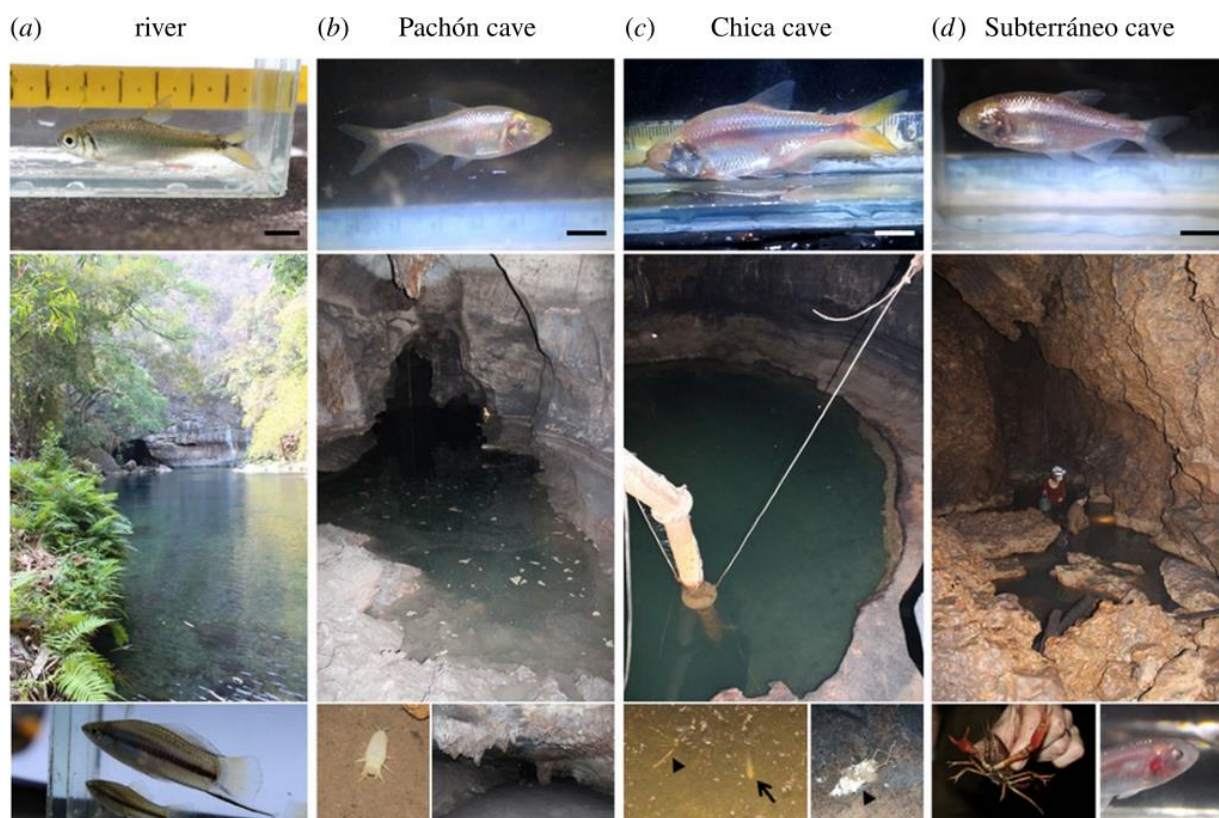


Figure III.B. Les formes de surface et cavernicoles d'*Astyanax mexicanus* et leurs environnements.

La morphologie du poisson et son environnement sont illustrés pour une rivière et trois grottes différentes. Echelles, 1 cm. (a) Poisson de surface. Le spécimen vient de Nacimiento del Rio Choy. Son environnement est caractérisé par une lumière ambiante et une production primaire. Le poisson forme des bancs larges et côtoie d'autres espèces de poisson (exemple montré : poeciliids). (b) Poisson cavernicole de Pachón. La grotte de Pachón est isolée, et l'eau entre exclusivement par percolation à la saison des pluies. Le fond de l'eau est de la boue, qui sert de nourriture aux poissons adultes. Ils côtoient plusieurs arthropodes troglomorphes, dont certains de grande taille, comme *Speocirolana pelaezi* (3 cm) montré en bas à gauche, et qui sont aussi des proies pour les poissons. (c) Poissons cavernicoles de Chica. La grotte de Chica reçoit régulièrement de l'eau entrant dans la grotte et héberge une grande population de chauves-souris. Les poissons (flèche) nagent dans de l'eau avec beaucoup de matière organique, dont des cadavres de chauve-souris en décomposition (triangles pleins) et des débris apportés depuis la surface par les flux d'eau. (d) Poissons cavernicoles de Subterraneo. La grotte de Subterraneo a un substrat fait de rochers. Les flux d'eau entrant dans la grotte apportent des poissons de surface et des hybridations arrivent parfois. La figure en bas à droite montre un hybride de type F2 avec des yeux. Il cohabite avec des poissons cavernicoles aveugles. Dans cette grotte, il y a des prédateurs, comme l'écrevisse non-troglomorphique montrée en bas à gauche. (Torres-Paz et al., 2018)

Dans cet environnement sans lumière, la nourriture a principalement quatre sources. (1) les organismes chimio-autotrophes, mais leur présence n'a pas été étudiée dans les grottes des *Astyanax*. (2) des animaux qui entrent dans la grotte et déposent des fèces (guano de chauve-souris par exemple), des restes de nourriture ou y meurent. (3) des flux d'eau arrivant par l'entrée des grottes et apportant de la matière organique venant de la surface. (4) de l'eau infiltrée chargée en matière organique et micro-organismes. La quantité de matière

organique disponible varie beaucoup dans le temps et entre les grottes (Culver and Pipan, 2009). Par exemple, à la saison des pluies, les flux d'eau entrant dans les grottes sont plus importants. De plus, certaines grottes, comme Chica et Los Sabinos ont de larges populations de chauve-souris, alors que d'autres en ont peu. L'entrée de certaines grottes comme Tinaja sont au fond d'une dépression topographique, favorisant l'entrée d'eau et de matière organique, tandis que l'entrée de Pachón, par exemple, est perchée sur un flanc de colline (Mitchell et al., 1977). Il est communément admis que la nourriture disponible dans une grotte est peu abondante (Culver and Pipan, 2009). Cependant, l'analyse du contenu du tube digestif de poissons de Pachón a montré que les poissons étaient relativement bien nourris (Espinasa et al., 2017).

Hormis quelques écrevisses dans certaines grottes (Subterraneo), il n'y a en général pas de prédateur.

Très peu d'études ont été réalisées sur les parasites chez l'*Astyanax*, mais l'environnement des grottes a en général peu de parasites, puisque les hôtes intermédiaires doivent être eux aussi adaptés à l'environnement cavernicole pour que le parasite puisse y vivre. D'ailleurs, (Yang et al., 2016a) ont montré une réduction du nombre de gènes de l'immunité chez d'autres poissons cavernicoles, les *Sinocyclocheilus* cavernicoles.

Caractéristiques du milieu en surface :

Les *Astyanax* de surface vivent dans des rivières ou points d'eau d'Amérique centrale, où ils pullulent (Figure III.B (a)). La présence de lumière en surface facilite la recherche de nourriture et de partenaires sexuels, mais par certains aspects, l'environnement en surface est plus contraignant que l'environnement des grottes. Les variations de température jour-nuit sont plus importantes. De plus, à la saison sèche, les poissons peuvent se retrouver piégés dans de petites mares où la température peut fortement monter. La région, et donc les points d'eau sont aussi parfois très pollués.

C. Description du modèle

Les poissons de surface et les poissons cavernicoles diffèrent sur beaucoup d'aspects morphologiques, physiologiques et comportementaux, en lien avec leur milieu de vie respectif.

Caractères morphologiques :

Les poissons cavernicoles possèdent un certain nombre de caractères morphologiques réduits ou régressifs :

- Les yeux des poissons cavernicoles dégénèrent pendant leur développement (Hinaux et al., 2015; Jeffery, 2009), ce qui s'accompagne d'une réduction de la taille du tectum optique. Figure III.C.1A et 1B
- Les poissons cavernicoles ne synthétisent pas la mélanine (Bilandžija et al., 2013; McCauley et al., 2004). Ce caractère est en partie dû à une inactivation du gène *oculocutaneous albinism 2 (oca2)*, impliqué dans le transport des précurseurs de la mélanine dans les mélanosomes (Protas et al., 2006). De manière intéressante, ce gène est inactivé dans les grottes Pachón et Molino, mais les délétions dans le gène diffèrent entre ces populations (Protas et al., 2006), montrant une évolution indépendante mais convergente de l'albinisme et de l'inactivation de ce gène.
- Les poissons cavernicoles possèdent aussi des écailles réduites (Simon et al., 2017; Wilkens, 1988). Figure III.C.1C

La réduction de ces structures (œil, pigmentation, écailles) permettrait d'économiser l'énergie nécessaire à leur développement et leur maintien, dans un environnement où l'accès à la nourriture est limité (Protas et al., 2007). La réduction de ces structures n'entraînerait pas de désavantage étant donné leur inutilité dans l'environnement cavernicole (absence de lumière, d'UV et d'attaques de congénères).

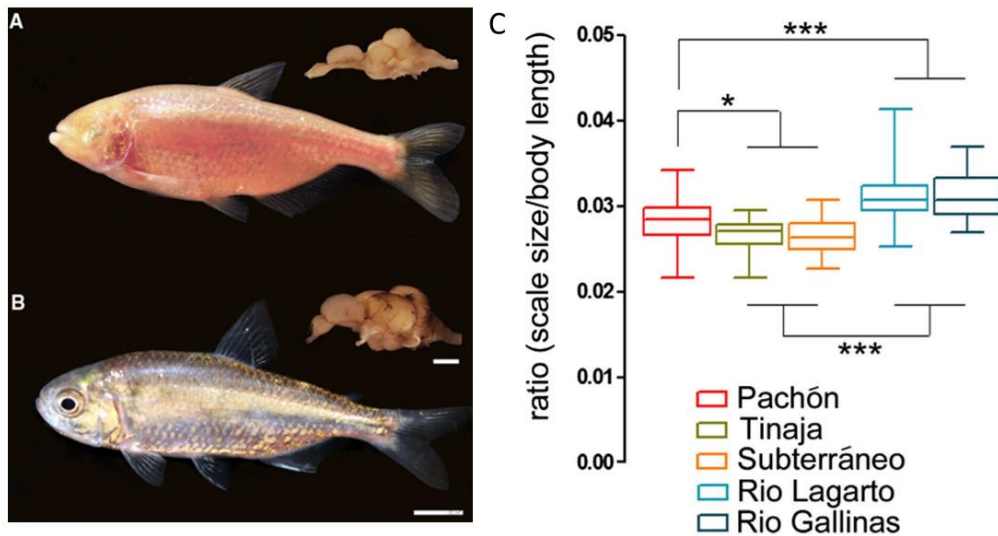


Figure III.C.1. Réduction des yeux, de la pigmentation et des écailles chez le poisson cavernicole.

Les formes cavernicole (A) et de surface (B) de l'espèce *Astyanax mexicanus* avec leurs cerveaux disséqués. Echelles 1 cm (poissons) et 200 μ m (cerveaux). (Strickler and Soares, 2011)

(C) Ratios taille des écailles/longueur du corps des différentes populations d'*A. mexicanus*. (Simon et al., 2017)

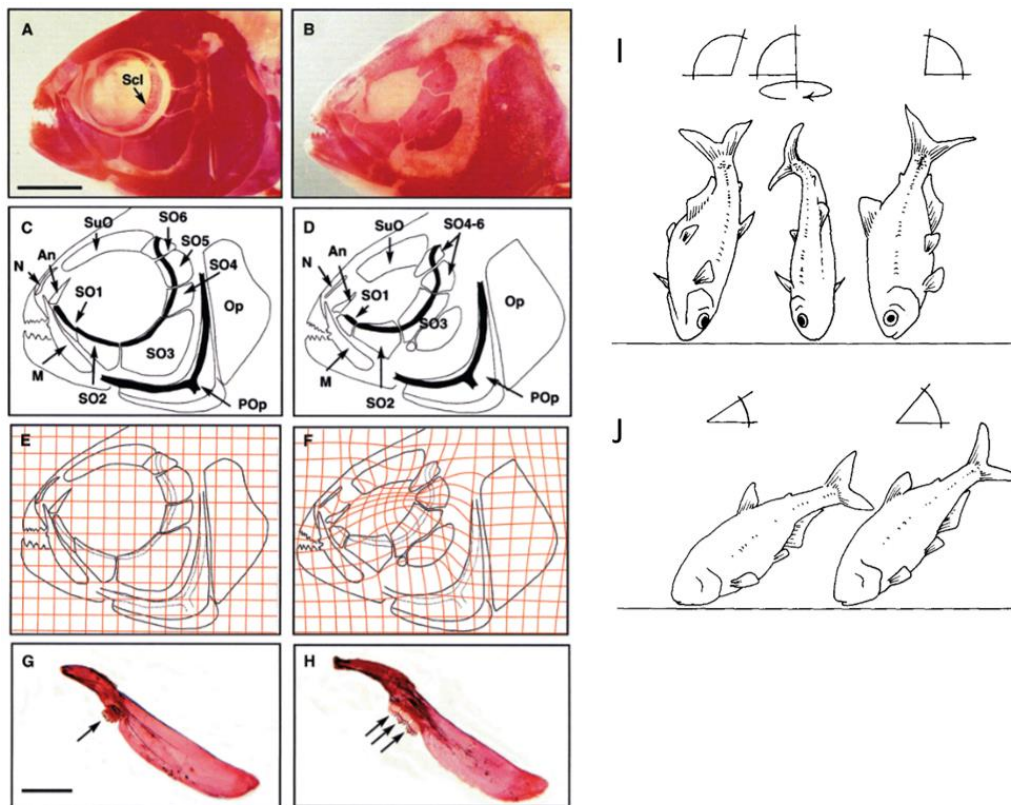


Figure III.C.2. Modifications du squelette craniofacial et du comportement de prise alimentaire chez le poisson cavernicole.

Poisson de surface (A) et cavernicole (B) marqués montrant la morphologie des os craniofaciaux. (C and D) Dessins de A et B, respectivement, avec les os du squelette craniofacial annotés. N, nasal bone; An, antorbital bone; M, maxillary bone; SuO, supraorbital bone; SO1–6, suborbital bones 1–6; POp, preopercular bone; Op, opercular bone. Les canaux suborbital (haut) et préoperculaire (bas) des neuromastes crâniens sont en noir. (E and F) Les changements dans le squelette craniofacial des poissons cavernicoles par rapport au squelette des poissons de surface sont illustrés sur une grille. Echelle en A : 225mm. (G and H) Os maxillaires disséqués à partir de poissons de surface (g) et cavernicoles (H) montrant des différences dans le nombre de dents (flèches). Echelle en G : 40mm. (Yamamoto et al., 2003)

(I, J) Comportement alimentaire dans le noir complet des poissons de surface (I) et cavernicoles (J). (Schemmel, 1980)

En plus de ces caractères morphologiques réduits, les poissons cavernicoles possèdent des caractères morphologiques amplifiés, comme l'augmentation du nombre de dents et de la taille de la mâchoire. De manière générale, le squelette craniofacial est modifié chez le poisson cavernicole (Atukorala et al., 2013; Gross et al., 2014; Yamamoto et al., 2003), ce qui est probablement en lien avec son régime alimentaire et le mode de prise de la nourriture, modifié chez les poissons cavernicoles (Kowalko et al., 2013a; Schemmel, 1980). En effet, il a été montré que des modifications du squelette craniofacial pouvaient apparaître sous la pression de sélection imposée par des changements de l'environnement, de mode de prise de la nourriture ou de source de nourriture (Kocher, 2004). **Figure III.C.2**

Caractères comportementaux :

Les systèmes sensoriels non visuels des poissons cavernicoles sont augmentés. Les poissons cavernicoles ont un odorat plus développé que les poissons de surface (Bibliowicz et al., 2013; Blin et al., 2018; Hinaux et al., 2016; Wilkens, 1988), leur permettant sans doute de mieux trouver de la nourriture dans le noir. Il a été montré que leur aptitude à trouver de la nourriture dans le noir était supérieure à celle des poissons de surface (Hüppop, 1987; Yoshizawa et al., 2010). Cet odorat performant est notamment dû à une taille plus importante des narines, épithéliums et bulbes olfactifs et à une quantité plus importante de neurones TRPC2-positifs (sensibles aux odeurs de nourriture) dans les épithéliums olfactifs (Bibliowicz et al., 2013; Blin et al., 2018; Wilkens, 1988) (**Figure III.C.3**). La ligne latérale est aussi plus développée chez les poissons cavernicoles que les poissons de surface. La ligne latérale est retrouvée chez toutes les espèces de poissons (et amphibiens) et est constituée de mécanorécepteurs appelés les neuromastes. Les poissons cavernicoles possèdent des neuromastes plus nombreux et plus gros que les poissons de surface (Schemmel, 1967; Teyke, 1990). **Figure III.C.4E et 4F**

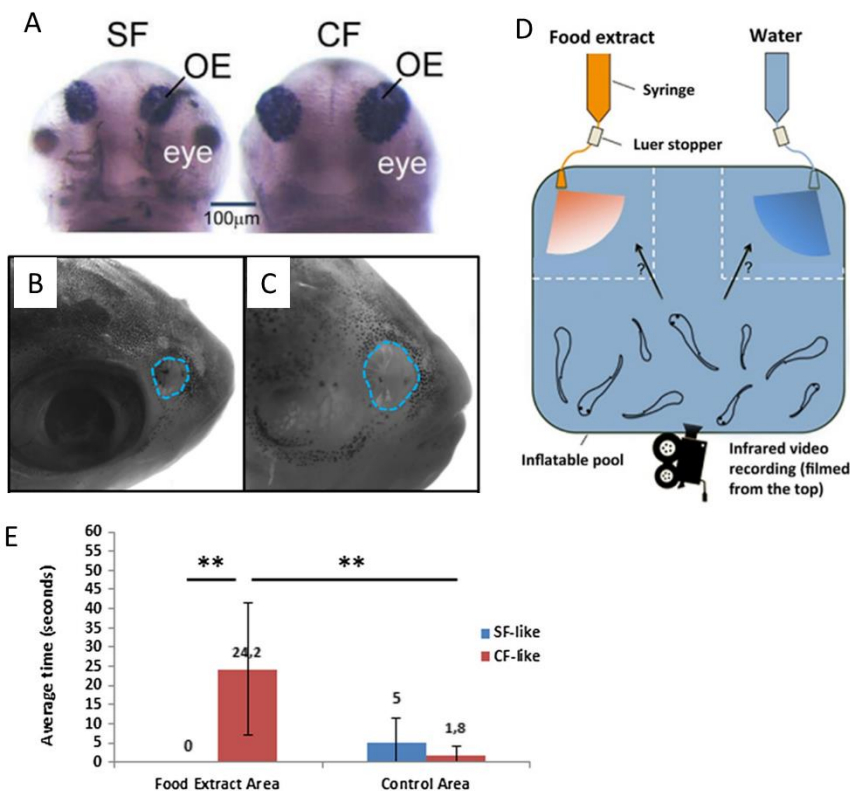


Figure III.C.3. Sens de l'odorat augmenté chez le poisson cavernicole. (A) Photographies de têtes de larves de 64 hpf après marquage des épithéliums olfactifs, en vue frontale. Le SF (poisson de surface) est sur la gauche, le CF (poisson cavernicole) sur la droite. Echelle 100 µm. (Blin et al., 2018) (B, C) Les mesures de la circonférence de la narine montrent une plus petite taille de la narine chez les poissons de surface (B) que chez les poissons cavernicoles (C). (D) Appareil expérimental (E) Temps passé dans la zone d'odeurs de nourriture ou la zone contrôle. (Bibliowicz et al., 2013)

Les poissons cavernicoles sont attirés par des vibrations d'environ 35Hz (vibration attraction behavior : VAB) (Yoshizawa et al., 2010). Les proies des poissons dans des grottes sont des petits invertébrés (Espinasa et al., 2017), qui produisent des vibrations à cette fréquence (Montgomery and Macdonald, 1987). Le VAB pourrait donc aider les poissons cavernicoles à trouver des proies. En effet, les poissons qui sont fortement attirés par les vibrations trouvent mieux des proies que les poissons non attirés par les vibrations (Yoshizawa et al., 2010). L'inactivation des neuromastes superficiels abolit le VAB (Yoshizawa et al., 2010). Ils sont donc nécessaires au VAB. Figure III.C.4

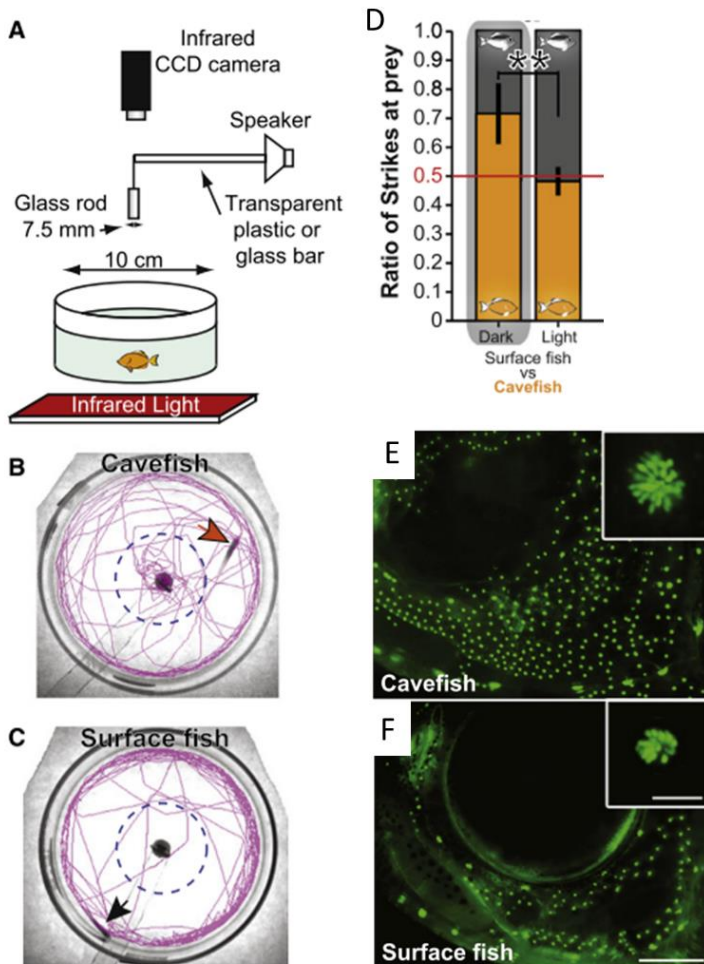


Figure III.C.4. Les neuromastes et le VAB (Vibration attraction behavior).

(A) Schéma du dispositif expérimental utilisé pour enregistrer le comportement d'attraction aux vibrations (VAB) dans le noir. Une lumière infrarouge éclaire le bac cylindrique par le dessous. Les mouvements du poisson sont enregistrés par une caméra infrarouge positionnée au-dessus du bac. Une tige de verre est mise dans le bac pour produire des vibrations. (B et C) Trajectoires (rose) de nage d'un poisson cavernicole de Pachón (B) et d'un poisson de surface (C) pendant une durée de 3 minutes. La ligne en pointillés représente une aire de 2 cm de diamètre entourant la tige de verre (point noir au milieu). (D) Tests de compétition de chasse. Les barres montrent la proportion de frappes sur les proies entre les poissons de surface (gris) et cavernicoles (jaune). (E, F) Marquage des neuromastes dans la région SO-3 chez le poisson cavernicole (E) et le poisson de surface (F). Echelle : 1.0 mm. Les encarts montrent la taille d'un neuromaste typique de la région SO-3. Echelle : 50 µm. (Yoshizawa et al., 2010)

Le sommeil est très réduit chez les poissons cavernicoles (Duboué et al., 2011; Yoshizawa et al., 2015), ce qui leur permet de passer plus de temps à chercher de la nourriture. La signalisation hypocrétine (HCRT) est impliquée dans la perte du sommeil chez les poissons cavernicoles. Les poissons de Pachón ont plus de neurones à HCRT que les poissons de surface. Cette augmentation de la signalisation HCRT contribue à la perte du sommeil (Alié et al., 2018; Jaggard et al., 2018). D'autres facteurs influencent le sommeil chez l'*Astyanax*, comme les neuromastes et l'état de nutrition du poisson (Jaggard et al., 2017). Mais leur effet sur le sommeil passe par une intégration par les neurones HCRT (Jaggard et al., 2018).

Des poissons cavernicoles entraînés avec un rythme jour nuit possèdent un rythme circadien d'activité locomotrice et d'expression de *per1* (Beale et al., 2013; Carlson and Gross, 2018), même si le pic d'expression de *per1* est retardé de 6h par rapport aux poissons de surface. Ce rythme persiste lorsque ces poissons entraînés sont placés en noir constant, mais les amplitudes des variations circadiennes sont diminuées (Beale et al., 2013; Erckens and Martin, 1982). Les poissons cavernicoles possèdent donc toujours un oscillateur pouvant se caler avec de la lumière, mais les rythmes circadiens sont altérés dans le noir constant. Lorsque les poissons cavernicoles sont élevés dans le noir, ils n'ont pas de rythme circadien. L'oscillateur serait donc une relique évolutive (Carlson and Gross, 2018; Erckens and Martin, 1982). Dans le milieu naturel, il n'y a pas de

rythme d'expression de *per1* (Beale et al., 2013). Les indices non photiques, comme le départ quotidien des colonies de chauves-souris au crépuscule, ne seraient pas suffisants pour entrainer l'oscillateur. La perte du rythme circadien chez les poissons cavernicoles leur permettrait d'économiser de l'énergie (Moran et al., 2014).

Les poissons cavernicoles sont aussi moins agressifs (Burchards et al., 1985; Elipot et al., 2013) que les poissons de surface et ne forment pas de banc (Kowalko et al., 2013b). Ces comportements chez l'*Astyanax* seront mieux détaillés ci-dessous.

Caractères physiologiques :

Les poissons cavernicoles ont développé plusieurs traits de caractères particuliers leur permettant de survivre à un environnement pauvre en sources de nourriture. Le métabolisme des poissons cavernicoles, mesuré par la consommation de dioxygène, est réduit (Moran et al., 2014; Salin et al., 2010). **Figure III.C.5A**

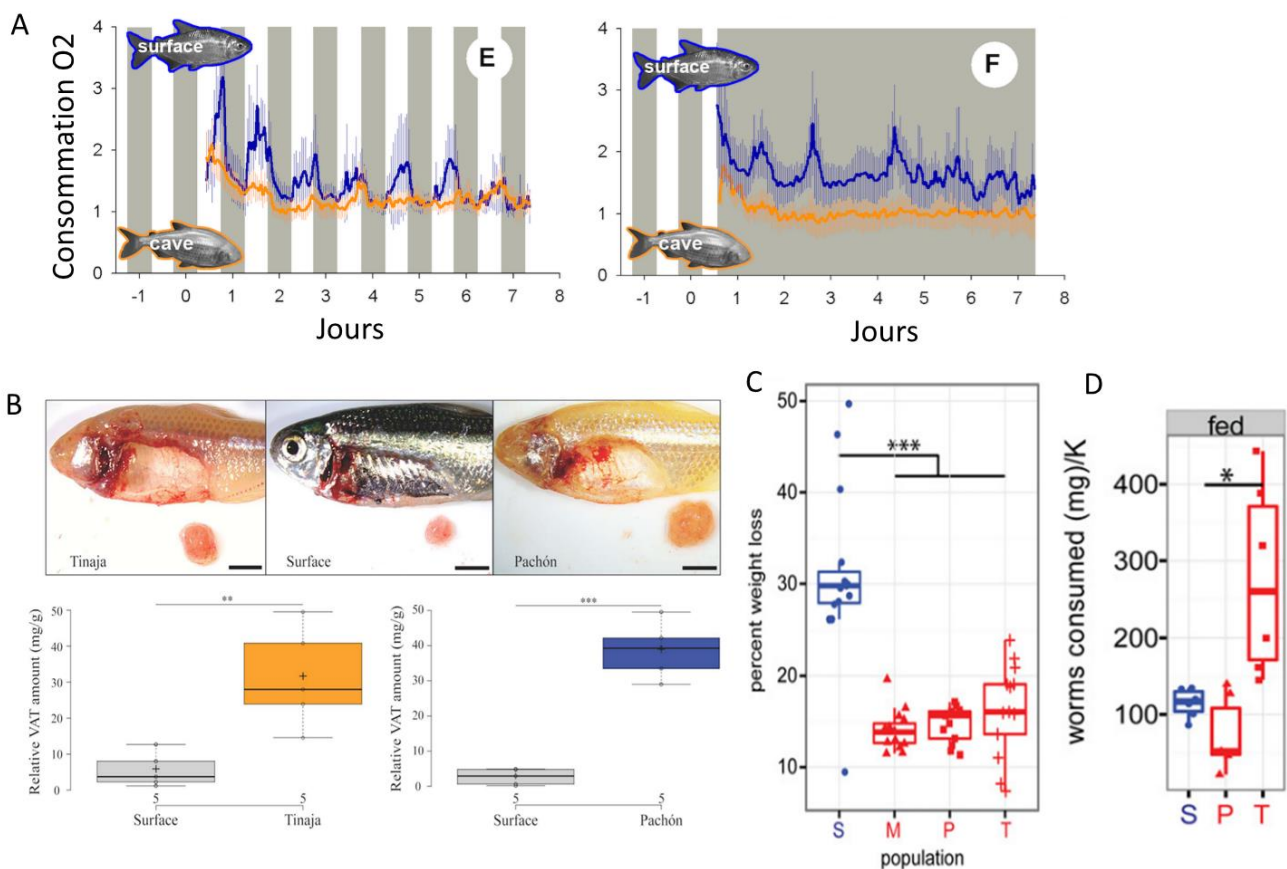


Figure III.C.5. Résistance au jeûne chez le poisson cavernicole.

(A) Comparaison du taux métabolique (consommation d'O₂) d'*A. mexicanus* sur 7 jours avec deux photopériodes : 12:12 jour:nuit et 24h nuit constante. Les aires grises montrent les conditions de nuit. Les moyennes et les intervalles de confiance (95%) sont montrés. (Moran et al., 2014)

(B) Gain de masse et développement du tissu adipeux viscéral (VAT) chez des *A. mexicanus* sous un régime contrôlé. Après 6 mois sous un régime contrôlé, les poissons sont disséqués, et le VAT est isolé. La quantité de VAT (masse de VAT par rapport à la masse du poisson (mg/g)) de 5 poissons est mesurée pour chaque population : poissons de Tinaja (orange), de Pachón (bleu) et les poissons de surface contrôles (gris). Echelle : 5 mm. (Xiong et al., 2018)

(C) Pourcentage de perte de masse après un jeûne de 2 mois. 11 à 13 poissons par population ont été utilisés. Chaque population cavernicole est significativement différente de la population de surface. (D) Appétit. Six poissons ont été utilisés pour chaque condition. La quantité de vers consommés a été mesurée pendant une période de 24h. S: surface fish, P: Pachón, T: Tinaja, M: Molino. (Aspiras et al., 2015)

Aspiras et al., (2015) ont montré que les poissons de la grotte Tinaja sont hyperphagiques, et ceci est dû à une mutation dans le gène *mc4r* (probablement fixée dans la population). Les poissons de la grotte de Pachón en revanche, ne présentent pas d'hyperphagie, même si la mutation de *mc4r* est présente dans la population (non fixée néanmoins). Les poissons de la grotte de Pachón auraient une absorption des nutriments plus efficace que les poissons de surface au stade larvaire, leur permettant de grandir plus rapidement (Riddle et al., 2018a). Les poissons cavernicoles des grottes Pachón et Tinaja ont aussi plus de réserves adipeuses (Aspiras et al., 2015; Xiong et al., 2018), et qui apparaissent plus tôt dans le développement chez les poissons de Pachón (Xiong et al., 2018). Les poissons cavernicoles de plusieurs grottes possèdent une mutation dans le gène du récepteur à l'insuline *insra*, causant une insulino-résistance, une hyperglycémie, et une augmentation de la masse des poissons (Riddle et al., 2018b). L'ensemble de ces modifications, partagées ou non entre les différentes populations cavernicoles, leur permet de mieux résister au jeûne que les poissons de surface (Aspiras et al., 2015; Salin et al., 2010). **Figure III.C.5**

Convergences :

Les poissons cavernicoles présentent donc des traits morphologiques, physiologiques et comportementaux particuliers, à cause de la pression de sélection exercée par l'environnement cavernicole. Ces traits sont très différents de ceux des poissons de surface, mais communs pour la plupart entre les populations d'*Astyanax* cavernicoles. Beaucoup sont aussi retrouvés chez d'autres espèces cavernicoles, parmi les poissons ou dans d'autres groupes. Par exemple, beaucoup d'espèces cavernicoles sont dépigmentées et ont des yeux réduits ou inexistant (Figure III.C.6). Chez les poissons, on peut citer le cas du poisson cavernicole chinois *Sinocyclocheilus anshuiensis* qui est aveugle, dépigmenté, a un sens du goût augmenté, des écailles réduites et un cycle circadien dégénéré (Yang et al., 2016a).

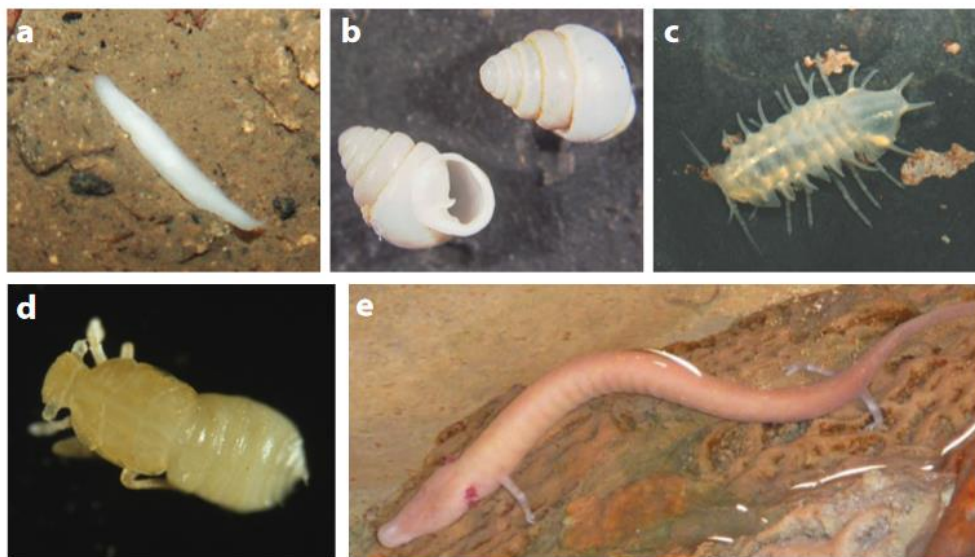


Figure III.C.6. Convergences chez les animaux cavernicoles.

Exemples de divers animaux cavernicoles qui présentent une perte des yeux et de la pigmentation. (a) Planaire cavernicole. (b) Mollusque gastéropode cavernicole, *Zospeum kusceri*. (c) Isopode cavernicole, *Monolistra bolei*. (d) Fulgore cavernicole, *Oliarus polyphemus*. (e) Amphibien urodèle cavernicole, *Proteus anguinus*. (Jeffery, 2009)

La convergence des traits dans les environnements cavernicoles concerne aussi les traits d'histoire de vie. L'environnement cavernicole est stable mais les ressources y sont limitées. On suppose que la capacité limite de l'environnement est atteinte, et les espèces tendraient petit à petit vers une stratégie K. Par exemple, l'*Astyanax* cavernicole, le poisson *Sinocyclocheilus anshuiensis*, et les poissons amblyopsidés cavernicoles ont une fécondité réduite par rapport à l'*Astyanax* de surface, aux espèces de *Sinocyclocheilus* et aux amblyopsidés

de surface respectivement (Culver and Pipan, 2009; Simon et al., 2019; Yang et al., 2016a). Les œufs de l'*Astyanax cavernicole* ont plus de réserve que ceux de l'*Astyanax* de surface (Huppopp and Wilkens, 1991).
 Figure III.C.7

La figure III.C.8 présente divers traits communs aux organismes cavernicoles.

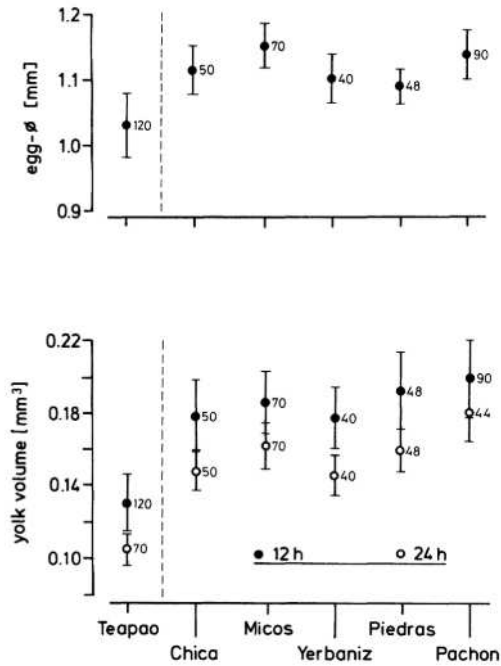


Figure III.C.7. Taille des œufs chez *A. mexicanus*.

Moyennes et déviations standard du diamètre des œufs et du volume du vitellus d'une forme de surface (Teapao) et de 5 formes cavernicoles d'*A. mexicanus*. Les nombres indiquent la taille de l'échantillonnage. (Huppopp and Wilkens, 1991)

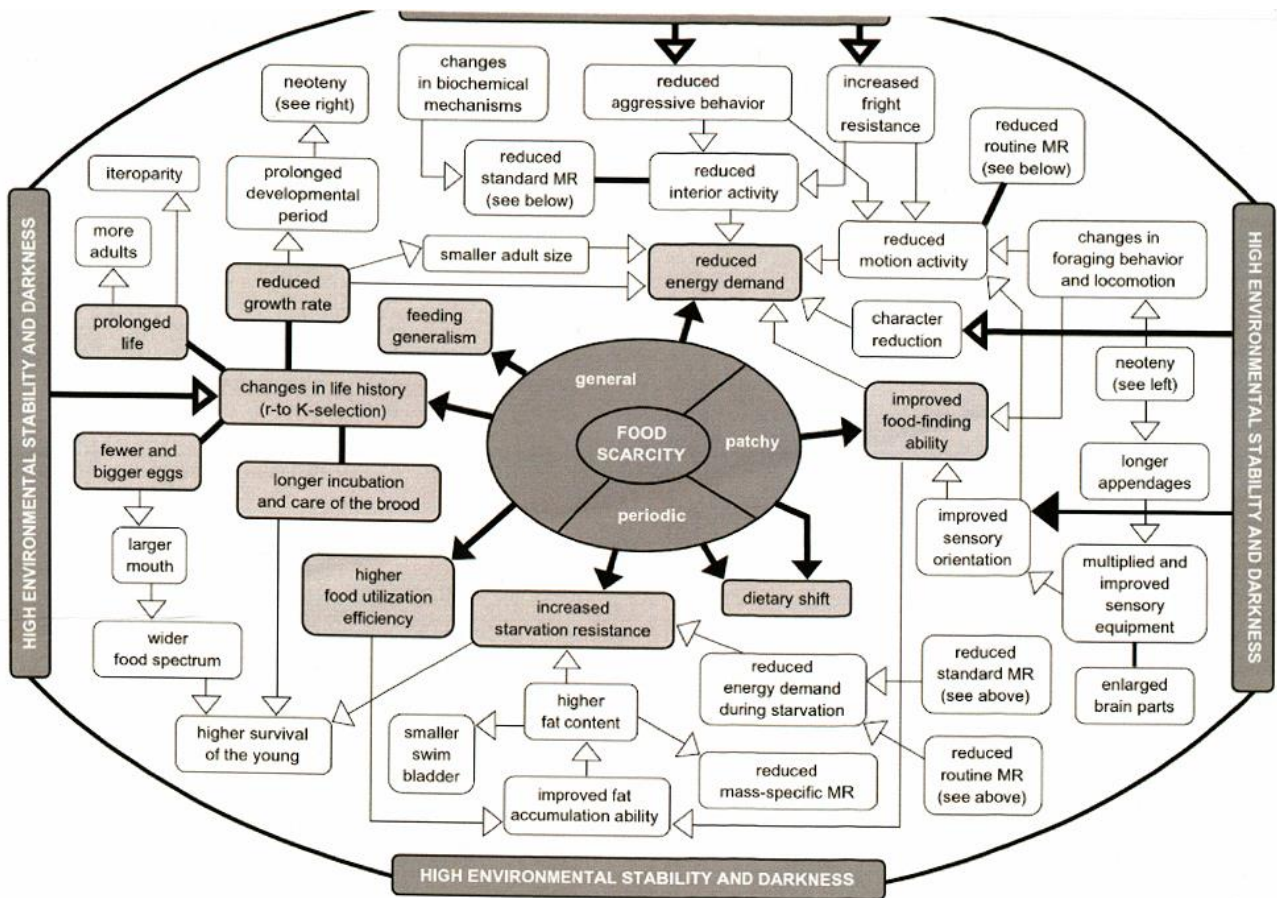


Figure III.C.8. Réseau de traits observés chez beaucoup d'animaux cavernicoles, leurs causes, conséquences et interrelations.

Gris foncé : facteurs de sélection. Gris clair : principaux traits influencés par la restriction de nourriture. Flèches pleines : requiert quelque chose. Flèches vides : permet quelque chose. (Hüppopp, 2000).

D. Les comportements chez *Astyanax* et leurs liens avec les monoamines

Agressivité

L'agressivité est définie comme un comportement dont l'intention est d'infliger un dommage physique sur un autre individu. Même si elle nécessite un coût énergétique et a un risque de dommages, elle peut être avantageuse, notamment pour l'accès aux ressources, la reproduction et la défense face à un prédateur. Dans certains cas, l'agressivité est pathologique.

Agressivité et monoamines

De nombreuses études réalisées chez les poissons (Clotfelter et al., 2007; Lynn et al., 2007; Perreault et al., 2003; Winberg et al., 2001), les reptiles (Deckel, 1996; Deckel and Fuqua, 1998; Larson and Summers, 2001), les oiseaux (Buchanan et al., 1994; Fachinelli et al., 1989; Sperry et al., 2003), les mammifères (Ferris et al., 1997; Lopez-Mendoza et al., 1998), et les humains (Reist et al., 2003) ont suggéré que la sérotonine est le premier régulateur inhibiteur de l'agressivité. Pour ne citer que quelques exemples, (Winberg et al., 2001) ont observé une réduction des comportements agressifs chez des truites supplémentées en tryptophane, un traitement augmentant les taux de sérotonine et l'activité sérotoninergique. Inversement, un traitement avec un inhibiteur de synthèse de la sérotonine (pCPA) induit une augmentation de l'agressivité chez des poulets (Buchanan et al., 1994) et des poissons (Adams et al., 1996). Enfin, des renards sélectionnés pour leur faible agressivité envers les humains ont des taux de sérotonine et de 5-HIAA plus élevés dans leur cerveau (Popova et al., 1991). Par ailleurs, lors des interactions sociales d'établissement de la dominance, les individus dominants sont les plus agressifs et ont, en général un ratio 5-HIAA/5-HT (5-HT turnover) plus faible que celui des subordonnés, suggérant une activité des neurones sérotoninergiques plus faible (Dahlbom et al., 2012; Loveland et al., 2014; Winberg and Nilsson, 1993) bien que cela dépende des régions du cerveau étudiées (Summers et al., 2005; Teles et al., 2013). L'ensemble de ces études suggère donc qu'une forte activité sérotoninergique et des taux élevés de sérotonine diminueraient l'agressivité chez de nombreuses espèces de vertébrés. L'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans les comportements agressifs a aussi été démontrée chez les mammifères (Bell et al., 1996; Lopez-Mendoza et al., 1998; Sánchez, 1997), les reptiles (Deckel and Fuqua, 1998), les oiseaux (Sperry et al., 2003), et les poisson (Clotfelter et al., 2007), et celle des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT₂ chez les mammifères (Nelson and Trainor, 2007; Olivier, 2004; Takahashi et al., 2011).

Cependant, certaines études ne montrent pas de rôle inhibiteur de la sérotonine sur l'agressivité. Si certaines études utilisant la fluoxétine (inhibiteur de recapture de la sérotonine) montrent, comme attendu, une réduction de l'agressivité (Kania et al., 2012; Lynn et al., 2007; Norton and Gutiérrez, 2019; Perreault et al., 2003; Theodoridi et al., 2017) (Figure III.D.1), d'autres études n'ont pas montré d'effet de ce même traitement sur l'agressivité (Clotfelter et al., 2007; Filby et al., 2010; Winberg and Thörnqvist, 2016), ou des effets sur l'agressivité qui dépendent de la lignée de poisson zèbre utilisée (Barbosa et al., 2019). De plus, (Barbosa et al., 2019) ont montré que le poisson zèbre au phénotype « leopard » est moins agressif que ceux au phénotype « longfin », bien que présentant de plus faibles taux de sérotonine dans le cerveau, ce qui est en contradiction avec le rôle inhibiteur de la sérotonine sur l'agressivité.

Par ailleurs, (Maximino et al., 2013a) ont montré que la souche leopard est aussi plus stressée. Or, l'agressivité et le stress sont souvent liés. En effet, l'exposition chronique ou aiguë à la substance d'alarme chez le poisson zèbre réduit l'agressivité (Quadros et al., 2018; Rehnberg and Smith, 1988), et il a été montré chez des hamsters que le stress modifie le développement des comportements agressifs (Delville et al., 2003). Il est aussi connu que la sérotonine joue un grand rôle dans la réponse au stress. Les interactions entre agressivité et stress, ainsi que le rôle de la sérotonine sur ces deux comportements rend difficile la compréhension du rôle exact de ce neurotransmetteur dans l'expression des comportements agonistiques.

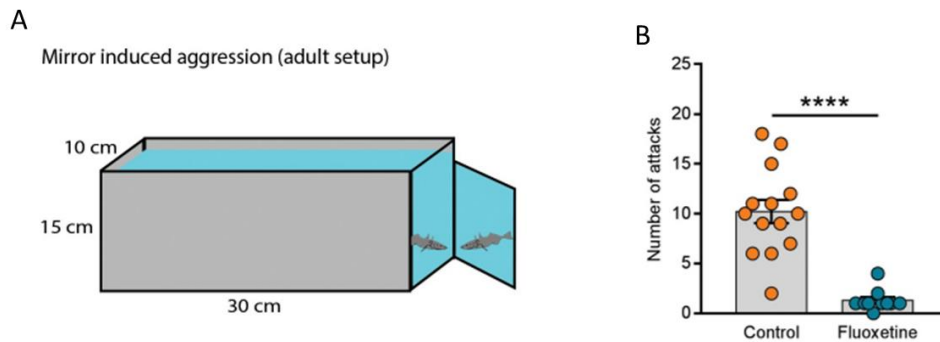


Figure III.D.1. Effet d'un traitement à la fluoxétine sur l'agressivité.

(A) Test d'agressivité induite par un miroir. (B) Nombre d'attaques sur le miroir chez les épinoches traitées ou non à la fluoxétine. (Norton and Gutiérrez, 2019)

Des études ont aussi démontré une implication de la dopamine dans les comportements agressifs. En effet, une forte activité dopaminergique est souvent associée à une plus grande agressivité et des statuts sociaux plus élevés (Filby et al., 2010; Winberg and Nilsson, 1993). Par exemple, un traitement à la L-DOPA augmente l'activité dopaminergique et la chance pour le poisson *Salvelinus alpinus* de devenir un dominant (Winberg and Nilsson, 1992). L'inhibition de DAT (le transporteur de la dopamine) augmente l'agressivité chez le poisson zèbre adulte (Paredes-Zúñiga et al., 2019) et la souris (Rodríguez et al., 2004). Inversement, (Höglund et al., 2005) ont montré chez le lézard *Anolis carolinensis* qu'un traitement à la L-DOPA augmente l'activité dopaminergique, mais réduit l'agressivité. Il est possible qu'une élévation trop importante de l'activité dopaminergique induise une réduction de l'agressivité.

D'autres facteurs influent sur les comportements agressifs, comme le GABA, le glutamate, la vasopressine, l'oxyde nitrique, le CRF (corticotropin-releasing factor)... Mais pour la plupart, leurs effets sur les comportements agressifs passent par le système sérotoninergique (Takahashi et al., 2011).

L'agressivité chez l'*Astyanax*

Le comportement agressif des *Astyanax* de surface a été décrit initialement par (Breder, 1943) et qualifié de « erratic viciousness ». L'agressivité des poissons de surface dépend de plusieurs facteurs, dont la taille des individus, la place disponible (Burchards et al., 1985), et l'état de nutrition des poissons (Elipot et al., 2013; Wilkens, 1988). Elle a tout d'abord été considérée comme dépendante de la vision, puisque que dans le noir, ou chez des poissons rendus aveugles, l'agressivité est fortement réduite (Burchards et al., 1985; Wilkens, 1988). Cependant, des études plus récentes ont montré que les poissons ayant subi une ablation des yeux ou mis dans le noir restent agressifs (Elipot et al., 2013; Espinasa et al., 2005). La vision n'est donc pas nécessaire à l'agressivité des poissons de surface, mais la facilite (Elipot et al., 2013).

Une agressivité très réduite est observée chez les poissons cavernicoles de la grotte Pachón, bien que quelques attaques soient toujours observées (Burchards et al., 1985; Elipot et al., 2013; Espinasa et al., 2005) (Figure III.D.2A). D'ailleurs, des blessures sur les nageoires ont été observées chez des poissons de 6-7 semaines en groupe (Parzefall and Hausberg, 2001). Concernant les autres populations cavernicoles, les données ne sont pas toutes cohérentes dans la littérature. Espinasa et al., (2005) ont montré que les poissons cavernicoles de la grotte Molino étaient presque autant agressifs que les poissons de surface, tandis que Elipot et al., (2013) ont montré la même agressivité entre les poissons cavernicoles de Molino et Pachón. Les attaques des poissons de surface et des poissons cavernicoles ne sont pas équivalentes. Elipot et al., (2013) ont montré que les poissons de surface attaquent vers la fin de la phase de test, alors que les poissons cavernicoles attaquent vers le début (Figure III.D.2B-D). Le jeûne augmente le nombre d'attaques des poissons cavernicoles, mais diminue celui des poissons de surface. Ceci suggère que les attaques des poissons de surface sont liées à l'établissement de la dominance tandis que les attaques des poissons cavernicoles sont liées à la recherche de nourriture.

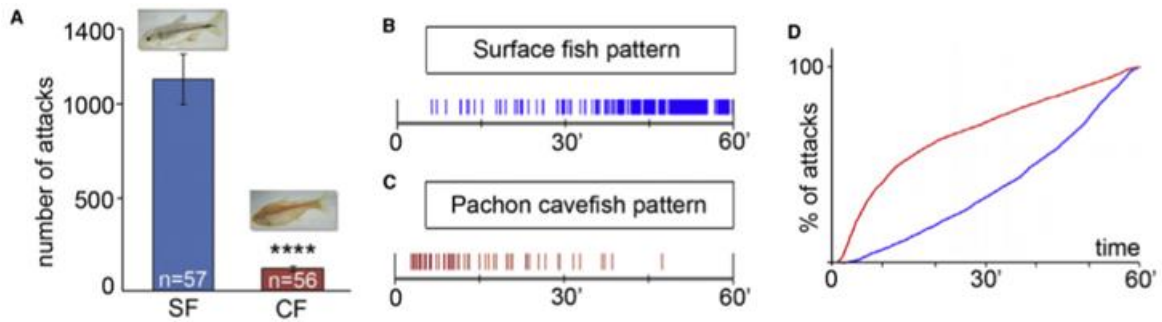


Figure III.D.2. Agressivité chez *Astyanax mexicanus*.

Caractérisation du comportement agressif chez le poisson de surface et sa perte chez le poisson cavernicole dans un test résident-intrus. (A) Nombre d'attaques comptées pendant une heure entre deux poissons de surface (SF, bleu) ou entre deux poissons cavernicoles (CF, rouge). (B et C) Graphiques typiques montrant la distribution des attaques en fonction du temps pendant le test d'une heure pour un poisson de surface (B, bleu) et un poisson cavernicole (C, rouge). (D) Attaques cumulées exprimées en pourcentage du nombre total d'attaques en fonction du temps pour les poissons de surface (bleu) et les poissons cavernicoles (rouge). (Elipot et al., 2013)

La perte d'agressivité chez les poissons cavernicoles de Pachón a des bases génétiques, puisque les poissons F2 issus de croisements entre les deux morphes ont une agressivité intermédiaire (Wilkens, 1988). Les hybrides Pachón x Molino ne sont pas agressifs (Elipot et al., 2013), ce qui suggère que les mêmes gènes sont impliqués dans la perte de l'agressivité chez les deux populations. Les bases génétiques de la perte de l'agressivité chez le poisson cavernicole ne sont pas encore connues.

Concernant les bases neurales de la perte d'agressivité, le système sérotoninergique semble être impliqué. En effet, un traitement des poissons de surface à la fluoxétine ou au deprenyl induisent une diminution de l'agressivité, tandis qu'un traitement des poissons cavernicoles à la fluoxétine augmente leur agressivité (Elipot et al., 2013). Les taux de sérotonine dans le raphé des poissons de surface dominants sont plus élevés que ceux des subordonnés. Or, les dominants sont plus agressifs que les subordonnés. Il a donc été proposé que les faibles taux de sérotonine dans le raphé des dominants était à l'origine de l'agressivité liée à la mise en place de la dominance (Elipot et al., 2013). Chez les poissons cavernicoles, le noyau paraventriculaire antérieur (PVa) de l'hypothalamus est plus large que chez les poissons de surface. Elipot et al., (2013) ont suggéré qu'il pouvait être responsable de l'agressivité liée à la recherche de nourriture chez les poissons cavernicoles. [Figure III.D.3](#)

Si la perte d'agressivité est commune à certains animaux cavernicoles (Culver et al., 1995; Parzefall, 1974), d'autres espèces cavernicoles, comme le poisson *Uegitglanis zammaranoi* Gianferrari (Ercolini et al., 1981) et la salamandre cavernicole aveugle (Parzefall, 1976) restent agressives. La perte de l'agressivité n'est donc pas une règle générale dans l'adaptation des animaux à l'environnement cavernicole.

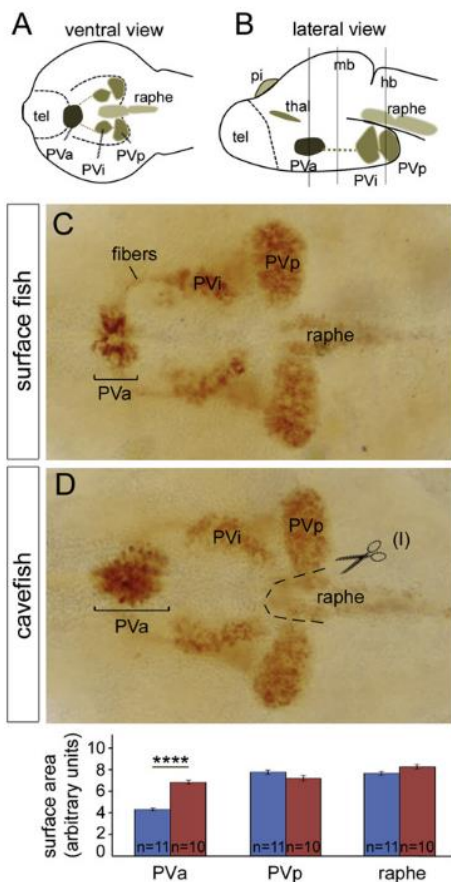


Figure III.D.3. Comparaison de l'anatomie du système sérotoninergique des poissons de surface et cavernicole.

(A et B) Schémas montrant la localisation des corps cellulaires 5-HT dans le cerveau d'*Astyanax mexicanus* en vue ventrale (A) ou latérale (B). hb, hindbrain; mb, midbrain; pi, pineal gland; PVa, anterior paraventricular nucleus; PVi, intermediate paraventricular nucleus; PVp, posterior paraventricular nucleus; tel, telencephalon; thal, thalamus. (C et D) Immunohistochimie 5-HT en vue ventrale de cerveaux disséqués de poissons de surface (C) ou cavernicole (D) de 1 jour. Les groupes de neurones 5-HT sont indiqués. (E) Mesure de la taille des groupes neuronaux chez les poissons de surface et cavernicoles. L'aire des régions marquées est mesurée. (Elipot et al., 2013)

Nage en banc

Avantages et désavantages de la nage en banc

Le regroupement d'individus d'une même espèce est très largement répandu chez les animaux, et a de nombreux avantages. Chez les poissons, les deux plus gros avantages de la nage en banc sont la réduction de la prédation et la facilitation de la recherche de nourriture (Day et al., 2001; Krause and Ruxton, 2002; Magurran and Pitcher, 1983; Miller and Gerlai, 2011; Pitcher et al., 1982). Les prédateurs seraient mieux repérés d'après la « many-eye hypothesis » (Pitcher and Parrish, 1993), de plus, ils seraient plus confus devant le banc, surtout si les poissons composant le banc sont homogènes phénotypiquement (Landeau and Terborgh, 1986). Enfin, par un effet de dilution, un poisson dans un banc a moins de chance de se faire cibler que tout seul (Krause and Ruxton, 2002). Les poissons au sein d'un banc passent moins de temps à être vigilants et plus de temps à chercher de la nourriture (Magurran and Pitcher, 1983), mais la compétition pour les ressources est aussi plus importante dans un banc. Des études ont montré que le taux de prédation et la quantité de nourriture disponible sont des facteurs faisant varier la taille des bancs. Une forte prédation rend les bancs plus compacts et plus gros, (Hoare et al., 2004; Keenleyside M.H.A., 1955; Krause and Ruxton, 2002), réduisant ainsi la prédation. Des poissons qui ont jeûné forment des bancs plus lâches et plus petits en présence de nourriture (Keenleyside M.H.A., 1955; Krause and Ruxton, 2002; Miller and Gerlai, 2007), réduisant ainsi la compétition. La nage en banc pourrait aussi faciliter la reproduction, l'apprentissage social (Brown and Laland, 2003), et aurait des avantages hydrodynamiques (Herskin and Steffensen, 1998; Pitcher and Parrish, 1993). Cependant, le regroupement social augmente l'exposition aux parasites (Krause and Ruxton, 2002), et a parfois un coût social lié à de la compétition interindividuelle (Herczeg et al., 2009).

Figure III.D.4

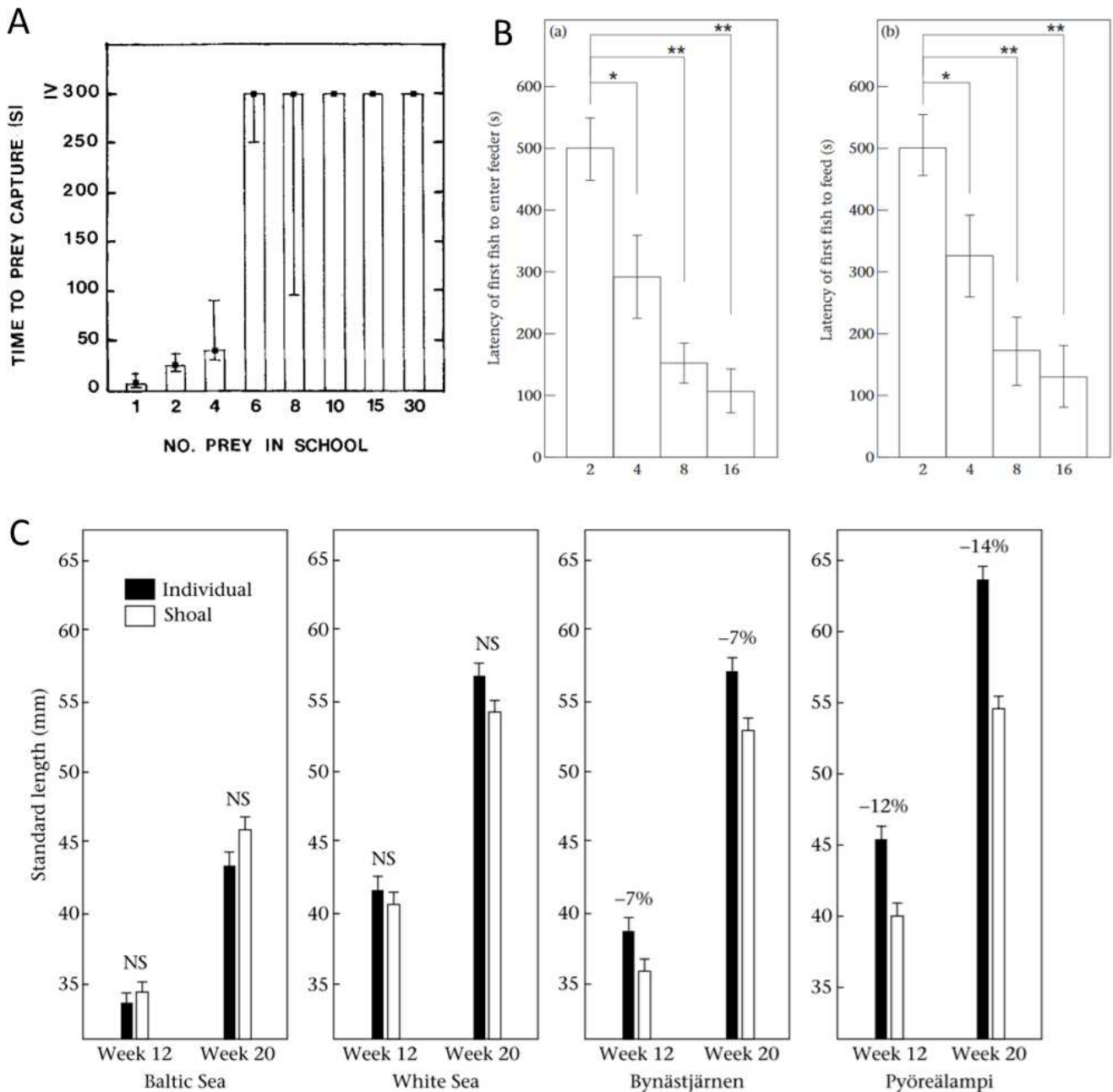


Figure III.D.4. Avantages and désavantages de la nage en banc.

(A) Temps mis pour capturer une proie en fonction du nombre de proies dans le banc. (Landeau and Terborgh, 1986)

(B) Moyenne, pour chaque taille de banc, des temps de latence avant (a) qu'un poisson entre dans la zone de nourriture, (b) qu'un poisson commence à se nourrir. (Day et al., 2001)

(C) Le coût de la nage en banc : Moyenne de la longueur d'épinoches (*Pungitius pungitius*) provenant de plusieurs populations, élevées seules ou en groupe. La longueur est mesurée à 12 et 20 semaines après le stade de nage libre (4 jours après l'éclosion). Le pourcentage de différences significatives entre les poissons élevés seuls et en groupe sont montrés au-dessus des barres. Les épinoches proviennent de deux populations marines (forte prédation) et de deux populations d'étang (faible prédation). (Herczeg et al., 2009)

Le regroupement des poissons en banc et la longueur des distances interindividuelles dépendent des espèces, de l'âge des poissons (van Olst and Hunter, 1970), de la présence de nourriture, et de prédateurs. La majorité des bancs se dispersent la nuit (Pavlov and Kasumyan, 2000). Le stress est l'un des moteurs de la nage en banc. En effet, l'exposition à la substance d'alarme augmente la cohésion d'un banc (Rehnberg and Smith, 1988; Speedie and Gerlai, 2008), et le regroupement des poissons diminue lors de leur habitude à l'environnement (Al-Imari and Gerlai, 2008; Delaney et al., 2002). Inversement, la présence de congénères a un effet

anxiolytique (Faustino et al., 2017). Le stress est donc un important facteur à prendre en compte dans les études de nage en banc. **Figure III.D.5**

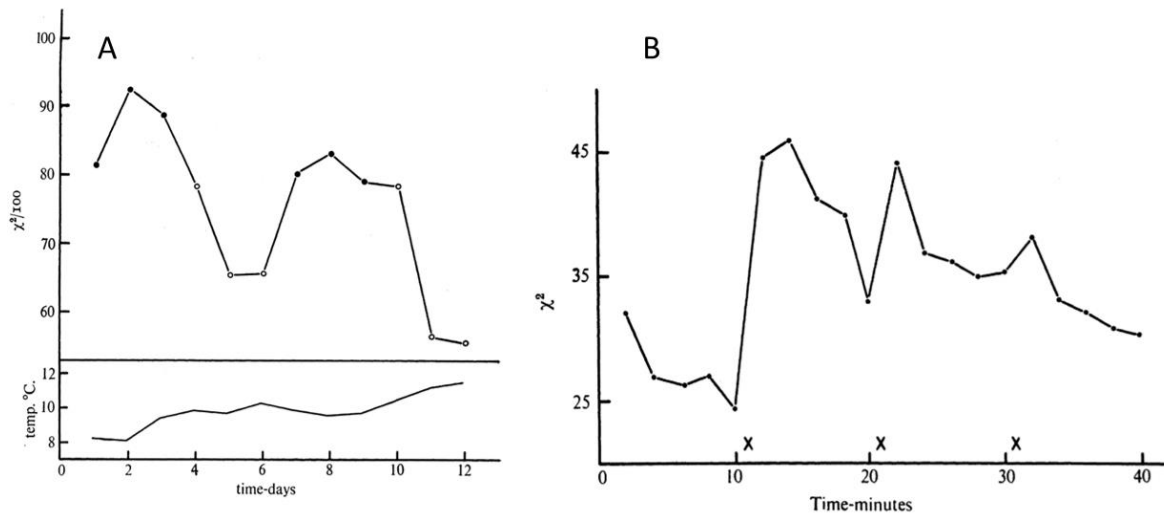


Figure III.D.5. Facteurs influençant la nage en banc.

(A) Changements de densité du banc d'épinoches en fonction de la motivation pour la nourriture. Cercles pleins : jours avec abondance de nourriture. Cercles vides : jours sans nourriture. La température pendant l'expérience est aussi montrée. (B) Changements de densité du banc d'épinoches lorsque les poissons sont alarmés toutes les 10min. X : moment où le poisson est alarmé. Fourchette de température : 11,0-11,3°C. (Keenleyside M.H.A., 1955)

La formation du banc est maintenue par la vision et la ligne latérale. (Partridge and Pitcher, 1980) ont suggéré que la vision était une force attractive, permettant aux poissons de se regrouper, et que la ligne latérale était une force répulsive, permettant aux poissons de garder une distance interindividuelle minimale. Cependant, l'inhibition de la ligne latérale chez *Astyanax* de surface ne modifie pas la nage en banc et le nombre de neuromastes n'est pas corrélé avec la capacité des poissons à former un banc (Kowalko et al., 2013b).

Nage en banc et monoamines

Les bases neurales de la nage en banc sont relativement peu connues, et peu d'études ont été menées sur ce sujet. Toutefois, la vue de congénères aurait valeur de récompense pour le poisson zèbre (Al-Imari and Gerlai, 2008), et étant donné l'implication de la dopamine dans le fonctionnement du circuit de la récompense, un rôle pour la dopamine dans le contrôle de la nage en banc a donc été proposé.

(Scerbina et al., 2012) ont montré qu'un traitement avec un antagoniste D1 (SCH23390) provoque d'une part une réduction de la préférence sociale, et d'autre part des modifications de taux de monoamines (réduction de DA, DOPAC et 5-HIAA). Inversement, une diminution de la nage en banc a été observée cette fois après un traitement avec un agoniste D1 (SKF 38393) (Echevarria et al., 2008). D'autres études utilisant des traitements (éthanol, tributyltin) ou l'isolation sociale montrent des modifications des systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques accompagnés par des effets sur la nage en banc, mais ce sont uniquement des corrélations (Buske and Gerlai, 2011; Shams et al., 2017; Zhang et al., 2016). Les données dans la littérature sont peu nombreuses et pas toutes cohérentes entre elles, mais confortent un rôle probable de la dopamine dans la nage en banc.

(Shams et al., 2017) ont démontré que des poissons zèbres isolés présentent une neurochimie dopaminergique modifiée, avec notamment des taux réduits de DOPAC. Lorsqu'ils sont remis en groupe, ils forment des bancs plus lâches. Cette étude renforce donc l'idée de l'implication de la dopamine dans la nage en banc. Cependant,

l'étude a aussi montré que les poissons isolés ont moins de signes d'anxiété. D'une part il est connu que l'isolement modifie l'axe HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal) chez les mammifères (Hawkey et al., 2012) et d'autre part, le stress module le regroupement des poissons (voir plus haut). La différence de regroupement observée entre les poissons isolés ou non dans l'étude de Shams et al., (2017) pourrait donc n'être liée qu'à la différence d'anxiété entre ces deux groupes de poissons.

Comme pour les comportements agressifs, les monoamines pourraient agir à la fois sur le comportement de nage en banc et la réponse au stress, rendant l'implication des monoamines dans les comportements sociaux plus difficile à cerner.

La nage en banc chez l'*Astyanax*

Les *Astyanax* de surface forment des bancs, à la fois en laboratoire et dans le milieu naturel. Pendant la saison sèche, cependant, lorsque des mares isolées se forment, le poisson de surface devient territorial. En laboratoire, la nage en banc est favorisée par de grands espaces et un grand nombre de poissons (Burchards et al., 1985). Dans le noir ou après ablation des yeux, les poissons de surface ne forment plus de banc (Wilkins, 1988), la vision est donc nécessaire à la nage en banc.

Contrairement aux poissons de surface, les *Astyanax* cavernicoles ne forment pas de banc. L'absence de nage en banc a été mesurée chez les populations des grottes Pachón, Tinaja et Molino (Kowalko et al., 2013b), mais cette caractéristique est retrouvée dans d'autres populations cavernicoles (observations visuelles personnelles). **Figure III.D.6I**

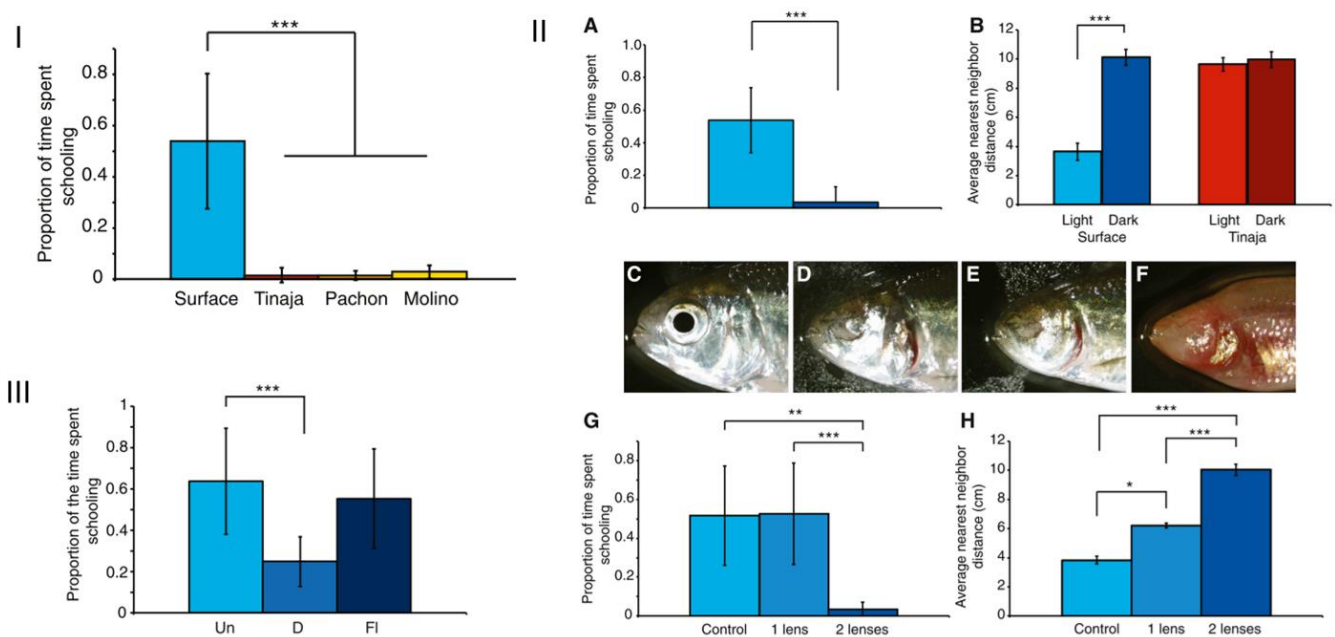


Figure III.D.6. La nage en banc chez *Astyanax mexicanus*.

(I) La tendance à la nage en banc est quantifiée par le pourcentage de temps passé à suivre un modèle de poisson. Les poissons testés sont des poissons de surface (n = 34), et des poissons cavernicoles de Tinaja (n = 19), Pachón (n = 10), et Molino (n = 10).

(II) La vision est nécessaire à la nage en banc. (A) Pourcentage de temps passé à nager en banc pour des poissons de surface à la lumière (n = 12) ou dans le noir (n = 10). (B) La distance avec le plus proche voisin est mesurée dans un groupe de six poissons (5 groupes pour chaque morphotype), à la lumière ou dans le noir. (C) Taille de l'œil chez les poissons de surface contrôles. (D) Dégénérescence partielle de l'œil chez le poisson de surface suivant une ablation du cristallin. (E) dégradation complète de l'œil chez le poisson de surface suivant une ablation du cristallin. (F) Dégénérescence de l'œil chez le poisson cavernicole. Pourcentages de temps passé à nager en banc (G) et distances avec le plus proche voisin (H) mesurés chez les poissons de surface ayant subi ou non l'ablation de l'un ou des deux cristallins.

(III) l'effet de l'augmentation des taux de monoamines dans le cerveau sur la nage en banc. (A) Pourcentages de temps passé à nager en banc chez des poissons de surface non traités (Un, n = 21), traités avec 10 mM de deprenyl (D, n = 12), et traités avec 14 mM de fluoxétine (FI, n = 21). (Kowalko et al., 2013b)

Les poissons F2 issus de croisements entre poissons de surface et cavernicoles ont des niveaux de nage en banc très variables (Kowalko et al., 2013b; Wilkens, 1988), et qui sont indépendants de la capacité visuelle. La perte de la nage en banc chez les poissons cavernicoles a donc des bases génétiques, est probablement d'origine multigénique et indépendante de la perte des yeux. La vision, bien que nécessaire à la nage en banc, n'est pas suffisante (Kowalko et al., 2013b). Puisque la vision est nécessaire à la nage en banc, la perte de la nage en banc dans l'environnement cavernicole est probablement neutre et pourrait être un effet pléiotropique d'une autre modification. **Figure III.D.6II**

Un traitement au deprenyl (inhibiteur de la MAO) réduit la nage en banc chez le poisson de surface, tandis qu'un traitement à la fluoxétine (inhibiteur de recapture de la sérotonine) n'a pas d'influence sur la nage en banc (Kowalko et al., 2013b) (**Figure III.D.6III**). Une monoamine autre que la sérotonine est donc probablement impliquée dans la perte de la nage en banc. La dopamine est une bonne candidate, d'autant plus que la YWHAE (tyrosinase 3-monooxygénase/tryptophan 5-monooxygénase activation protein epsilon polypeptide 1), une enzyme impliquée dans la synthèse de la dopamine, est surexprimée chez les poissons cavernicoles de Pachón (Strickler and Soares, 2011).

Locomotion

Locomotion et monoamines

L'implication des monoamines dans le contrôle de la locomotion chez les mammifères a été démontrée depuis un certain temps (Jankowska et al., 1967). Depuis, beaucoup d'études ont conforté l'implication de la sérotonine, de la dopamine et de la noradrénaline dans le contrôle et le développement des circuits locomoteurs (Jordan et al., 2008; Pearlstein, 2013; Sharples et al., 2014). Entre autres, un traitement avec un inhibiteur de recapture de la sérotonine (citalopram) diminue la locomotion chez la souris au stade néonatal (Dunbar et al., 2010). L'application de noradrénaline (NA) sur la moelle épinière de rat isolée active la locomotion fictive (Kiehn et al., 1999). De plus, des déficits de la MAO entraînent des modifications de locomotion. Il a été montré qu'un traitement au deprenyl (inhibiteur de la MAO-B) augmente l'activité locomotrice chez des rongeurs adultes (Themann et al., 2002), de même, une déficience de la MAO-A retarde la maturation du circuit locomoteur (Cazalets et al., 2000).

Le développement de la locomotion chez le poisson zèbre se fait en plusieurs étapes. Les embryons présentent tout d'abord des contractions spontanées, puis des mouvements provoqués par le toucher, et enfin de la nage en longs « burst » induits. Ces trois étapes surviennent entre le premier jour et le 4^{ème} jour de développement. Au-delà, la nage des alevins se transforme en burst plus courts, plus fréquents et spontanés, et en une nage par « glissement/dérive » (Airhart et al., 2007; Brustein et al., 2003a; Drapeau et al., 2002). **Figure III.D.7**

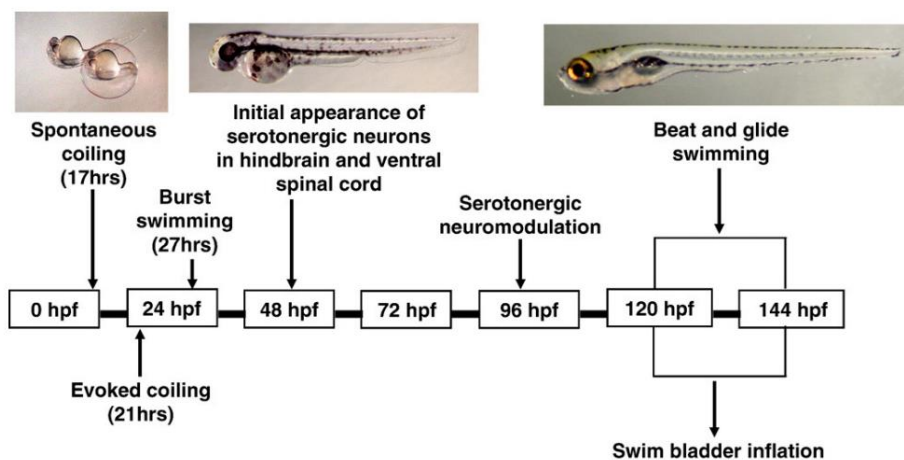


Figure III.D.7. Le développement de la locomotion chez le poisson zèbre.

Les stades de développement de la locomotion chez le poisson zèbre et l'innervation sérotoninergique sont représentés sur une frise chronologique. A 96 hpf (4 dpf), les deux sources d'axones sérotoninergiques ont innervé complètement la moelle épinière (neuromodulation sérotoninergique). (Airhart et al., 2007)

De même que chez les mammifères, le système sérotoninergique est impliqué dans le contrôle de la locomotion chez le poisson zèbre. Avant le quatrième jour de développement, des modifications du système sérotoninergique (traitement à la sérotonine, agonistes sérotoninergiques, inhibiteurs de recapture ou de synthèse de la sérotonine) n'entraînent pas de modification de la locomotion. Ces mêmes traitements à partir du quatrième jour de développement induisent des modifications de locomotion (Airhart et al., 2007; Airhart et al., 2012; Brustein and Drapeau, 2005; Brustein et al., 2003a; Brustein et al., 2003b; Drapeau et al., 2002; Sallinen et al., 2009) (Figure III.D.8). Une immunoréactivité à la 5-HT peut être détectée dès le premier jour de développement, mais l'innervation de la moelle épinière par le système sérotoninergique n'est complète qu'à 4 dpf (days post fertilization) (Airhart et al., 2007). Le développement de l'innervation sérotoninergique de la moelle épinière est donc concomitant à la fois au changement de mode de nage, et à l'apparition des effets sur la locomotion induits par des modifications sérotoninergiques artificielles (traitements pharmacologiques). Le système sérotoninergique pourrait donc être impliqué dans la maturation des circuits locomoteurs et la modification du mode de nage à 4 dpf.

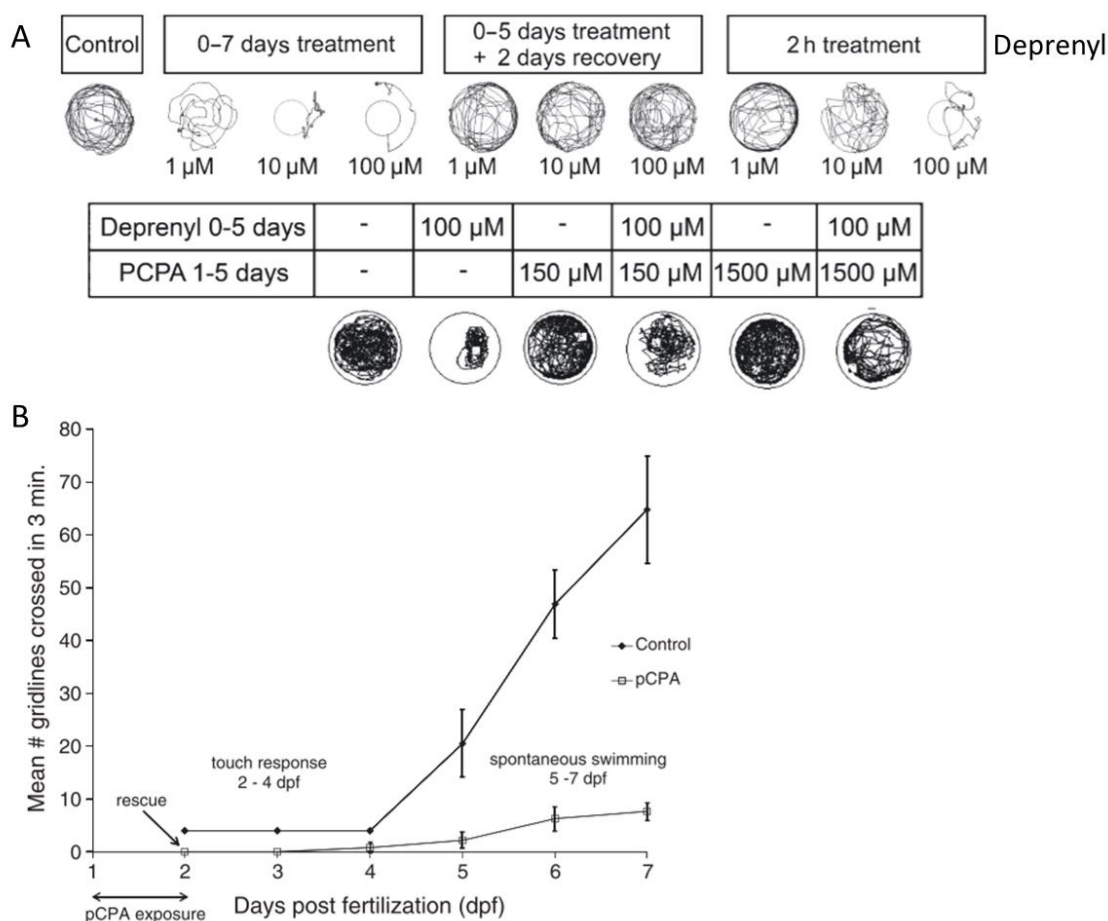


Figure III.D.8. Effets de traitements pharmacologiques sur la locomotion du poisson zèbre.

(A) Trajectoires des poissons contrôles, traités au deprenyl ou au pCPA. Les mesures ont été effectuées à 7dpf. (Sallinen et al., 2009)

(B) Activité locomotrice d'embryons de poisson zèbre traités au pCPA. Des embryons de 1dpf ont été exposés au pCPA (25 μm) pendant 24h. Les activités locomotrices des animaux traités et contrôles sont significativement différentes pour chaque jour. (Airhart et al., 2012)

Chez de nombreux poissons adultes, les traitements avec un inhibiteur de recapture de la sérotonine (citalopram, fluoxétine) ou directement à la sérotonine montrent un effet inhibiteur de la sérotonine sur la locomotion (Fingerman, 1976; Gabriel et al., 2009; Perreault et al., 2003; Winberg et al., 1993). D'autres études cependant ne montrent aucun effet de la sérotonine sur la locomotion (Winberg and Thörnqvist, 2016), voire un effet activateur (Clements et al., 2003). De plus, les souches de poisson zèbre leopard et longfin présentent

la même locomotion, bien que leurs taux de sérotonine dans le cerveau diffèrent (Barbosa et al., 2019). L'implication de la sérotonine dans le contrôle de la locomotion semble donc complexe, et dépend à la fois du stade de développement (adulte, larve) et du modèle étudié. L'effet de la sérotonine dans le contrôle de la locomotion est aussi probablement modulé par d'autres facteurs.

La dopamine joue aussi un rôle dans la fonction motrice chez de nombreux animaux (Sharples et al., 2014). Chez les poissons, la dopamine a, comme la sérotonine, des effets différents sur la locomotion en fonction du stade de développement étudié. Chez les larves de poisson zèbre de moins de 5 dpf, un traitement à la dopamine ou avec des inhibiteurs de recapture de la dopamine induisent une diminution de la locomotion (Paredes-Zúñiga et al., 2019; Thirumalai and Cline, 2008), tandis que l'inhibition des neurones dopaminergiques provoquent une hyperactivité (Tanaka et al., 2018b). A des stades très précoces du développement, la dopamine a donc un effet inhibiteur sur la locomotion. A 5 jours de développement, cet effet devient moins important (Thirumalai and Cline, 2008). Sur des larves de 6 jours et sur des adultes, un traitement aux antagonistes D1 et D2 (Irons et al., 2013; Tran et al., 2015) ou la perte de neurones dopaminergiques chez les adultes (Bretaud et al., 2004) entraînent une diminution de l'activité locomotrice. La dopamine a donc un effet activateur sur la locomotion à partir de 6 jours de développement.

La seule source de dopamine dans la moelle épinière provient des neurones diencephalospinaux (DDNs). L'ablation de ces neurones réduit la locomotion chez les larves (Godoy et al., 2015; Jay et al., 2015), montrant leur implication dans le contrôle locomoteur. Ils agissent sur les circuits locomoteurs de la moelle épinière via les récepteurs spinaux D1 et D4 (Lambert et al., 2012). Mais ces neurones interviennent aussi dans la maturation du circuit locomoteur. Ces neurones se développent à partir de 3 dpf et permettraient le changement de mode de nage aux environs de 4 dpf (Lambert et al., 2012).

La sérotonine et la dopamine agissent donc de concert dans la maturation et le contrôle des circuits locomoteurs.

La locomotion chez l'*Astyanax*

Les *Astyanax* cavernicoles ont une locomotion permanente et plus élevée que celle des poissons de surface (Beale et al., 2013; Carlson and Gross, 2018; Erckens and Martin, 1982; Yoshizawa et al., 2015). Les études de Duboué et al., (2011) et Yoshizawa et al., (2015) ont suggéré que cette plus grande activité était surtout due à une réduction du temps de sommeil chez les poissons cavernicoles.

L'activité des poissons de surface semble être plus importante pendant la journée (Beale et al., 2013; Yoshizawa et al., 2015). L'activité des poissons cavernicoles est aussi plus importante le jour, lorsque les poissons sont entraînés avec un rythme jour-nuit (Beale et al., 2013; Carlson and Gross, 2018; Yoshizawa et al., 2015). **Figure III.D.9A**

Enfin, les niveaux de locomotion sont variables d'une population cavernicole à une autre. En effet, Yoshizawa et al., (2015) ont montré que l'activité locomotrice des poissons cavernicoles de Tinaja n'était pas significativement différente de celle des poissons de surface.

Yoshizawa et al., (2015) ont procédé à une analyse QTL pour déterminer les gènes impliqués dans la locomotion accrue des poissons cavernicoles de la population Pachón. L'un des gènes candidats trouvés est le récepteur à la dopamine D4b, justement impliqué dans la locomotion chez le poisson (Lambert, 2016; Lambert et al., 2012). Le traitement avec un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2, D3 et D4 (haloperidol) réduit significativement l'activité locomotrice chez les poissons cavernicoles de Pachón (Yoshizawa et al., 2015).

Lorsque les poissons cavernicoles sont placés dans un nouvel environnement, ils passent plus de temps en périphérie de l'aquarium et ont une activité locomotrice plus élevée que 24h plus tard (Teyke, 1985; Teyke, 1989) (**Figure III.D.9B**). Cette phase transitoire aux comportements particuliers a été proposée comme étant une phase d'exploration de l'environnement. D'autres résultats confortent cette hypothèse de l'exploration. Par exemple le fait que des poissons de surface placés dans le noir, ou ayant subi une ablation des yeux durant l'embryogenèse présentent une nage similaire à celle des poissons cavernicoles, le long des parois de l'aquarium (Espinasa et al., 2005; Sharma et al., 2009). Ou encore le fait que les poissons cavernicoles construisent une carte mentale spatiale de leur environnement pendant cette phase d'exploration (Teyke, 1989). En effet, une anesthésie au froid juste après cette phase d'exploration la réenclenche, ce qui montrerait

que l'anesthésie a empêché la consolidation des souvenirs spatiaux. La phase transitoire est aussi plus longue dans un environnement complexe, et plus courte lorsque le poisson est remis dans un environnement familier 2 jours après en avoir été retiré (Teyke, 1989). Il a aussi été démontré que les poissons cavernicoles sont capables de détecter des changements spatiaux dans leur environnement (Burt De Perera, 2004), s'orienter et reconnaître un lieu donné (Sovrano et al., 2018).

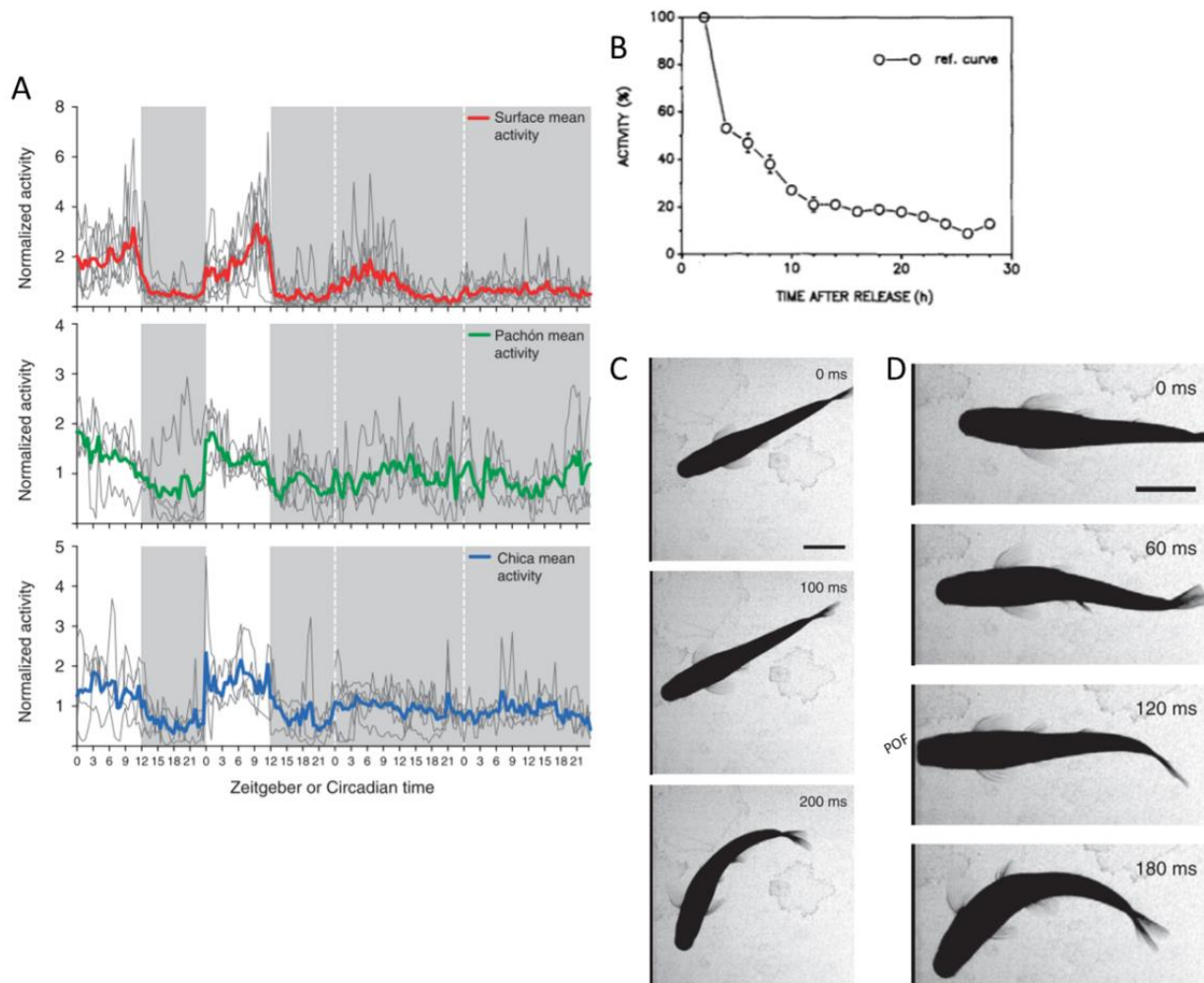


Figure III.D.9. La locomotion chez *Astyanax mexicanus*.

(A) Des poissons adultes sont placés individuellement dans des bacs et entraînés à un cycle jour-nuit pendant 7 jours, puis maintenus en noir constant pendant 2 jours. Le temps (en s) passé à nager avec une vitesse de plus de 5 cm/s est mesuré. Les données montrées correspondent à la moyenne de tous les poissons (traces de couleur) et à tous les poissons individuels (traces grises). Les trois populations présentent un rythme circadien de nage en condition jour-nuit. En noir constant, les poissons de surface gardent un rythme, mais pas les poissons cavernicoles. (Beale et al., 2013)

(B) Activité moyenne de 12 poissons cavernicoles après avoir été placés dans un bac. (Teyke, 1989)

(C) Séries d'images montrant un poisson cavernicole approchant un mur et évitant la collision. Le poisson glisse vers le mur, puis à 100 ms étend ses nageoires pectorales. La tête du poisson est à 2,7 mm du mur. Le poisson tourne son corps vers la gauche, sans faire aucun contact avec le mur. (Windsor et al., 2008)

(D) Séries d'images montrant un poisson cavernicole entrant en collision avec le mur. Le poisson commence un battement de queue alors qu'il approche du mur et ne montre aucun signe de détection du mur avant de le toucher. Après la collision, le poisson se tourne vers la gauche et nage le long du mur. Echelle : 1cm. (Windsor et al., 2008)

Lorsque le poisson nage, un champ de flux d'eau est créé autour de lui. Les obstacles de l'environnement provoquent des modifications de ce flux, qui sont perçues par le poisson à l'aide de sa ligne latérale. La ligne latérale est un système sensoriel retrouvé chez toutes les espèces de poissons et est constituée de mécanorécepteurs appelés les neuromastes. Les poissons cavernicoles possèdent des neuromastes plus

nombreux et plus gros que les poissons de surface (Schemmel, 1967; Teyke, 1990), les poissons cavernicoles sont donc probablement plus sensibles aux obstacles (Yoshizawa et al., 2014). Lorsque les neuromastes sont inactivés par du cobalt, les poissons cavernicoles entrent en collision avec les obstacles beaucoup plus fréquemment (Windsor et al., 2008).

Des calculs théoriques ont montré une relation linéaire entre la vitesse de nage du poisson et l'intensité du stimulus perçue par la ligne latérale (Hassan, 1985). Il a donc été proposé que la vitesse augmentée du poissons cavernicole dans un nouvel environnement augmente sa perception des obstacles de l'environnement (Teyke, 1985; Teyke, 1989). Cependant, une étude plus récente a montré que lorsque les poissons cavernicoles nagent vite, la détection des obstacles ne se fait pas plus tôt pour autant (Windsor et al., 2008), ce qui ne supporte pas l'hypothèse selon laquelle une grande vitesse permet de mieux sentir les obstacles. De plus, les collisions sont associées à une plus grande vitesse de nage et des battements de queue lorsque le poisson arrive près de l'obstacle. A l'inverse, les évitements d'obstacles sont associés à une plus faible vitesse et une nage en glissement (Windsor et al., 2008) (Figure III.D.9C et 9D). La vitesse de nage augmentée chez les poissons cavernicoles dans un nouvel environnement reste inexpliquée.

Stress

Quelques définitions

Le **stress** est l'ensemble des cascades physiologiques d'évènements qui surviennent lorsque l'organisme tente de résister à la mort ou de rétablir son homéostasie (Schreck, 2000). Le principal problème pour définir le stress est qu'il faut distinguer une réponse physiologique normale à un changement de l'environnement, par exemple le ralentissement des fonctions métaboliques la nuit pour les espèces diurnes, et une réponse à un stimulus stressant. La notion d'« allostatic overload » a donc été introduite pour décrire un seuil où la demande excède la capacité de régulation normale d'un organisme, et où l'animal commence à souffrir de l'activation de ses mécanismes de réponse au stress (McEwen and Wingfield, 2010). Par exemple quand le système immunitaire commence à être impacté. Mais la frontière reste mince entre une réponse à un stimulus doux mais challengeant, et à un stimulus stressant.

Les stimuli stressants diffèrent par leur source, qui peut être interne, comme le stress oxydatif, ou externe. Les stimuli stressants externes peuvent être biotiques (prédateurs, parasites, pathogènes, congénères...), abiotiques (température, et pour les animaux aquatiques, salinité, turbidité, pollution et niveau de l'eau...), ou provoquées par un chercheur (manipulations, nouvel environnement, confinement...)

Les réponses d'un organisme à un stimulus stressant peuvent être comportementales (fuite, diminution de la prise alimentaire, augmentation de l'attention...) ou physiologiques (augmentation du métabolisme, des rythmes cardiaque et respiratoire...).

La **peur** est l'une des composantes de la réponse à un stress aigu qui menace l'intégrité de l'organisme.

Lorsque la réponse au stress est chronique, disproportionnée en intensité ou non associée à un risque réel, on parle d'**anxiété**.

Induire un stress chez le poisson

Plusieurs protocoles sont utilisés en laboratoire pour provoquer un stress aux poissons : le visuel de prédateurs (Barcellos et al., 2007; Gerlai et al., 2009), l'isolation sociale ou la diade, provoquant des luttes pour la dominance (Øverli et al., 1999; Tea et al., 2019), un confinement dans un petit espace (Backström et al., 2011a; Gallo and Jeffery, 2012; Kiilerich et al., 2018; Schjolden et al., 2006; Vijayan et al., 1997) ou un espace bondé (Ramsay et al., 2006), un nouvel environnement (Bencan et al., 2009; Blaser et al., 2010; Cachat et al., 2010; Egan et al., 2009; Kysil et al., 2017; Levin et al., 2007), la manipulation avec les mains ou la chasse (Gesto et al., 2008), l'injection dans l'eau de la substance d'alarme (Egan et al., 2009; Speedie and Gerlai, 2008) ou d'anxiogènes comme la caféine (Cachat et al., 2010; Egan et al., 2009). Figure III.D.10

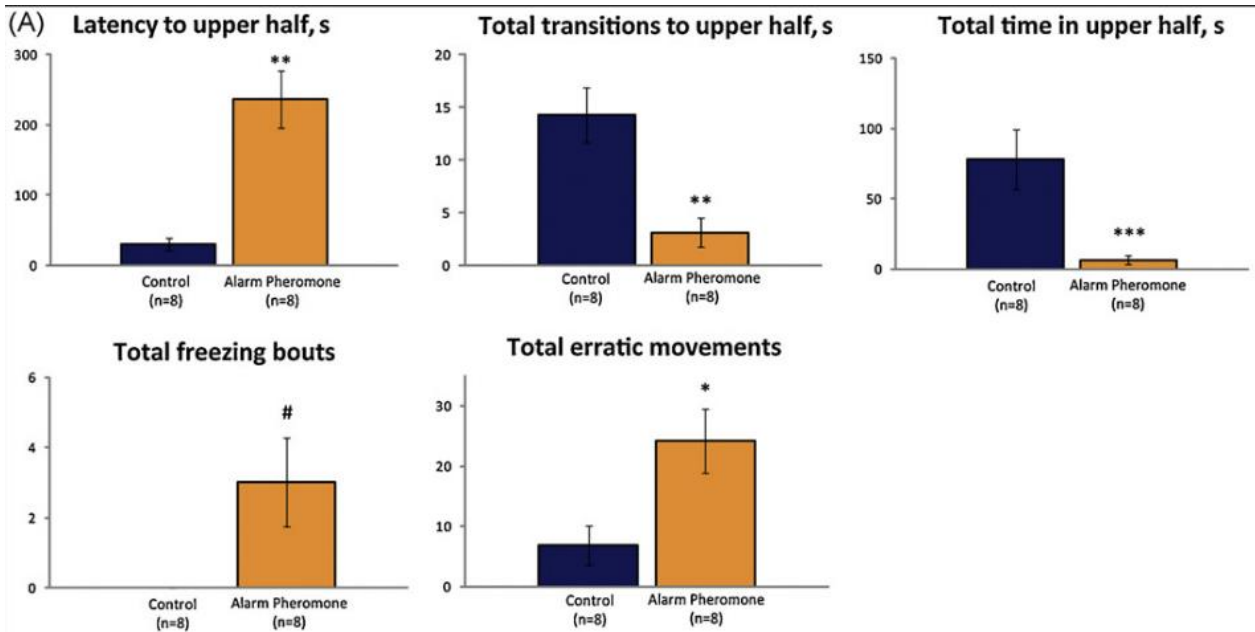


Figure III.D.10. Effets anxiogènes de la phéromone d'alarme.

Des poissons zèbres adultes sont placés individuellement dans un nouveau bac et exposés ou non à de la phéromone d'alarme (7mL, 6 min). Le temps de latence pour entrer dans la partie supérieure du bac, le nombre d'entrées et le temps total passé dans la partie supérieure du bac, le « freezing » et les mouvements erratiques sont mesurés. (Egan et al., 2009)

Mesurer le stress : les comportements de stress chez le poisson

Plusieurs comportements sont mesurables pour évaluer le degré de stress de poissons :

Le « freezing » : le poisson est immobile, généralement au fond de l'aquarium et dans un coin. Seules les opercules et éventuellement les yeux bougent (Maximino et al., 2010). **Figure III.D.10** et **Figure III.D.11a** et **b**

Les mouvements erratiques : le poisson nage très rapidement en zig-zag, sans destination apparente, et en changeant très fréquemment de direction. Il est décrit comme un comportement de fuite (Maximino et al., 2010). **Figure III.D.10**

Le thigmotactisme, aussi appelé « wall-following », « thrashing » ou « escape » : le poisson nage en va et vient puissant et frénétique contre les parois de l'aquarium (Maximino et al., 2010). C'est un comportement centrophobique et de fuite.

La nage au fond de l'aquarium (bottom dwelling) a aussi été décrite comme un comportement de stress (Cachat et al., 2010; Chin et al., 2018; Egan et al., 2009; Levin et al., 2007).

Ces comportements sont amplifiés ou diminués par des traitements anxiogènes (ex caféine, substance d'alarme) ou anxiolytiques (ex diazepam) respectivement (Egan et al., 2009; Schnörr et al., 2012; Treit and Fundytus, 1988; Wong et al., 2010). **Figure III.D.10** et **Figure III.D.11c**

Le « freezing », les mouvements erratiques et le thigmotactisme sont aussi des comportements exprimés chez les mammifères et utilisés pour mesurer le stress (Kallai et al., 2005; Kallai et al., 2007; Simon et al., 1994; Treit and Fundytus, 1988).

La préférence lumière/obscurité : Dans un aquarium composé d'un compartiment sombre et un compartiment à la lumière, certains poissons passent plus de temps dans le compartiment sombre, d'autres dans le compartiment éclairé. Les données dans la littérature concernant la préférence des poissons zèbres ne sont pas toujours cohérentes entre elles, et elle dépendrait de beaucoup de facteurs, comme les conditions d'élevage, ou le stade de développement (Blaser and Peñalosa, 2011). Cependant, une fois la préférence des poissons

utilisés connue, ce test peut être utilisé pour mesurer l'anxiété. En effet, (Blaser et al., 2010) ont montré que les poissons qui évitent fortement la lumière font plus de « freezing » dans un environnement lumineux que les individus n'ayant pas cette répulsion pour la lumière, montrant bien que l'évitement de la lumière est motivé par le stress provoqué à la lumière. Le temps passé dans l'un ou l'autre des compartiments et le temps mis pour entrer dans le compartiment non préféré permettent une mesure de l'anxiété. Figure III.D.11e et g

Il est aussi courant de mesurer le degré du caractère audacieux des poissons. Par exemple avec le temps passé en surface, le temps passé dans le compartiment lumineux, le nombre de fois où le poisson s'échappe du banc, ou le temps de latence pour s'approcher d'un objet inconnu. Figure III.D.11f

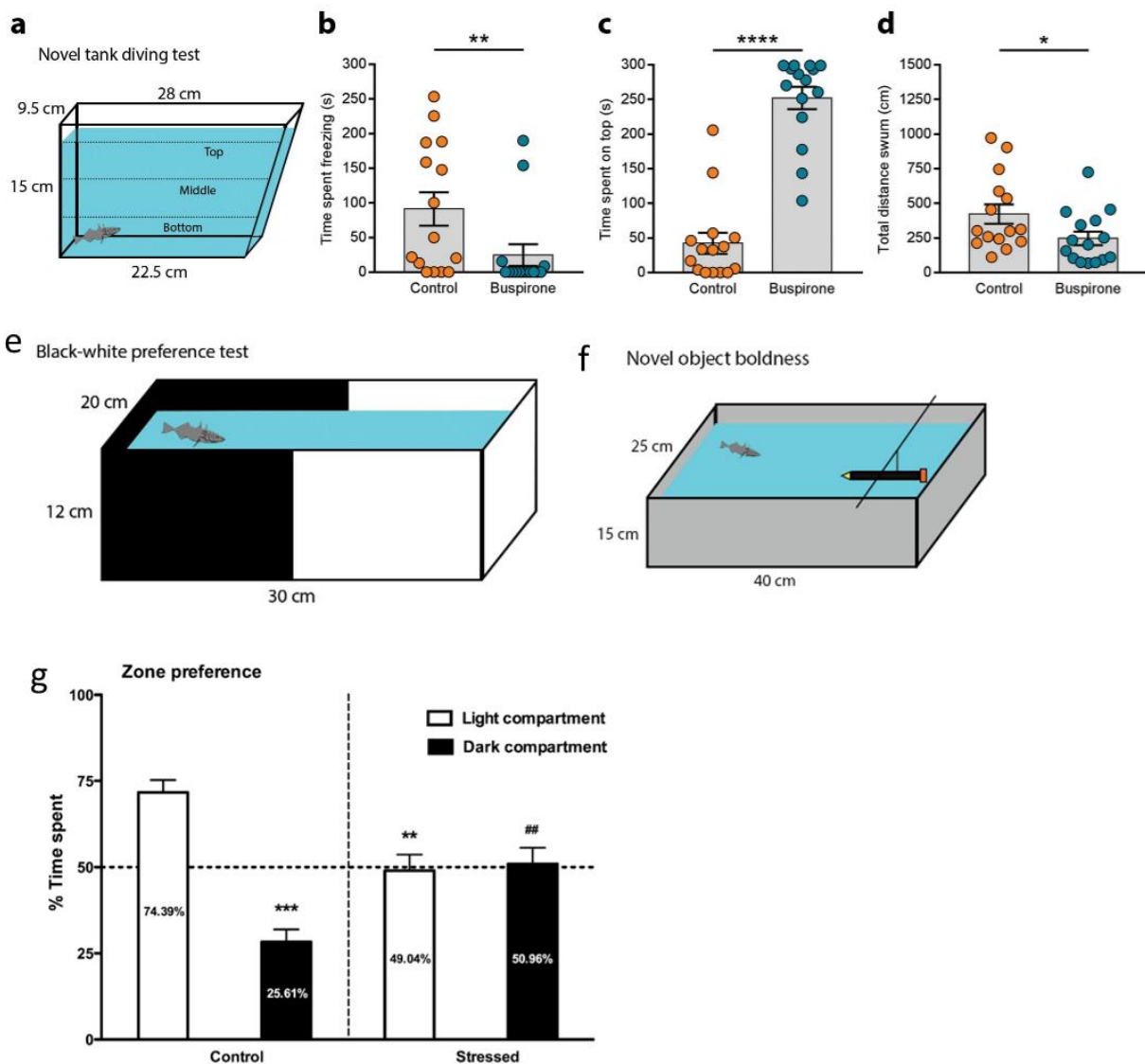


Figure III.D.11. Différentes méthodes pour mesurer le stress chez le poisson.

(a) Test du nouvel aquarium. (b) Temps passé immobile, (c) temps passé dans la partie supérieure du bac, et (d) la distance totale parcourue par des poissons contrôles ou traités à la buspirone. (e) Test de préférence noir/blanc. (f) Test de témérité face à un nouvel objet. (Norton and Gutiérrez, 2019)

(g) Dans des conditions standard (faible stress), les poissons zèbres passent significativement plus de temps dans la zone lumineuse, mais explorent aussi dans une moindre mesure le compartiment noir. L'exposition à un stress aigu induit une perte de préférence pour le compartiment lumineux. (Champagne et al., 2010)

Le stress chez l'*Astyanax*

Les *Astyanax* de surface ont les mêmes comportements de stress que les poissons zèbres. Transférés dans un nouvel environnement, ils font du thigmotactisme, du « freezing », et passent plus de temps dans le fond de l'aquarium (Chin et al., 2018; Sharma et al., 2009). Les poissons cavernicoles des grottes de Pachón, Tinaja et Molino, en revanche, ne font pas de « freezing » et passent plus de temps dans la partie haute de l'aquarium que les poissons de surface lorsqu'ils sont placés dans un nouvel environnement (Chin et al., 2018). Il y aurait donc une convergence vers la réduction des comportements de stress chez les poissons cavernicoles. **Figure III.D.12**

Pourtant, les poissons cavernicoles présentent un très fort thigmotactisme lorsqu'ils sont placés dans un nouvel environnement (Abdel-Latif et al., 1990; Patton et al., 2010; Riedel, 1998; Sharma et al., 2009; Teyke, 1989). Il y a donc deux hypothèses pour expliquer ce comportement : soit ce thigmotactisme est l'expression du stress provoqué par le nouvel environnement, soit ce thigmotactisme est de l'exploration de l'environnement (Sharma et al., 2009).

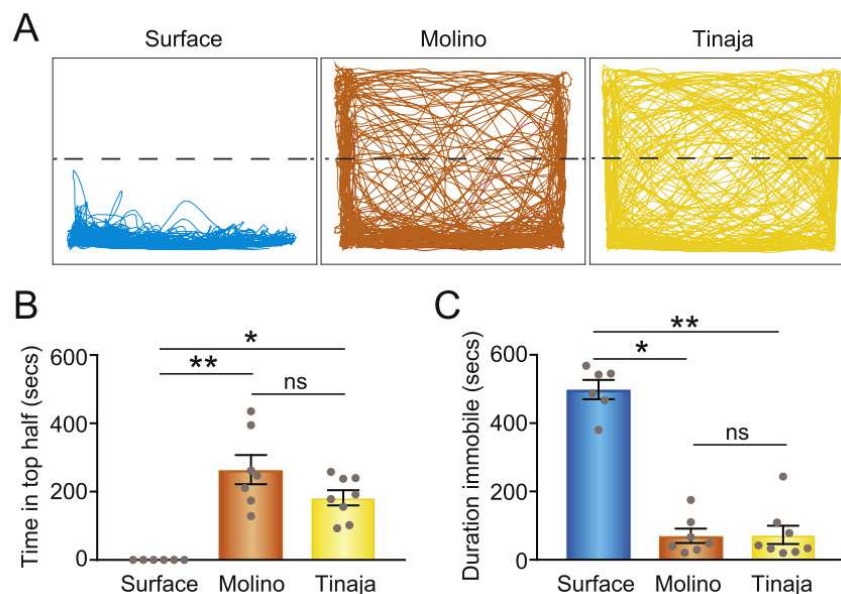


Figure III.D.12. Le stress chez *Astyanax mexicanus*.

Evolution convergente vers la réduction des réponses innées au stress chez les populations de Molino et de Tinaja. (A) Trajectoires de nage représentatives pour des poissons adultes de surface, de Molino et de Tinaja dans le test du nouvel environnement. (B) Quantification du temps passé dans la moitié supérieure du bac pendant une fenêtre d'observation de 10 min. (C) Quantification du temps passé immobile. (Surface: n = 6; Molino: n = 7; Tinaja: n = 8). (Chin et al., 2018)

Beaucoup d'arguments sont en faveur de l'hypothèse de l'exploration. La phase de thigmotactisme est plus longue dans un nouvel environnement, et les poissons construisent une carte cognitive de leur environnement lors de cette phase (Burt De Perera, 2004; Teyke, 1989) (Voir le paragraphe III.D.locomotion pour plus de détails). Cependant, l'apprentissage spatial chez les poissons implique le télencéphale, et plus particulièrement le pallium (Broglia et al., 2010; Rodríguez et al., 2002; Saito and Watanabe, 2006). Or, après une ablation du télencéphale, les poissons cavernicoles font toujours du thigmotactisme dans un nouvel environnement, puis cessent lorsqu'ils s'habituent à l'environnement, de la même manière que pré-opération (Riedel, 1998).

Le thigmotactisme est un comportement de stress chez de nombreuses espèces, puisque des traitements aux anxiolytiques et aux anxiogènes l'atténuent ou l'amplifient (Schnörr et al., 2012; Treit and Fundytus, 1988). Cependant, les poissons cavernicoles nagent de manière un peu plus parallèles aux murs de l'aquarium que les poissons de surface lorsqu'ils font du thigmotactisme, suggérant que ce comportement est différent pour les poissons cavernicoles (exploration) et les poissons des surface (stress) (Sharma et al., 2009).

Lorsque des poissons de surface sont élevés dans le noir, ils passent moins de temps au fond de l'aquarium et ont une plus grande vitesse de nage dans un nouvel environnement que des poissons élevés en rythme jour-nuit (Carlson and Gross, 2018). Leurs comportements se rapprochent de ceux des poissons cavernicoles. Nous pouvons donc nous poser la question de la part de la perte de la vision dans l'expression des comportements de stress chez le poisson cavernicole.

La réponse physiologique au stress

Chez les poissons, le contrôle de la réponse au stress est comparable à celui des mammifères. Les informations sensorielles à propos du stimulus stressant sont intégrées dans le cerveau. Puis, le cerveau coordonne la réponse au stress par 2 voies (Wendelaar, 1997) :

- La voie hypothalamus-système nerveux parasymphatique-cellules chromaffines
- La voie hypothalamus-glande pituitaire-cellules interrénales (axe HPI, homologue de l'axe hypothalamus-pituitary-adrenal (axe HPA) des mammifères)

La voie hypothalamus-système nerveux parasymphatique-cellules chromaffines :

Les cellules chromaffines sont homologues de la partie médullaire des glandes surrénales chez les mammifères. Chez les poissons, elles sont situées dans la partie antérieure du rein, autour de la veine postérieure cardinale (Wendelaar, 1997). **Figure III.D.13**

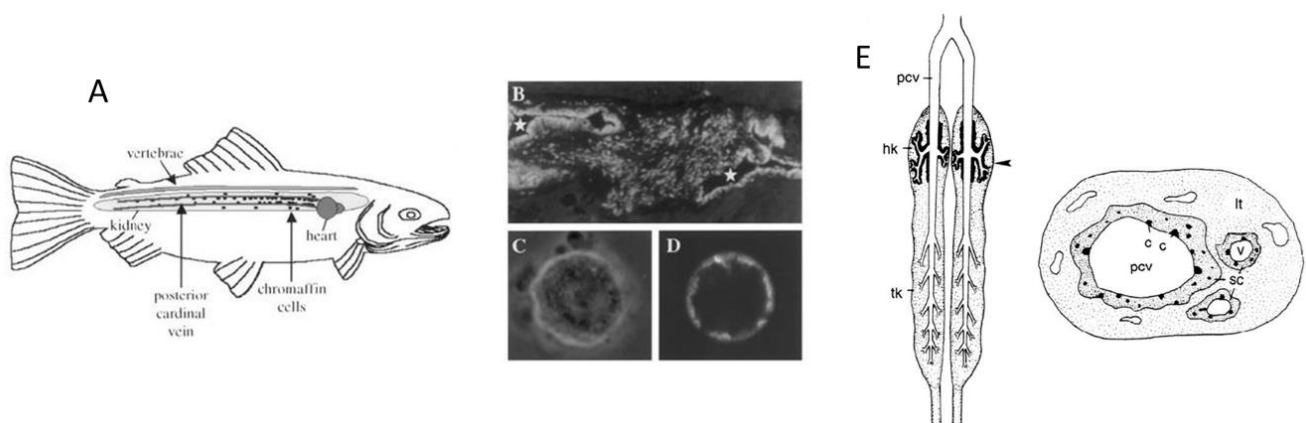


Figure III.D.13. Cellules interrénales et chromaffines chez les poissons téléostéens.

(A) Les cellules chromaffines chez les téléostéens (une truite sur le schéma) sont localisées dans la région antérieure du rein, proche de la veine cardinale postérieure, le long du rein. (B) Section sagittale du rein antérieur chez la morue de l'Atlantique, *G. morhua*. L'astérisque (*) montre la lumière de la veine cardinale postérieure. Les cellules chromaffines sont marquées (blanc) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la dopamine-b-hydroxylase, l'enzyme qui convertit la dopamine en noradrénaline. (C) Cellule chromaffine individuelle. Notez l'apparence granulaire des cellules, due à la présence de granules de sécrétion. (D) Marquage des récepteurs nicotiques d'une cellule chromaffine par de la a-bungarotoxine fluorescente. (Reid et al., 1998)

(E) Gauche : Schéma des reins (partie antérieure = hk et tronc = tk) d'un poisson téléostéen, montrant les veines cardinales postérieures (pcv) et leurs ramifications entourées par le tissu interrénal (homologue des surrénales). Droite : coupe transversale du rein antérieur (au niveau de la flèche sur le schéma de gauche), montrant les cellules stéroïdogéniques (homologue adrencortical) et les groupes de cellules chromaffines (homologue adreno-médullaire) autour de la veine cardinale postérieure (pcv) et des petits vaisseaux sanguins (v). (lt: lymphomyeloid tissue). (Wendelaar, 1997)

Suite à un stress, l'acétylcholine libérée par des fibres des nerfs sympathiques active la sécrétion de noradrénaline (NA) et d'adrénaline (A), ce qui provoque leur augmentation de concentration dans le plasma. Cette augmentation diminue rapidement après la fin du stress s'il s'agit d'un stress aigu, mais peut durer des heures ou des jours en cas de stress chronique (Wendelaar, 1997). Suite à une ablation des fibres cholinergiques, les catécholamines peuvent toujours être sécrétées. Il existe donc une voie non cholinergique

de sécrétion des catécholamines. Elle mettrait en jeu plusieurs facteurs, comme les catécholamines elles-mêmes, le cortisol, le potassium plasmatique, le CO₂, l'hypoxie, la sérotonine et l'ACTH (Adreno-corticotropique hormone) (Mommsen et al., 1999; Reid et al., 1998; Wendelaar, 1997). **Figure III.D.14**

Les catécholamines ont des effets sur différents tissus et organes de l'organisme, permettant la réponse au stress. Elles augmentent les capacités respiratoires et cardiovasculaires en augmentant la ventilation, le flux sanguin dans les branchies, la diffusion de dioxygène dans les branchies, et le rythme cardiaque. Elles augmentent aussi la capacité de transport de dioxygène du sang en augmentant l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ et le nombre de globules rouges circulants. Enfin, les catécholamines induisent une hyperglycémie en activant la glycolyse au niveau du foie (Wendelaar, 1997).

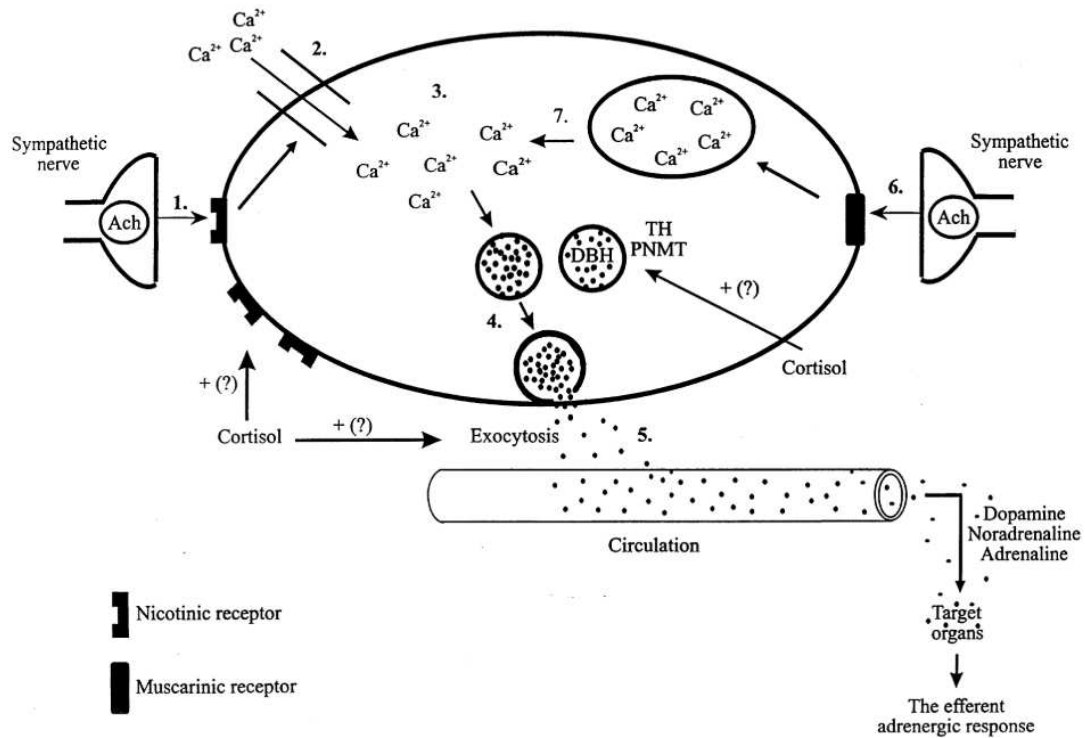


Figure III.D.14. La sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines.

L'acétylcholine libérée par les fibres des nerfs sympathiques stimule les cellules chromaffines en activant les récepteurs nicotiniques [1] ou muscariniques [6]. La stimulation des récepteurs nicotiniques induit l'ouverture de canaux calciques [2]. L'activation des récepteurs muscariniques induit la libération de Ca²⁺ depuis des stocks intracellulaires, comme le réticulum endoplasmique [7]. L'implication de ces deux types de récepteurs dans le contrôle cholinergique de la sécrétion des catécholamines varie selon les espèces de poissons. L'augmentation des taux de Ca²⁺ intracellulaires qui s'en suit [3] peut induire plusieurs événements intracellulaires, incluant un remodelage du cytosquelette facilitant le mouvement des granules de sécrétion vers la membrane plasmique [4], où ils libèrent leur contenu par exocytose [5]. Les catécholamines diffusent vers la circulation sanguine, puis atteignent les organes cibles. Le cortisol peut augmenter le stockage des catécholamines, possiblement en activant les enzymes de la voie de biosynthèse. De plus, le cortisol pourrait aussi intervenir dans le nombre et l'affinité des récepteurs cholinergiques des cellules chromaffines, et sensibiliser le processus de libération des catécholamines par la stimulation des nerfs sympathiques. (Reid et al., 1998)

La voie hypothalamus-glande pituitaire-cellules interrénales :

Suite à un stress, les neurones à CRF de l'aire pré-optique de l'hypothalamus libèrent le CRF (corticotropin releasing factor). Le CRF active alors la sécrétion d'ACTH (adeno-corticotropin hormone) dans la circulation sanguine par la glande pituitaire. L'ACTH se fixe sur le récepteur MC2R (melanocortin 2 receptor) des cellules interrénales et active la libération de cortisol. Les cellules interrénales sont situées à côté des cellules chromaffines, dans le rein antérieur (Wendelaar, 1997). **Figure III.D.13**

La sécrétion de cortisol passe majoritairement par la voie décrite plus haut. Mais le contrôle endocrine de la libération de cortisol est plus complexe et est modulé par de nombreux facteurs. Par exemple, la sécrétion d'ACTH peut être activée par la vasotocin (AVT), l'isotocin et le NPY et inhibée par la melanophore concentrating hormone (MCH). Les cellules interrénales peuvent être activées par l' α -MSH et les β -endorphines (Wendelaar, 1997). Les cellules interrénales sont aussi activées par les catécholamines provenant des cellules chromaffines voisines et qui agissent en paracrine (Rotllant et al., 2006), et par l'angiotensin I, les urotensines I et II et divers autres (pour revue : Mommsen et al., 1999). **Figure III.D.15**

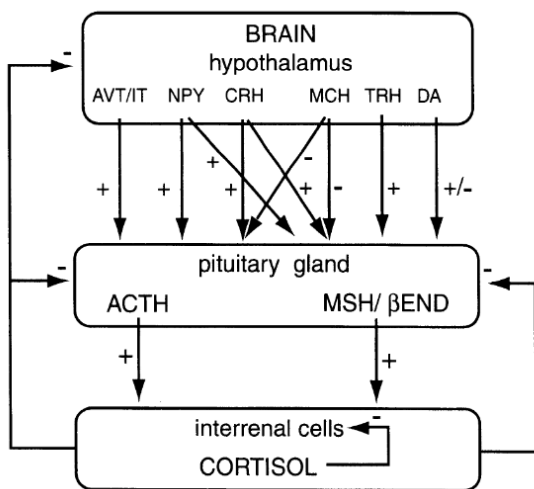


Figure III.D.15. Le contrôle de la libération de cortisol.

Effets stimulants (+) et inhibiteurs (-) des messagers (neuro)endocrines de l'axe hypothalamus-glande pituitaire-cellules interrénales. AVT/IT : arginine vasotocin et isotocin; NPY : neuropeptide Y; CRH : corticotropin-releasing hormone; MCH : melanophore-concentrating hormone; TRH : thyrotropin-releasing hormone; DA : dopamine; ACTH : adrenocorticotropic hormone; MSH : melanophore-stimulating hormone; β END : β -endorphin. (Wendelaar, 1997)

La sécrétion de cortisol est contrôlée par des boucles de régulation négatives. Le cortisol inhibe sa propre sécrétion en agissant sur les cellules interrénales elles-mêmes, ou sur les cellules neuronales sécrétrices d'ACTH et de CRF (Wendelaar, 1997). Le cortisol induit aussi une désensibilisation et une inhibition du récepteur à l'ACTH des cellules interrénales (Bradford et al., 1992).

La concentration plasmatique de cortisol augmente rapidement après l'exposition à un stimulus stressant. Une augmentation des taux de cortisol a été reportée après une chasse (Gesto et al., 2008; Gesto et al., 2015), un visuel de prédateur (Barcellos et al., 2007) une interaction ou une défaite sociale (Higuchi et al., 2019; Tea et al., 2019), un confinement (Backström et al., 2011a; Metz et al., 2004; Rotllant et al., 2006; Schjolden et al., 2006), une surpopulation (Ramsay et al., 2006), un stress chimique (Weber et al., 2012), ou thermique (Shimomura, 2019).

Le taux de cortisol augmente rapidement entre 2 et 15 minutes après le stress (Gesto et al., 2013), et sa mesure est communément utilisée comme indicateur du stress de l'animal (**Figure III.D.16i**). Cependant, il n'existe pas toujours une corrélation exacte entre la concentration de cortisol et l'état de stress. En effet, des stimuli stressants peuvent parfois ne pas induire d'augmentation de taux de cortisol (O'Connor et al., 2011), par exemple à cause d'une mauvaise qualité d'eau (Pickering and Pottinger, 1987).

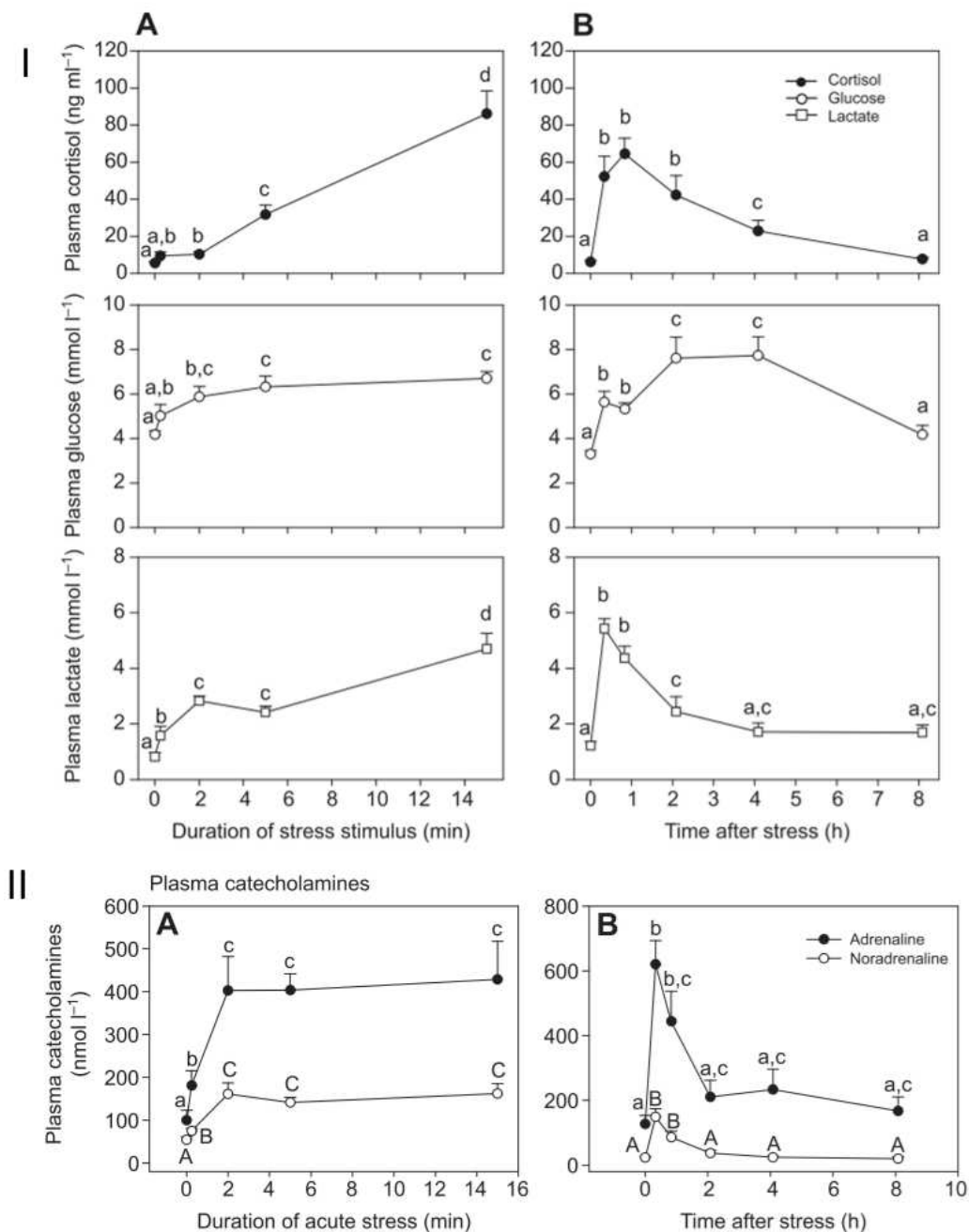


Figure III.D.16. Variations des taux plasmatiques de cortisol, glucose et catécholamine avec le stress.

(I) Variations des taux plasmatiques de cortisol, glucose et lactate chez la truite. (II) Variations des taux plasmatiques des catécholamines (noradrénaline et adrénaline) chez la truite. (A) Les poissons sont exposés à un stress aigu de manipulation pendant 15 s, 2 min, 5 min ou 15 min et sacrifiés immédiatement après. (B) Les poissons sont exposés à un stress aigu de manipulation pendant 5 min, puis sacrifiés 15 min, 45 min, 2 h, 4 h ou 8 h plus tard. (Gesto et al., 2013)

Il existe des variations circadiennes et saisonnières du taux de cortisol chez certaines espèces (Wendelaar, 1997).

Chez l'embryon, la production de cortisol est détectée dès 36 hpf (heures post fertilization) (carpes), mais il existe aussi du cortisol d'origine maternelle dans les œufs (Mommsen et al., 1999; Stouthart et al., 1998). Le cortisol jouerait un rôle important lors du développement, notamment dans le contrôle de la croissance et de l'osmorégulation après l'éclosion (Mathiyalagan et al., 1996; Stouthart et al., 1998).

Récepteurs et modes d'action du cortisol :

Chez les téléostéens, deux isoformes du récepteur aux glucocorticoïdes (GR1 et GR2) ont été trouvées, et sont issues d'une duplication (paralogues). Les téléostéens possèdent aussi un récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) (Bury et al., 2003; Colombe et al., 2000; Greenwood et al., 2003; Prunet et al., 2006). Ces récepteurs se distinguent par le tissu où ils sont exprimés (Greenwood et al., 2003) et par leur affinité pour le cortisol (Prunet et al., 2006). Le GR1 par exemple, a une faible affinité pour le cortisol, et il pourrait donc n'être activé qu'en situation de stress intense, lorsque les taux sanguins de cortisol sont très élevés. Les différences d'affinité et de lieu d'expression des récepteurs permettraient des réponses différentes selon les tissus et l'intensité du stress, alors qu'il n'y a qu'une seule hormone impliquée (Prunet et al., 2006). **Figure III.D.17**

Les récepteurs GR et MR sont cytoplasmiques et se transloquent au noyau lorsqu'ils fixent le cortisol. Ils se fixent alors sur des séquences GRE (glucocorticoid responsive element) et modulent l'expression de gènes (Mommsen et al., 1999). Le cortisol a aussi des actions non génomiques, plus rapides que la voie génomique, mais qui durent moins longtemps dans le temps. Le cortisol a des effets sur des seconds messagers (ex : cAMP, calcium), des enzymes (ex : PKA...), des transporteurs d'ions trans-membranaires, etc... Les effets rapides du cortisol pourraient être importants dans l'adaptation rapide aux changements de l'environnement, comme de la salinité chez les poissons vivant dans les estuaires par exemple (Das et al., 2018).

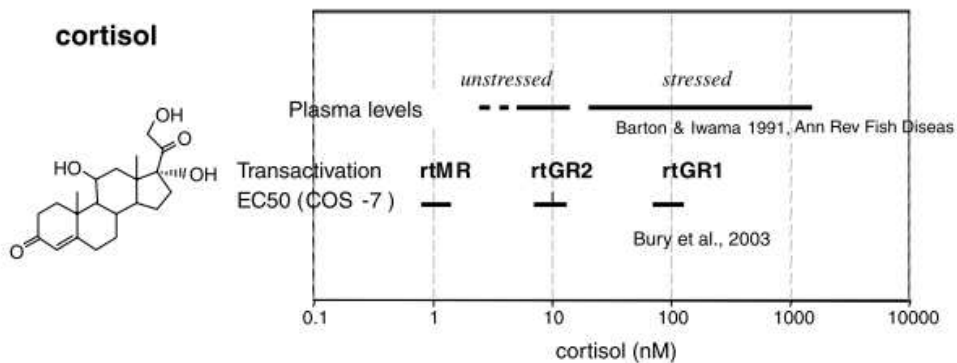


Figure III.D.17. Les récepteurs au cortisol et leur affinité.

Tableau résumant l'affinité des récepteurs GR (rtGR1 and rtGR2) et MR (rtMR) de la truite au cortisol, en comparaison avec les taux plasmatiques de cortisol décrits chez les salmonidés. (Prunet et al., 2006)

Effets physiologiques du cortisol :

Les facteurs qui varient et les gènes dont l'expression est modifiée par l'application d'un stress ou un traitement au cortisol exogène interviennent dans le métabolisme, l'immunité et la reproduction (Aluru and Vijayan, 2009).

Un stress provoque une augmentation de glucose dans le sang. Cette augmentation se fait en deux temps : une première augmentation 2 minutes après l'application du stress et due à l'activation de la glycogénolyse par les catécholamines, libérées rapidement dans le plasma, et une deuxième augmentation, 45min-2h après l'application du stress, et due à l'activation de la néoglucogenèse par le cortisol (Gesto et al., 2013). Le cortisol agit sur les cellules hépatiques et active la néoglucogenèse (Faught and Vijayan, 2016) et la lipolyse, et inhibe la lipogenèse (Wendelaar, 1997). Le cortisol active aussi la protéolyse au niveau des muscles (Mommsen et al., 1999). Le tout permet de faire face à la demande énergétique associée au stimulus stressant (fuite, défense...).

Figure III.D.18

Une autre grande fonction métabolique du cortisol est le maintien de l'équilibre hydrominéral. Lors d'un stress osmotique, le cortisol active les échanges d'ions au niveau des branchies. Il active aussi la différenciation des cellules à chlorure, les principales cellules transporteuses d'ions dans les branchies (Wendelaar, 1997).

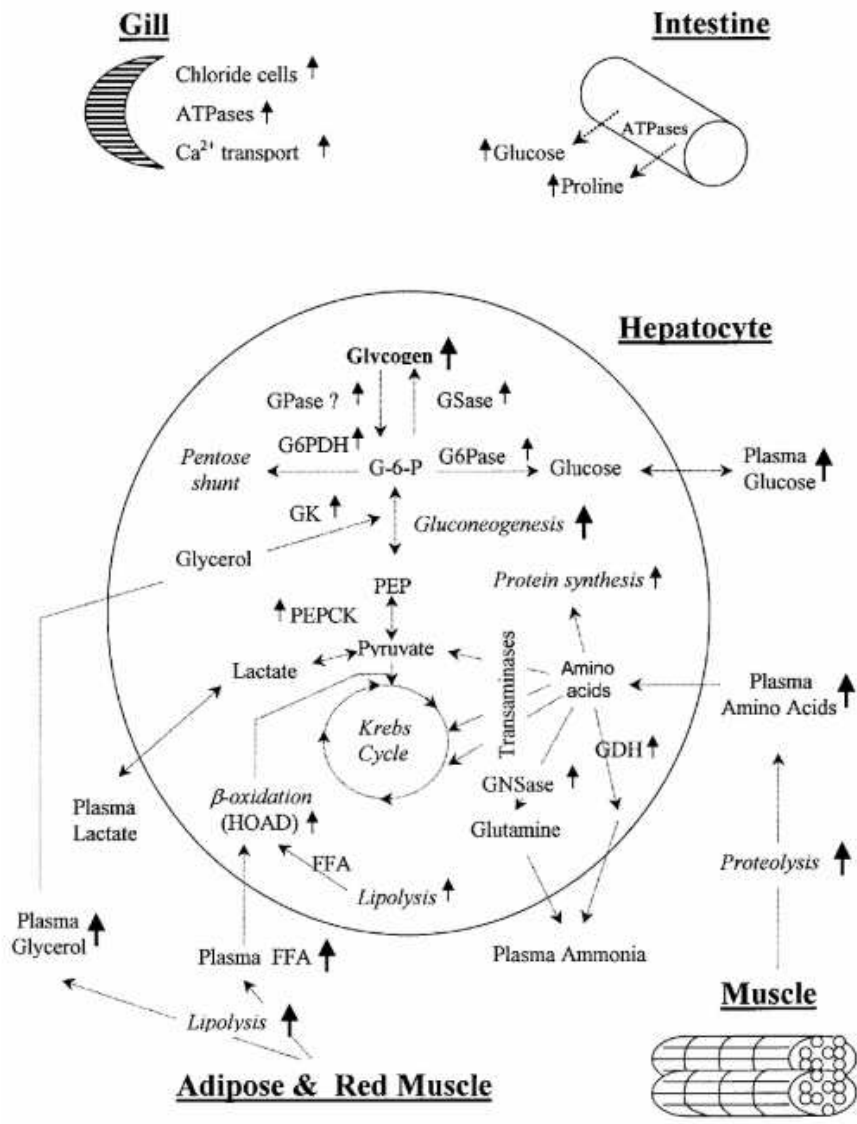


Figure III.D.18. Les effets métaboliques du cortisol chez les poissons.

Les flèches indiquent les voies ou processus qui sont contrôlés par le cortisol. Les lignes en pointillés indiquent le flux des métabolites. Abréviations : FFA, free fatty acids; HOAD, 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase; GDH, glutamate dehydrogenase; GK, glycerol kinase; GNSase, glutamine synthetase; GPase, glycogen phosphorylase; GSase, glycogen synthase; G6Pase, glucose 6-phosphatase; G6PDH, glucose 6-phosphate dehydrogenase; PEP phosphoenolpyruvate; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase. (Mommsen et al., 1999)

Une élévation chronique de cortisol diminue la prise alimentaire chez les poissons (Gregory and Wood, 1999; Madison et al., 2015) (Figure III.D.19), probablement en agissant sur la synthèse de peptides régulant la prise alimentaire. Par exemple, (Madison et al., 2015) ont montré qu'un traitement chronique au cortisol augmentait l'expression de *lep-1A* (leptine) dans le foie et de *crf* dans l'aire préoptique.

Le stress et le cortisol induisent divers effets sur le système immunitaire, dont une diminution des lymphocytes circulants, des réponses anticorps, et de la phagocytose (Harris 2000, Tort 2011). Figure III.D.20

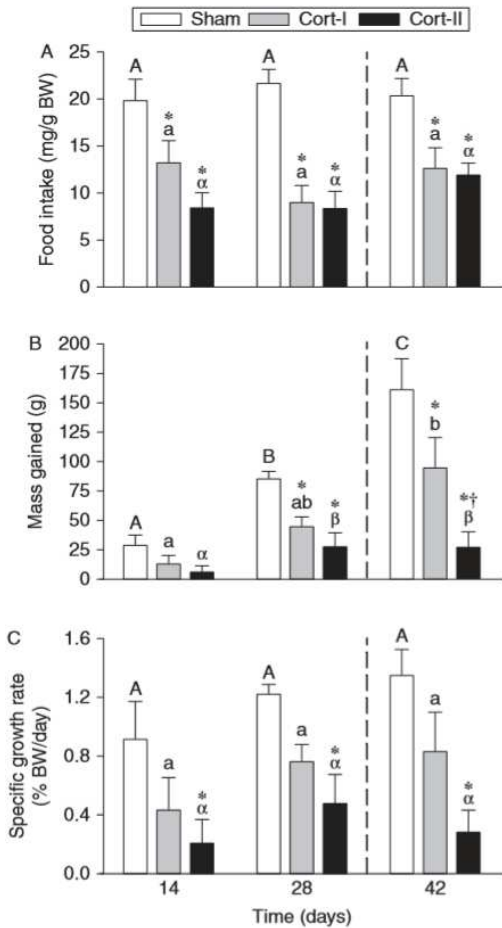


Figure III.D.19. Cortisol, prise alimentaire et croissance. (A) Prise alimentaire, (B) masse gagnée et (C) taux de croissance chez des truites ayant un implant intra-péritonéal avec une pompe micro-osmotique contenant 20 mg (Cort-I), 40 mg de cortisol (Cort-II) ou rien (Sham). Les traitements au cortisol se sont terminés à 34 jours, indiqués par la ligne en pointillés. (Madison et al., 2015)

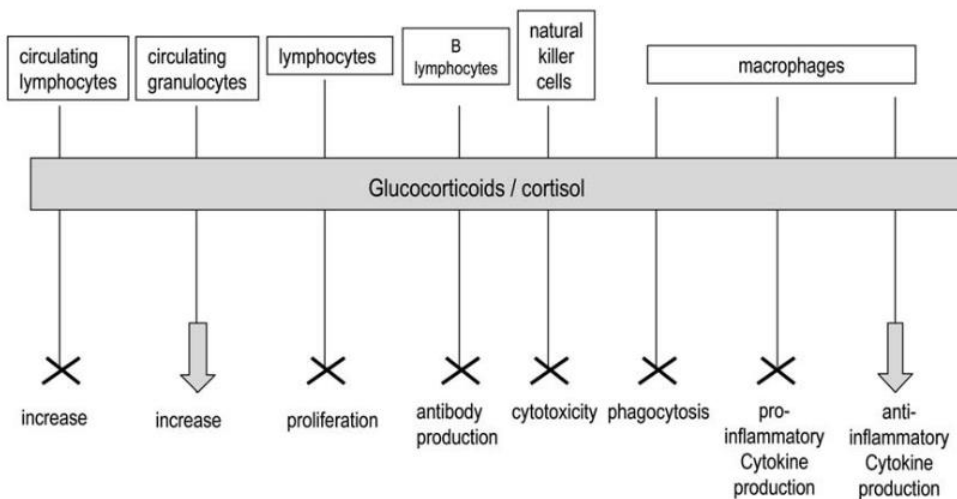


Figure III.D.20. Effets du cortisol sur la réponse immunitaire. Les flèches indiquent une activation, les croix une inhibition. (Tort, 2011)

Enfin, le cortisol inhibe la vitellogenèse et la fixation des œstradiols par le foie, et interfère donc avec la fonction reproductive (Lethimonier et al., 2000; Mommsen et al., 1999).

La production de cortisol lors d'une réponse au stress permet donc la réallocation des ressources de manière temporaire, depuis des activités non essentielles, comme la reproduction, vers des activités permettant la survie immédiate, comme la fuite face à un prédateur, ou le maintien de l'équilibre hydrominéral. Il s'agit donc d'une réponse adaptative face à un danger de l'environnement (Breuner et al., 2008).

Le stress et la production de cortisol ont toutefois des effets négatifs puisque la prise alimentaire, l'immunité et la reproduction sont impactées. Un traitement au cortisol induit une diminution de la croissance à cause de la réduction de la prise alimentaire et de l'augmentation du métabolisme (Madison et al., 2015; Wendelaar,

1997). Le stress ou l'injection de cortisol diminue aussi la résistance des poissons aux infections (Maule et al., 1989; Pickering and Pottinger, 1989). Un stress chronique amplifie ces effets négatifs et diminue la valeur sélective des individus (Madison et al., 2015; Pickering and Pottinger, 1989). **Figure III.D.21**

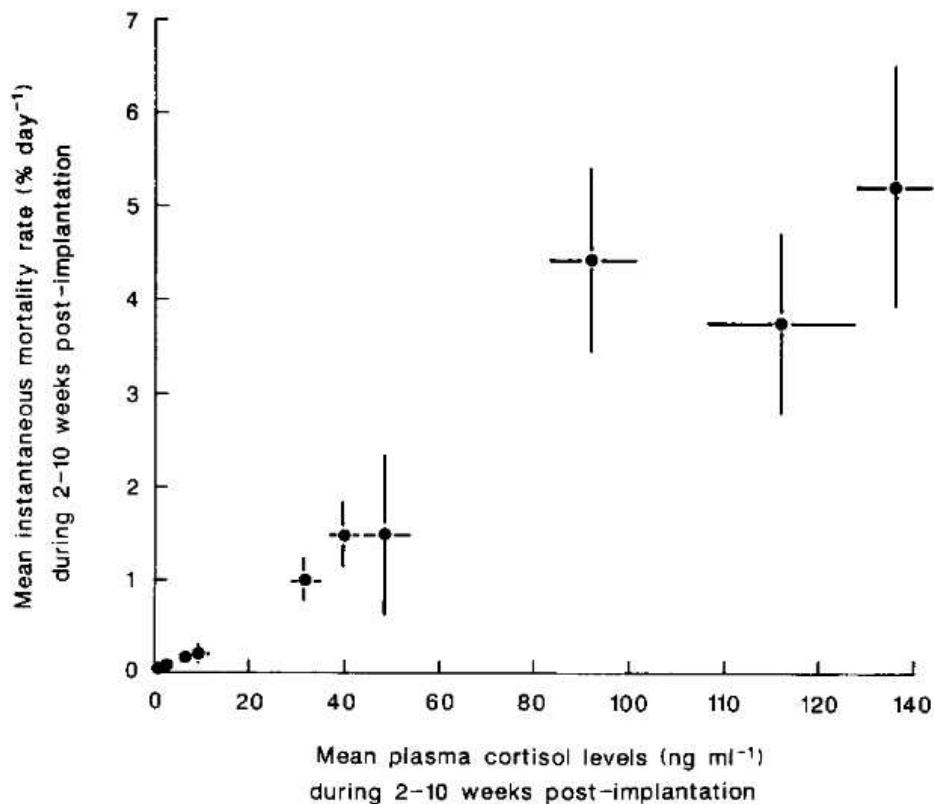


Figure III.D.21. Cortisol et fitness.

Corrélation entre les taux plasmatiques de cortisol de truites ayant reçu un implant de cortisol et le taux de mortalité. La cause majeure de mortalité des truites implantées est due à une infection à *Saprolegnia*. (Pickering and Pottinger, 1989)

Monoamines et stress

Pour étudier les éventuels liens entre les monoamines et le stress, on peut :

- soit induire un stress chez les animaux et observer les effets sur les systèmes monoaminergiques
- soit modifier les systèmes monoaminergiques et observer les effets sur les comportements de stress ou sur la réponse physiologique et moléculaire au stress (comme l'état d'activation de l'axe HPI par exemple)

Effets du stress sur le système sérotoninergique :

Chez les mammifères, le stress provoque l'activation du système sérotoninergique (Lanfumej et al., 2008). Par exemple, chez le rat, un stress induit une augmentation de sérotonine libérée dans le cortex préfrontal médian, l'une des cibles des neurones sérotoninergiques du raphé dorsal (Bland et al., 2003). **Figure III.D.22I**

L'activation du système sérotoninergique a aussi été démontrée chez les lézards, avec une augmentation du ratio 5-HIAA/5-HT dans le striatum, le cortex dorsal, le locus cœruleus, et le noyau accumbens (Emerson et al., 2000).

Chez les poissons, les résultats sont très similaires. Beaucoup d'études montrent une activation du système sérotoninergique par un stress (Gesto et al., 2013; Gesto et al., 2014; Gesto et al., 2015; Moltesen et al., 2016; Øverli et al., 1999; Schjolden et al., 2006; Weber et al., 2012) dans diverses régions du cerveau (hypothalamus, télencéphale, tectum optique, tronc cérébral) (Figure III.D.22III). Les drogues anxiolytiques diminuent le turnover de la sérotonine, tandis que les drogues anxiogènes l'augmentent (Maximino et al., 2014a). Lors d'un stress, le système sérotoninergique est activé très rapidement (moins de 1min) après l'apparition du stimulus stressant, puis, une deuxième phase d'activation arrive environ 1h après le stimulus stressant (Gesto et al., 2013). La première activation pourrait être due directement à la perception du stimulus stressant, la deuxième phase d'activation pourrait être due à l'activation du système sérotoninergique par des facteurs de la voie des glucocorticoïdes. En effet, l'activité sérotoninergique est aussi affectée par le cortisol, le CRF et l'AVT (Backström et al., 2011b; Carpenter et al., 2007; DiBattista et al., 2005; Sangiao-Alvarellos et al., 2004). Un traitement au cortisol chez la truite augmente le ratio 5-HIAA/5-HT dans le télencéphale, mais le diminue dans l'hypothalamus (DiBattista et al., 2005).

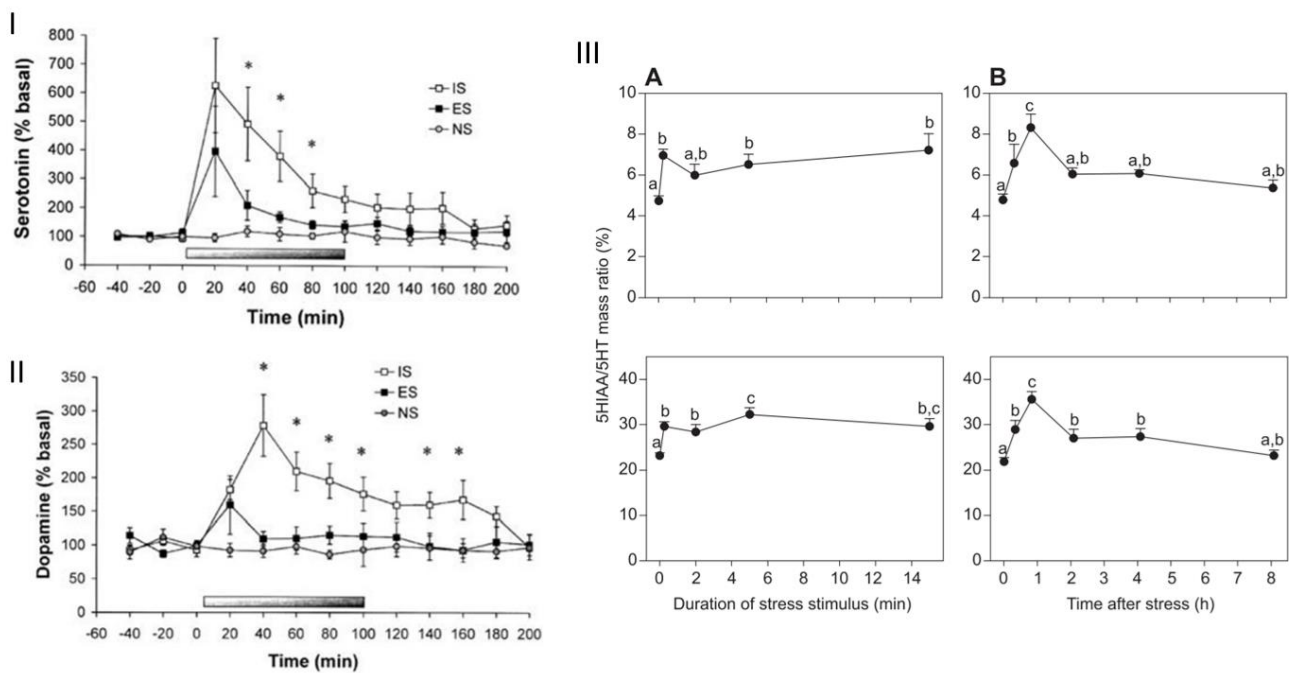


Figure III.D.22. Effets du stress sur les taux de sérotonine et de dopamine et sur l'activité sérotoninergique.

Mammifères : Efflux de 5-HT (I) et DA (II) dans le mPFC (medial prefrontal cortex) avant, pendant et après exposition à un stress inévitable (IS), évitable (ES), ou aucun stress (NS). La barre indique la durée de la session de stress. L'exposition à un IS augmente l'efflux de 5-HT et de DA dans le mPFC pendant la session de stress. (Bland et al., 2003)

Truite : (III) Changements d'activité sérotoninergique (ratio 5-HIAA/5-HT) dans l'hypothalamus (panneaux du haut) et le télencéphale (panneaux du bas). (A) Les poissons ont été exposés à un stress aigu de manipulation pendant 15 s, 2 min, 5 min ou 15 min et sacrifiés immédiatement après. (B) Les poissons ont été exposés à un stress de manipulation pendant 5 min et sacrifiés après 15 min, 45 min, 2 h, 4 h ou 8 h. (Gesto et al., 2013)

Le lien entre le stress et les monoamines a été beaucoup étudié dans un contexte de dominance. La formation de la hiérarchie et de la dominance est stressante pour les poissons, et s'accompagne d'une élévation de cortisol plasmatique (Higuchi et al., 2019; Tea et al., 2019), et de l'activité sérotoninergique. Cette augmentation de l'activité sérotoninergique est cependant variable selon la région du cerveau étudiée, et est plus importante chez les subordonnés et les lignées de poissons très réactives au stress (Øverli et al., 1999; Øverli et al., 2001; Teles et al., 2013; Winberg and Nilsson, 1993).

Quand la mise en place de la dominance est terminée, le poisson dominant devient moins stressé, alors que le subordonné reste stressé. Les poissons subordonnés sont chroniquement stressés, et présentent des inhibitions de comportement : suppression d'appétit, diminution d'agressivité et du comportement

reproducteur (Backström and Winberg, 2017; Summers and Winberg, 2006; Winberg and Nilsson, 1993). Les dominés ont aussi une activation chronique de l'axe HPI, avec des taux de cortisol, et de CRF chroniquement élevés (Doyon et al., 2003; Jeffrey et al., 2012; Øverli et al., 1999; Sloman et al., 2000).

En parallèle, à la fin de la mise en place de la dominance, les concentrations de 5-HT, 5-HIAA et le ratio 5HIAA/5-HT reviennent à leur état basal chez les dominants, alors que les index de l'activité sérotoninergique restent hauts chez les subordonnés (Dahlbom et al., 2012; Øverli et al., 1999; Winberg and Nilsson, 1993). Les subordonnés ont une activation chronique du système sérotoninergique (Backström and Winberg, 2017; Winberg and Nilsson, 1993). Les comportements inhibés tels que l'agressivité seraient dus au système sérotoninergique chroniquement activé (Winberg and Nilsson, 1993). **Figure III.D.23**

Ces études sont cohérentes avec celles réalisées chez les lézards, qui ont montré que les males sans territoire avaient une activité du système sérotoninergique et un ratio 5-HIAA/5-HT plus élevés que chez les males avec un territoire (Matter et al., 1998).

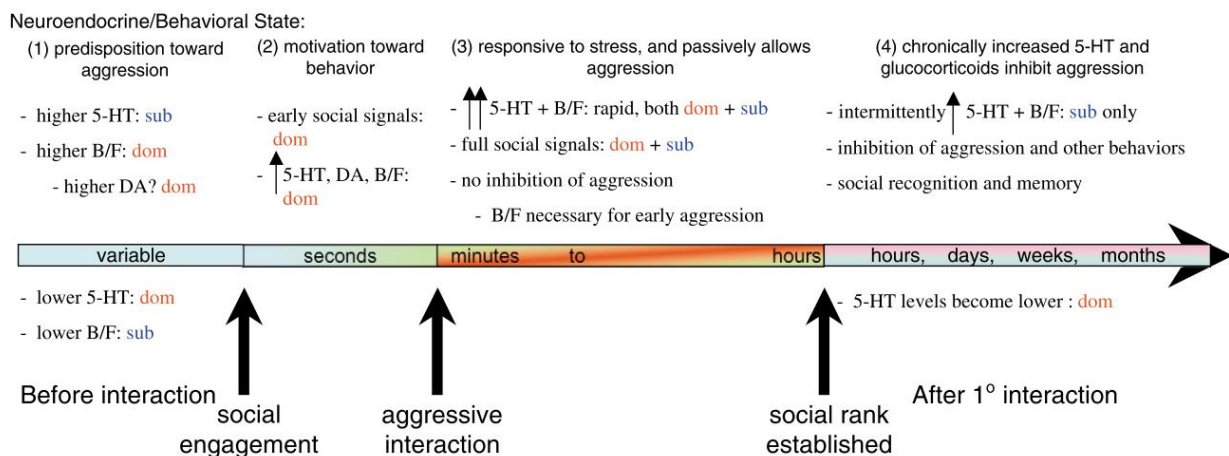


Figure III.D.23. Variations des taux de monoamines pendant l'établissement de la dominance.

Avant l'interaction (1), les taux basaux plasmatiques de glucocorticoïdes (B=corticostérone chez les lézards, rats, souris, grenouilles, oiseaux; F=cortisol chez les poissons, humains, moutons, hamsters), et les niveaux d'activité sérotoninergique et dopaminergique dans les régions cérébrales associées à l'agressivité et à la motivation, influencent la prédisposition de l'animal envers l'agressivité. Le profil neuroendocrine est différent chez les individus qui deviendront dominants (dom) et chez les individus qui deviendront subordonnés (sub). (2) Lorsque les combattants se rencontrent et que l'engagement social commence, des changements rapides de profil neuroendocrine des futurs dominants génèrent la motivation pour l'agressivité. (3) Après le début des comportements agressifs, les deux animaux ont une réponse au stress. Les activités glucocorticoïdes et sérotoninergique augmentent drastiquement et rapidement chez les individus qui deviendront dominants et ceux qui deviendront subordonnés. Ni l'élévation de glucocorticoïdes plasmatique ni l'élévation de l'activité sérotoninergique n'inhibe l'agressivité. (4) Enfin, lorsque la dominance est établie, les taux chroniques élevés de glucocorticoïdes et de 5-HT inhibent l'agressivité. (Summers and Winberg, 2006)

L'ensemble de ces études montrent que chez les vertébrés, un stress ou la subordination sont associés à un plus fort turnover de la sérotonine, et une plus grande l'activité sérotoninergique.

Le mécanisme par lequel un stress ou un traitement au cortisol augmenterait l'activité sérotoninergique est peu connu. Des études ont montré qu'un stress ou un traitement au cortisol diminue l'expression du récepteur 5-HT1A chez les poissons (Medeiros and McDonald, 2013; Moltesen et al., 2016) et les mammifères (Lanfumey et al., 2008; Ou et al., 2001). Or les autorécepteurs 5-HT1A inhibent l'activité des neurones serotoninergiques (Andrade et al., 2015). C'est une hypothèse possible pour expliquer l'effet du stress sur l'activité sérotoninergique (Lanfumey et al., 2008).

Effets du système sérotoninergique sur le stress :

Chez les mammifères

Chez les rongeurs, le test « elevated T-maze » permet à la fois d'évaluer l'anxiété des animaux en mesurant le temps mis par l'animal pour sortir du bras fermé, et la panique (peur) en mesurant le temps pour sortir du bras ouvert (Zangrossi and Graeff, 2014). La lésion des neurones sérotoninergiques du raphé dorsal diminue l'anxiété des rats dans ce test, mais augmente en même temps la peur des animaux (Sena et al., 2003). Le système sérotoninergique a donc un double rôle, en augmentant l'anxiété, mais en inhibant la peur. D'autres études utilisant des inhibiteurs de recapture de la sérotonine, des agonistes sérotoninergiques ou des drogues activant la libération de la sérotonine, soutiennent la double action du système sérotoninergique sur l'anxiété (probablement médiée par l'amygdale) et la peur (probablement médiée par le PAG (periaqueductal gray)) (Graeff et al., 1997; Zangrossi and Graeff, 2014). **Figure III.D.24**

La lésion des neurones sérotoninergiques dans le raphé médian réduit aussi l'anxiété, mais sans affecter la peur (Andrade et al., 2004). Les autorécepteurs 5-HT_{1A} inhibent les neurones du raphé dorsal et médian. La microinjection de l'agoniste 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT dans le raphé dorsal diminue l'anxiété et augmente la peur (Sena et al., 2003), tandis que l'injection dans le raphé médian n'affecte que l'anxiété (Dos Santos et al., 2005; Vicente et al., 2008). Les deux noyaux du raphé affectent donc l'anxiété, alors que seul le raphé dorsal affecte la peur.

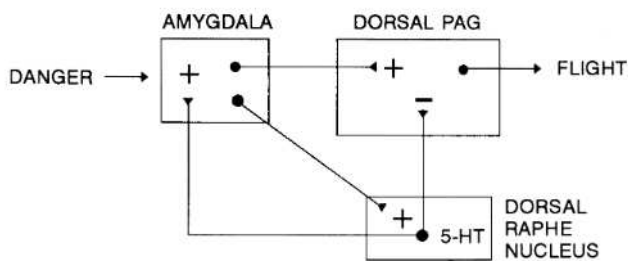


Figure III.D.24. Le double rôle de la sérotonine sur la peur et l'anxiété.

Représentation schématique du rôle de la 5-HT dans la modulation des comportements défensifs. Les neurones 5-HT du raphé dorsal seraient activés par les situations stressantes. Leurs projections ascendantes activent les neurones qui évaluent le danger dans l'amygdale, et inhibent les neurones commandant la réponse de peur dans le PAG (dorsal periaqueductal gray). (Graeff et al., 1997)

Différentes voies sérotoninergiques activent ou inhibent l'axe HPA (Lowry, 2002). Les stimuli stressants activent l'axe HPA par un réseau neuronal impliquant diverses régions, dont l'amygdale. Les projections sérotoninergiques du raphé dorsal innervent plusieurs régions de ce réseau et sensibilisent son effet activateur sur l'axe HPA. Inversement, le raphé médian innerve intensément l'hippocampe. L'hippocampe joue un important rôle dans l'inhibition de l'axe HPA (Herman and Cullinan, 1997), qui passe par l'activation de neurones GABA. Les projections sérotoninergiques du raphé médian stimuleraient ces neurones GABA, et inhiberaient ainsi l'activité de l'axe HPA (Lowry, 2002).

Chez les poissons

Les comportements des rongeurs provoqués par la peur ou l'anxiété ont été largement étudiés. En revanche, chez les poissons, les stimuli qui pourraient induire soit de la peur soit de l'anxiété sont peu connus (Maximino et al., 2012). Il a cependant été proposé que le visuel de prédateurs ou la substance d'alarme provoque de la peur chez le poisson. Inversement, la nage au fond de l'aquarium dans un nouvel environnement ou la préférence pour le compartiment noir dans un test « light/dark » seraient des comportements d'anxiété (Jesuthasan, 2012).

Comme chez les mammifères, de nombreuses études chez les poissons ont montré un rôle modulateur de la sérotonine sur les comportements de stress :

Les effets d'un traitement à la fluoxétine sur les comportements de stress varient beaucoup selon les conditions expérimentales : Un traitement à la fluoxétine diminue les comportements de stress à faible concentration, chez les poissons zèbres léopard ou dans un « novel tank test », et inversement, les augmente à plus forte concentration, chez les poissons zèbres longfin ou dans un test « light/dark » (Maximino et al.,

2013b; Maximino et al., 2013a; Winberg and Thörnqvist, 2016). De plus, Maximino et al., (2014b) ont montré que la fluoxétine diminue les comportements de stress en présence de substance d'alarme, mais les augmente sans substance d'alarme. Comme la substance d'alarme induit des comportements d'échappement (peur), on peut supposer que le double rôle de la sérotonine sur l'anxiété et la peur montrée chez les mammifères existe aussi chez les poissons. **Figure III.D.25**

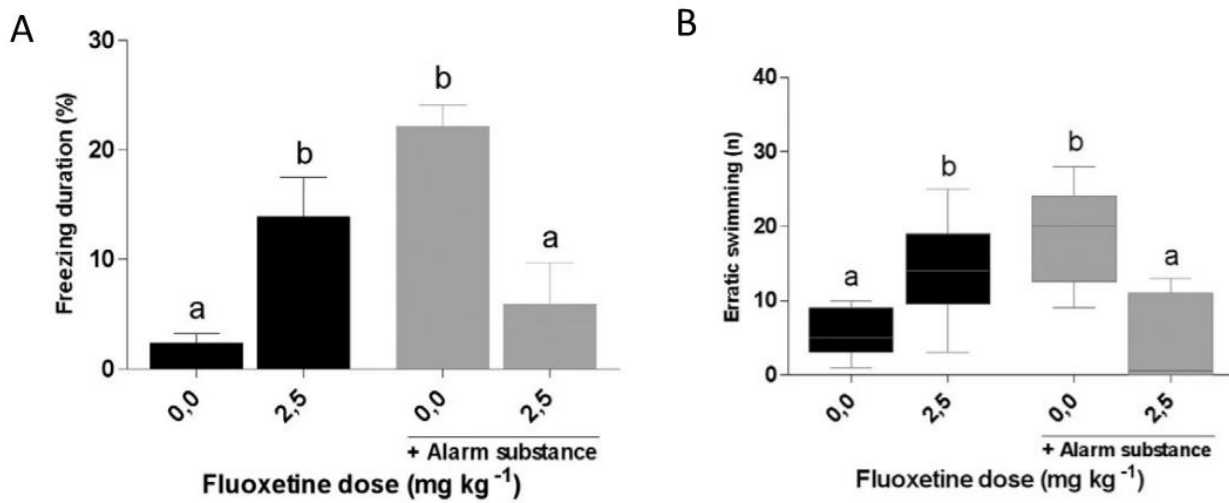


Figure III.D.25. Effets d'un traitement à la fluoxétine sur les comportements de stress chez le poisson zèbre.

La fluoxétine, à une dose anxiogène, bloque les effets comportementaux de la substance d'alarme dans un test lumière/obscurité. (A) Durée totale d'évènements de « freezing » dans le compartiment blanc. (B) Fréquence de mouvements erratiques dans le compartiment blanc. (Maximino et al., 2014b)

Un traitement à la buspirone, agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A}, a des effets anxiolytiques dans divers test comportementaux chez le poisson zèbre (Bencan et al., 2009; Connors et al., 2014; Maximino et al., 2013b; Maximino et al., 2014a; Norton and Gutiérrez, 2019). Inversement, un traitement au 8-OH-DPAT, un agoniste complet des récepteurs 5-HT_{1A}, cause une augmentation du taux de cortisol chez la truite (Winberg et al., 1997), ou le poisson-crapaud (gulf toadfish) (Medeiros et al., 2010). Une hypothèse possible pour expliquer ces résultats serait que les autorécepteurs 5-HT_{1A} (qui inhibent les neurones sérotoninergiques) auraient une plus forte affinité que les récepteurs post-synaptiques 5-HT_{1A} (activés par les neurones sérotoninergiques et qui activeraient l'axe HPI). Ainsi, un agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A} activerait les autorécepteurs inhibiteurs et inhiberait l'action activatrice des neurones sérotoninergiques sur l'axe HPI. Un agoniste complet activerait en plus les récepteurs post synaptiques. Le fait qu'une forte dose de 8-OH-DPAT active l'axe HPA et qu'une faible dose inhibe l'axe HPA chez les rats confortent cette hypothèse (Welch et al., 1993).

La sérotonine stimule aussi la libération de cortisol en agissant comme facteur paracrine local dans les glandes surrénales (Lefebvre et al., 1992) chez les mammifères et interrénales chez les poissons (Lim et al., 2013). Elle stimule aussi la sécrétion de catécholamines chez les mammifères, indépendamment de la voie cholinergique (Dinan, 1996).

Si l'implication de la sérotonine dans la modulation du stress a largement été démontrée chez les vertébrés, le mécanisme exact de cette modulation reste peu clair, et les différentes études ne sont pas toujours cohérentes entre elles. Les effets de la sérotonine sur le stress sont complexes, et varient selon le lieu d'action (cerveau, glandes surrénales), l'espèce ou la souche utilisée, le test comportemental, la drogue ou les concentrations utilisées, etc...

Stress et dopamine :

Chez les poissons, une activation du système dopaminergique a été montrée suite à un stress dans diverses régions du cerveau, comme le tronc cérébral, l'hypothalamus, la région préoptique, le télencéphale la glande pituitaire et le tectum optique (Backström et al., 2011a; Gesto et al., 2008; Øverli et al., 1999; Weber et al., 2012). Cette activation n'a cependant pas toujours lieu et dépend de la région du cerveau (Weber et al., 2012), de la durée du stress (Gesto et al., 2008; Gesto et al., 2015), et du statut social (Øverli et al., 1999).

Des traitements au CRF, cortisol et AVT modifient aussi l'activité dopaminergique (Carpenter et al., 2007; DiBattista et al., 2005; Sangiao-Alvarellos et al., 2004). L'action d'un inhibiteur des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) ne modifie pas l'effet du traitement au cortisol sur l'activité dopaminergique. Cet effet passerait donc par une autre voie que celle des GR, comme le récepteur MR ou une action non génomique du cortisol (DiBattista et al., 2005).

De nombreuses études chez les mammifères et les poissons soutiennent le fait que la dopamine aurait un effet activateur du stress. En effet, la cocaïne a un effet anxiogène connu chez les rongeurs (Blanchard and Blanchard, 1999; Costall et al., 1989; Fontana and Commissaris, 1989; Salas-Ramirez et al., 2010; Simon et al., 1994). Chez le poisson zèbre, un traitement avec un inhibiteur de DAT (cocaïne, TDF) augmente les comportements de stress (Kacprzak et al., 2017; López-Patiño et al., 2008; Paredes-Zúñiga et al., 2019; Stewart et al., 2011). Les poissons knockout pour le gène *dat* sont aussi plus anxieux. L'anxiété due à la cocaïne peut être contrée par un antagoniste du récepteur D1. Donc la neurotransmission dopaminergique via les récepteurs D1 augmenterait l'anxiété (Kacprzak et al., 2017). [Figure III.D.26](#)

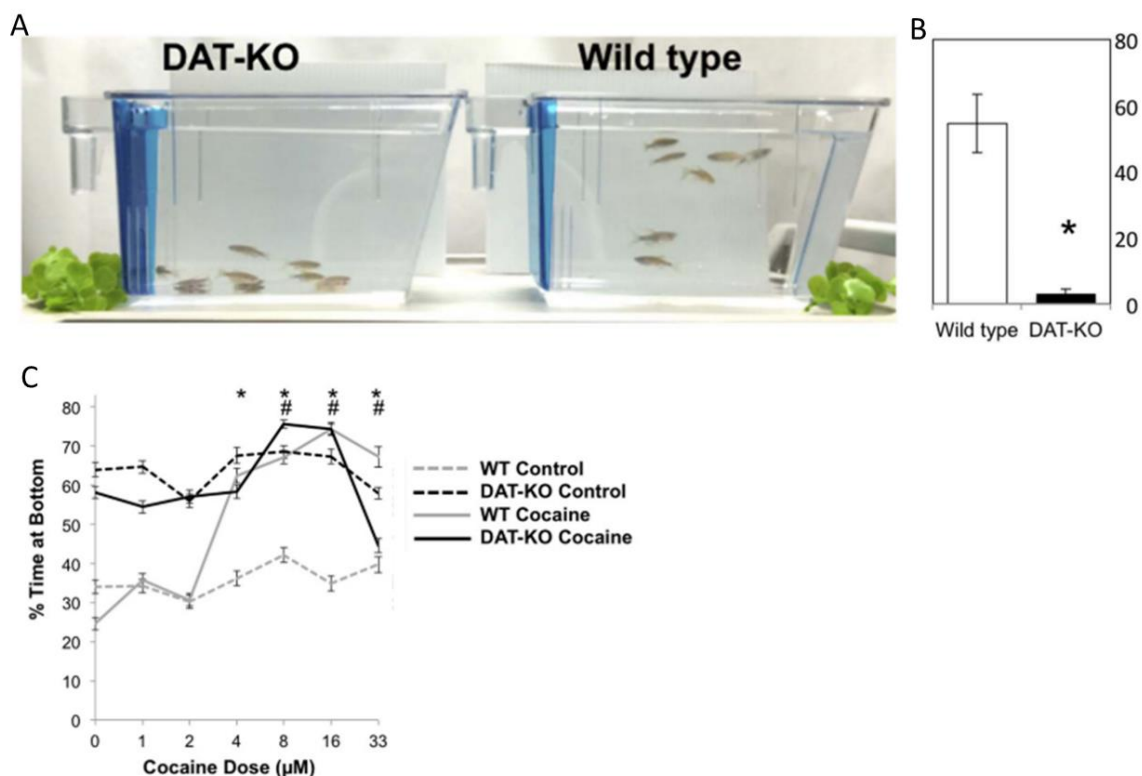


Figure III.D.26. Dopamine et comportements de stress.

(A) les poissons zèbres DAT-KO nagent au fond du bac, contrairement aux poissons sauvages. (B) % de temps passé dans la partie supérieure de l'aquarium. (C) Effets d'un traitement aigu à la cocaïne sur le comportement de nage chez les poissons DAT-KO et sauvages. Pourcentages de temps passé au fond du bac. (Kacprzak et al., 2017)

D'autres études en revanche ont rapporté un effet anxiolytique de la dopamine (Höglund et al., 2001; Johnson and Hamilton, 2017; Tran et al., 2015). Par exemple un traitement à la L-DOPA, connu pour augmenter les taux de dopamine dans le cerveau, inhiberait la réponse au stress (Höglund et al., 2001).

S'il est évident que la dopamine joue un rôle dans la modulation de la réponse au stress, son implication reste cependant peu claire. Il a été suggéré que la dopamine pourrait modérer l'effet activateur de la sérotonine sur le stress (Gesto et al., 2015; Höglund et al., 2001). Ensemble, les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques participeraient à l'organisation de la réponse au stress chez les vertébrés (Gesto et al., 2015).

E. Techniques, avantages et désavantages du modèle *Astyanax mexicanus*

Avantages et désavantages généraux :

L'une des plus importantes caractéristiques d'un animal modèle est sa facilité d'élevage dans un laboratoire. Le poisson *Astyanax mexicanus* est petit, il a un régime alimentaire facile et il est très résistant. Il peut facilement tolérer des changements brusques de température de plusieurs degrés, une qualité d'eau moyenne ou une manipulation. Il se reproduit aussi facilement, fréquemment et produit un grand nombre d'œufs. Mais il a le désavantage de ne se reproduire qu'en groupe, rendant les croisements spécifiques plus difficiles. Le poisson de surface est aussi très agressif envers ses congénères, ce qui peut induire de grosses pertes d'individus dans l'élevage lorsqu'il est maintenu en groupes de trop petite taille. Un autre désavantage est le temps de génération relativement long (environ 6 mois).

Pour les études d'embryologie, l'*Astyanax* possède tous les avantages du poisson, c'est-à-dire la reproduction externe, le grand nombre d'œufs produits et la transparence des embryons. Les larves d'*Astyanax* sont de taille plus grande que les embryons de poisson zèbre.

Beaucoup de techniques utilisées chez le poisson zèbre sont possibles chez l'*Astyanax*, par exemple des traitements pharmacologiques, et des techniques de biologie moléculaire. L'utilisation de morpholinos, de techniques de transgénèse, et la surexpression de gènes sont utilisés chez l'*Astyanax* (Elipot et al., 2014b; Klaassen et al., 2018; Yamamoto et al., 2004; Yamamoto et al., 2009). Les techniques de génétique moléculaires sont facilitées par le fait que le génome de l'*Astyanax* ait été séquencé (McGaugh et al., 2014). Le répertoire de comportements du poisson zèbre est aussi transposable à l'*Astyanax*.

L'*Astyanax* comme modèle d'étude de l'évolution :

L'*Astyanax* est un excellent modèle pour étudier les mécanismes de l'évolution, l'adaptation dans un milieu de vie particulier et les gènes responsables de cette adaptation (Kowalko, 2020). Son gros avantage par rapport aux autres espèces cavernicole est que la forme de surface dérivant de l'ancêtre commun existe toujours. Comparer l'*Astyanax* cavernicole avec l'*Astyanax* de surface revient à comparer un poisson mutant avec un sauvage.

Les *Astyanax* de surface et les *Astyanax* cavernicoles sont interfertiles, ce qui rend possible l'utilisation d'approches QTL (Quantitative Trait Loci) pour identifier les loci impliqués dans l'évolution des traits cavernicoles. Ont ainsi été identifiés des QTL pour la perte de la pigmentation (Gross et al., 2009; Protas et al., 2006), la dégénération de l'œil (O'Quin et al., 2013; Protas et al., 2007), la nage en banc (Kowalko et al., 2013b), le VAB (Yoshizawa et al., 2012; Yoshizawa et al., 2015), l'activité locomotrice (Carlson et al., 2018; Yoshizawa et al., 2015) ...

Il existe au moins 30 grottes avec des populations d'*Astyanax* cavernicoles dont certaines sont d'origine indépendante (Bradic et al., 2012), ce qui permet d'étudier l'évolution répétée de traits cavernicoles. De plus,

l'interfertilité entre les différentes populations de poissons cavernicoles rend possibles les études de complémentation (Borowsky, 2008; Jeffery, 2009; Protas et al., 2006; Wilkens and Strecker, 2003). **Figure III.D.27**

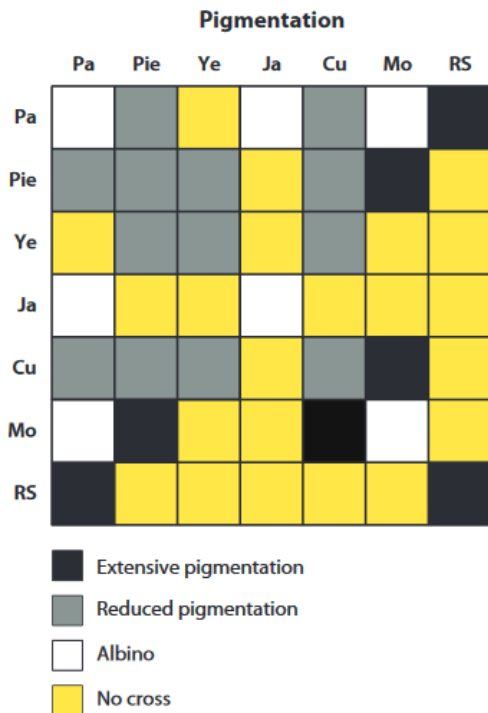


Figure III.D.27. Tests de complémentation génétique pour la régression des pigments.

Carré de Punnett illustrant le niveau de pigmentation chez des hybrides F1 de différentes populations cavernicoles. LS: Los Sabinos. Pa: Pachón. Pie: Piedras. Ye: Yerbaniz. Ja: Japones. Cu: Curva. Mo: Molino. RS: Rio Subterraneo. (Jeffery, 2009)

Les études transcriptomiques sont aussi possibles pour identifier les gènes candidats associés aux traits cavernicoles. Par exemple, Yoshizawa et al., (2018) ont montré que des gènes associés aux désordres du spectre autistique (ASD) chez les humains ont souvent une expression différente entre poisson de surface et poissons cavernicoles. Autre exemple, Torres-Paz et al., (2019) ont montré une influence du transcriptome d'origine maternelle sur l'évolution morphologique de la région optique.

Une fois les gènes candidats identifiés, des techniques d'édition du génome sont possibles chez l'*Astyanax* pour vérifier le rôle fonctionnel de ces gènes dans l'évolution des traits cavernicoles. (Klaassen et al., 2018; Kowalko et al., 2016; Ma et al., 2015; Stahl et al., 2019). **Figure III.D.28**

L'*Astyanax* cavernicole fournit donc un remarquable exemple d'évolution associée à la colonisation d'un nouvel environnement, et permet de comprendre les bases génétiques et moléculaires de l'évolution.

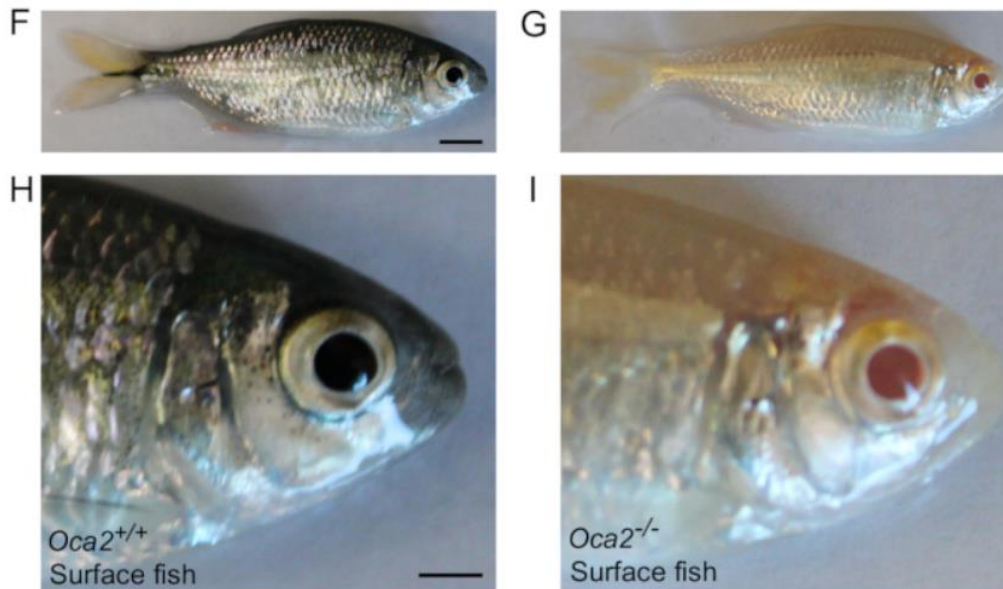


Figure III.D.28. Exemple d'inactivation de gène : vérification du rôle fonctionnel du gène *oca2*.

Edition du génome par CRISPR de *oca2* induit de l'albinisme chez les poissons de surface. (F) Images du poisson de surface sauvage et (G) du poisson de surface albinos (induit par CRISPR). Echelle = 5 mm. (H and I) Les têtes des individus sont montrées en F et G. Echelle = 2 mm. (Stahl et al., 2019)

L'*Astyanax* comme modèle d'étude de pathologies humaines :

Enfin, beaucoup de particularités du phénotype des poissons cavernicoles sont en lien avec des pathologies humaines. Les poissons cavernicoles, contrairement aux poissons de surface, ont une résistance à l'insuline (Riddle et al., 2018b), un tissu adipeux hypertrophié (Aspiras et al., 2015; Xiong et al., 2018), une dégénérescence de l'œil (Hinaux et al., 2015; Jeffery, 2009), une perte du sommeil (Duboué et al., 2011; Yoshizawa et al., 2015). Ils présentent aussi des caractéristiques comportementales communes aux troubles autistiques (Yoshizawa et al., 2018) et des défauts dans la régénération de leur cœur (Stockdale et al., 2018). Le poisson cavernicole s'avère donc un modèle de choix pour étudier nombre de pathologies humaines, comme l'obésité, le diabète, le colobome, l'insomnie, l'autisme, et les infarctus.

Article 1 « A mutation in monoamine oxidase (MAO) affects the evolution of stress behavior in the blind cavefish *Astyanax mexicanus* », soumis à J. Exp. Biol

Constance Pierre, Naomie Pradère, Cynthia Froc¹, Patricia Ornelas-Garcia², Jacques Callebert³, Sylvie Rétaux*

Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France

¹ Amatrice platform, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France

² Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México, CP 04510, Mexico City, Mexico.

³ Service Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, 75475 Paris, France

Abstract:

The neurotransmitter serotonin controls a great variety of physiological and behavioral processes. In humans, mutations affecting the monoamine oxidase or MAO, the serotonin-degrading enzyme, are highly deleterious. Yet, blind cavefish of the species *A. mexicanus* carry a partial loss-of-function mutation in MAO (P106L) and seem to thrive in their subterranean environment. Here, we established 4 fish lines, corresponding to the blind cave-dwelling and the sighted river-dwelling morphs of this species, with or without the mutation, in order to decipher the exact contribution of *mao* P106L in the evolution of cavefish neuro-behavioral traits. Unexpectedly, although *mao* P106L appeared as an excellent candidate for the genetic determinism of the loss of aggressive and schooling behaviors in cavefish, we demonstrated that it was not the case. Similarly, the anatomical variations in monoaminergic systems observed between cavefish and surface fish brains were independent from *mao* P106L, and rather due other, morph-dependent developmental processes. On the other hand, we found that *mao* P106L strongly affected anxiety-like behaviors. Cortisol measurements showed lower basal levels and an increased amplitude of stress response after a change of environment in fish carrying the mutation. Finally, we studied the distribution of the P106L *mao* allele in wild populations of cave and river *A. mexicanus*, and discovered that the mutant allele was present - and sometimes fixed - in all populations inhabiting caves of the Sierra de El Abra. The possibility that this partial loss-of-function *mao* allele evolves under a selective or a genetic drift regime in the particular cave environment is discussed.

Introduction

Monoaminergic systems control a variety of physiological functions in vertebrates, ranging from stress response (Dinan, 1996; Winberg et al., 1997) to gut motility (Bülbring and Crema, 1958; Gershon, 2013; Mawe and Hoffman, 2013), metabolic homeostasis (El-Merahbi et al., 2015), immune function (Khan and Deschaux, 1997; Nicole and Randy, 2013) or reproduction (Prasad et al., 2015). They also play roles in brain, heart, ocular and craniofacial development (Baker and Quay, 1969; Moiseiwitsch, 2000; Ori et al., 2013; Sodhi and Sanders-Bush, 2004; Souza and Tropepe, 2011). And crucially, due to their central neuromodulatory functions, they control various aspects of animal behavior: aggressiveness (Edwards and Kravitz, 1997; Nelson and Trainor, 2007; Olivier, 2004; Popova, 2006), locomotion (Beninger, 1983; Brocco et al., 2002; Gabriel et al., 2009; Pearlstein, 2013; Perrier and Cotel, 2015), sleep and arousal (Jouvet, 1999; Oikonomou et al., 2019; Scammell et al., 2017), food intake (Pérez-Maceira et al., 2016; Voigt and Fink, 2015), or olfaction (Gaudry, 2018).

Plastic changes in monoaminergic systems can occur in all animal species during acclimation to variations in the environment such as temperature, altitude, or season (e.g., Stefano and Catapane, 1977; Hernádi et al., 2008; Nakagawa et al., 2016; Vaccari et al., 1978). Evolutionary changes in monoaminergic systems are much less studied. However, inter-species and intra-species genetic variations in monoaminergic pathway genes exhibiting different behaviors have been reported (e.g., Bergey et al., 2016; Staes et al., 2019). This opens the possibility that genetically encoded, evolutionary changes in monoaminergic pathways could contribute to adaptation of species to their environment.

The fish *Astyanax mexicanus* is an excellent model to study adaptation after an environmental shift. It comes in two inter-fertile forms: sighted and pigmented morphs, which live in rivers of Northern Mexico; and blind depigmented morphs, which live in 31 caves in North-East Mexico (Elliott, 2018; Mitchell et al., 1977). Surface-like, common ancestors of the two extant morphs colonized the caves about 20.000 years ago, and have since then adapted to the total and permanent darkness of the subterranean environment (Fumey et al., 2018; Policarpo et al., 2020).

Surface fish (SF) and cavefish (CF) display many morphological, behavioral and physiological differences. Cavefish eyes degenerate during development, and their brains show multiple differences when compared to river-dwelling conspecifics (Rétaux et al., 2016). They also have more teeth and modifications of their craniofacial bones structure (Atukorala et al., 2013; Gross et al., 2014; Yamamoto et al., 2003). Cavefish are albino as they do not synthesize melanin (McCauley et al., 2004), they have a low metabolic rate (Hüppop, 1986; Moran et al., 2014; Salin et al., 2010), and an altered intestinal motility (Riddle et al., 2018a). Behavioral differences are manifold: most CF are non-aggressive (Elipot et al., 2013; Espinasa et al., 2005), they do not school (Kowalko et al., 2013b), they sleep very little (Duboué et al., 2011), and they show intense exploratory behavior (Patton et al., 2010). They are attracted to vibrations (Yoshizawa et al., 2010) and have an exceptional olfaction (Hinaux et al., 2016). This ensemble, called “cavefish behavioral syndrome”, is often considered as adaptive for cave life.

At the molecular level, cavefish originating from the Pachón cave carry a point mutation in the gene for Monoamine Oxidase (*mao*; P106L), the serotonin and catecholamine degrading enzyme (Elipot et al., 2014a). P106L decreases MAO enzymatic activity, which results in enhanced monoamine levels in the CF brain – note that fish possess only one form of MAO, contrarily to mammals. Because of the many roles of monoaminergic systems in development, physiology and behavior, the P106L *mao* mutation could be responsible for some of the cavefish special traits.

Here, we have systematically analyzed the phenotypic effects of the P106L *mao* mutation at the neuroanatomical, behavioral and physiological levels. We have also studied the distribution and the evolutionary history of the P106L mutation, in order to discuss its adaptive nature and its impact on cavefish evolution.

Methods

Fish husbandry: Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish (origin: Texas) and cavefish (Pachón population) were obtained in 2004–2006 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD, USA and were since then bred in our local facility (Gif sur Yvette, France). Fishes were maintained at 23–26°C on 12:12-h light: dark cycle and they were fed twice a day with dry food. The fry were raised in Petri dishes and fed with micro-worms after opening of the mouth. Animals were treated according to the French and European regulations for handling of animals in research. SR's authorization for use of *Astyanax mexicanus* in research is 91-116 and the Paris Centre-Sud Ethic Committee protocol authorization number related to this work is 2017-05#8604. The animal facility of the Institute received authorization 91272105 from the Veterinary Services of Essonne, France, in 2015.

Wild fish samples: Our fin clips collection from wild cavefish and surface fish populations (exact locations available on request) were obtained during field sampling campaigns between 2013 and 2019, under the auspices of the field permits 02241/13, 02438/16, 05389/17 and 1893/19 delivered by the Mexican Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales to POG and SR. To obtain a fin-clip, a small part of the caudal fin (approx. 3-4mm²) was cut with a razor blade. The individual fin clips were stored in tubes in 100% ethanol.

Fish lines: To obtain the Pachón CF without the P106L mutation, we crossed heterozygotes fish identified among our lab Pachón breeding colony (Fig. 1A), taking advantage that the P106L mutation is not fixed in the Pachón population. To obtain a SF line carrying the mutation, a cross between a SF (wild type *mao*) and a CF carrying the P106L (homozygote mutant) was followed by 4 backcrosses with SF (Fig. 1B). At each generation, we selected fish carrying the P106L mutation (heterozygotes) and backcrossed them with SF to dilute the cave genome little by little. Then, to obtain SF homozygote mutants, we intercrossed the last generation together. Theoretically, after 5 generations, the percentage of cave genome is 3.13%. Note that the generation time between the spawn of the *n* generation and the spawn of the *n*+1 generation was about 8 months.

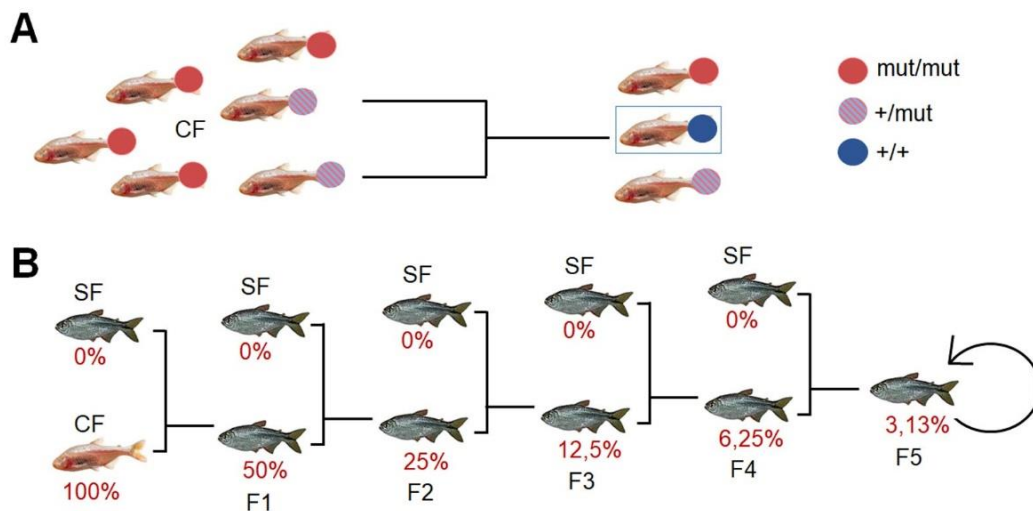


Fig 1

Figure 1. Generation of genetic lines by crosses.

(A) Generation of cavefish (CF) without the P106L *mao* mutation by crosses of heterozygotes. The dots on fishes indicate their genotype: mutant (mut/mut; red), non-mutant (+/+; blue) or heterozygote (+/mut; striped). (B) Generation of surface fish (SF) with the P106L *mao* mutation by backcrosses. The percentage in red means the theoretical percentage of cavefish genome at each generation (F).

***mao* P106L allele genotyping:** Wild fin-clips preserved in 100% ethanol and lab fin clips were genotyped as follows. We performed a crude lysis with proteinase K in lysis buffer (100mM Tris; 2mM EDTA; 0.2% Triton; 0.01µg/µl PK), followed by PCR and a purification of DNA (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up). For *mao* gene: primer F-GGGAAATCATATCCATTCAAGGGG; primer R-CTCCATGCCATCTTGCCATAG, see (Elipot et al., 2014a). For *mc4r* gene: F- ATGAACATATCGCAGCACCA; R-TCACACACAATCAGAAGAAAGC, see (Aspiras et al., 2015). We used the sequencing service of Eurofins Genomics (<https://www.eurofinsgenomics.eu/>). Homozygotes and heterozygotes at position 106 were easily detected and identified on sequence chromatograms (see Fig. 2B; the reverse sequences are shown).

***mao* genomic fragment sequencing:** A fragment spanning 3838bp on the *mao* gene was sequenced in 110 wild-sampled individuals originating from different caves and surface rivers. The fragment includes the exons n°4 (where the P106L mutation is located), 5, and 6, and is comprised between the positions NC_035915.1:32708790 and NC_035915.1:32713975. This fragment was subdivided in 4 smaller fragments, which were easier to sequence. The primers used were: Fw1-TTGTGCCTCTGTGGTGATGA, Rv1-AGTGCCGGAACCTAAAGGA; Fw2-AGCTCGCTAGCTAAATGTGTGA, Rv2-GAAGAATGCTTGCTGGAGCTG; Fw3-TCTCATCTGCTTGTGATGGCT, Rv3-TCCCCTAGGAGCAACGAAAC; Fw4-TTTTATGGTGGCATGCAGAAGTG, Rv4-ATGATACTGCAAGCGAAGCC. Primers were designed with the primer-designing tool of NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). We used the sequencing service of Eurofins Genomics.

Immunofluorescence, immunohistochemistry and imaging: 6dpf larvae were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline, gradually dehydrated in ethanol, and permeabilized 30min in EtOH: Xylen 1:1 at RT, then 10min in EtOH; acetone 1:2 at -20°C. The samples were rehydrated in phosphate-buffered saline and 1% tween (PBST). In addition to that, for immunohistochemistry, samples were incubated in PBST with 6% H₂O₂, 30min at RT. Next, the inferior jaw of the larvae were removed to make the ventral brain more accessible to antibodies. The samples were incubated in blocking buffer (10% sheep serum, 1% triton, 1% tween 20, 1% DMSO, 1% BSA in PBST) for 2h, then incubated with the primary antibody (rat anti-serotonin, Chemicon MAB352, 5/1000; rabbit anti-tyrosine hydroxylase, Sigma Aldrich SAB2701683, 2/1000) in buffer (1% sheep serum, 1%triton, 1%DMSO, 1%BSA in PBST) for 3 days, followed by the secondary antibodies (biotinylated goat anti-rat antibody, Jackson 112-066-072, 1/500; goat anti-rabbit Alexa fluor 635, Life technologies A31577, 1/500) and DAPI (4/1000) for immunofluorescence. For immunohistochemistry, revelation was performed using an avidin/biotin complex coupled with peroxidase (ABC kit, Universal Vectastain Kit PK6200) and diaminobenzidine (Sigma Aldrich).

Brains were dissected by removing the palate and mounted in Vectashield (Vector Laboratories) and glycerol for immunofluorescence and immunohistochemistry, respectively. Images were taken on a Leica confocal Sp8 and a macrozoom Nikon AZ100 for immunofluorescence and immunohistochemistry, respectively. Images were corrected for brightness and contrast in ImageJ or Photoshop but no other corrections were made.

Behavioral analyses:

Aggressiveness: These experiments were performed on 3mpf (months post-fertilization) wildtype SF, mutant homozygotes SF, their non-mutant and heterozygotes siblings, and CF, both mutant homozygotes, non-mutant and heterozygotes. Three months-old fish were used in a resident-intruder test, as in Elipot et al., 2013. Fish were placed individually in tanks (12x9cm) with 200ml of water for the night. In the morning, intruders were transferred in tanks of residents, and a video of 1h was recorded. Attacks between the two fish were counted manually using the software ODREC (Observational Data Recorder; <https://sourceforge.net/projects/odrec/>).

Shoaling: The experiments were performed on wildtype SF, mutant homozygotes SF, their non-mutant and heterozygotes siblings, and CF, both mutant homozygotes, non-mutant and heterozygotes, of several ages. Groups of 6 fish were put in tanks of 25x18cm (1.2l) for 2months-old fishes, and 40x23cm (3.6l) for 5months-old fishes. Tanks were placed on an infrared floor. A video of 10min was recorded after 10min of habituation, and the inter-individual distances (IID) and nearest-neighbor distances (NND) were calculated with the ViewPoint software (<http://www.viewpoint.fr/en/home>). NND and IID were calculated from 10min recordings. IID and NND were simulated for a random distribution of the fish with a program writer under Scilab 5.5.2 (<https://www.scilab.org/>) (ran on graphs; black bars). Values of NND and IID for a random distribution of fish were calculated with 100.000 positioning simulations of 6 points (=fishes) in a square of the dimensions of the

real tank. Of note, here we used the term “shoaling” (as opposed to “schooling”) because we did not measure angles between fish.

Locomotion: For larval stages, the experiments were performed on wildtype SF and CF, both mutants and non-mutants. For 2 and 5 month-old fish, the experiments were performed on wildtype SF, mutant homozygotes SF, their non-mutant and heterozygotes siblings, and on CF, both mutant homozygotes, non-mutant and heterozygotes. 6dpf larvae were placed individually in 24-wells plates, 2 months-old fish in 12x9cm tanks (200ml), and 5 months-old in 19x10cm (600ml). Tanks were placed on an infrared emitting floor. Videos were recorded with an infrared detecting camera placed above the tanks, after 10, 30min, 1h or 24h of habituation, depending on the experiment. For the measure of locomotion in groups, groups of six 5months-old fish were placed in tanks of 40x23cm (5l) on infrared emitting floors, with a 12:12h light:dark cycle. Videos of 10min were recorded and locomotion was measured with ViewPoint software (<http://www.viewpoint.fr/en/home>).

Food intake: 1 year-old fish were placed individually in tanks (25x11x10cm) for 5 days with no food available. The 4th day, they were weighted. The 5th day, food was added in tanks, and the fish were weighted 1h after feeding. The same protocol was used to measure food intake in groups, except that the fish were in groups of 20, and in their home tank at the fish facility.

Anxiety behaviors: The same protocol as for the recording of locomotion was used, on 5 month-old fish, alone in their tank. The different stress behaviors were analyzed manually with ODREC. Freezing: the fish is immobile, paralyzed, and sometimes loses equilibrium and stays on the side. Thigmotaxis: fast swimming, head against the wall of the tank. Erratic movements: the fish swims very fast, and frequently changes of direction, with angles of 90°. Attempts to dive: the fish swims vertically with frenzy, head against the bottom of the tank, sometimes moving horizontally along the tank, sometimes not. Freezing, thigmotaxis and erratic movements are described and widely used to measure anxiety in other fish (Blaser and Gerlai, 2006; Blaser et al., 2010; Cachat et al., 2010; Champagne et al., 2010; Maximino et al., 2010; Schnörr et al., 2012). Although bottom dwelling was described as an anxiety behavior (Cachat et al., 2010; Chin et al., 2018; Egan et al., 2009; Levin et al., 2007), to our knowledge attempts to dive were not, and could actually correspond to a form of thigmotaxis as they represent efforts to escape by the bottom of the tank. Freezing, thigmotaxis, erratic movements and attempts to dive were measured on wildtype SF, homozygote mutant SF and their non-mutant siblings. Only thigmotaxis was measured in CF, both mutants or non-mutants, as CF do not express other stress behaviors.

Cortisol and monoamine levels: Monoamines were measured in wildtype SF, and mutant and non-mutant CF. Cortisol was measured on homozygotes mutants, heterozygotes and non-mutant SF (siblings), as well as in mutant and non-mutant CF, and in different contexts.

6 dpf larvae were immersed in water at 1°C. The heads were immediately cut and recovered to measure noradrenalin, and the bodies were recovered to measure noradrenalin and adrenalin. A sample (n=1) was formed with 15 heads or 15 bodies, in 400µl of HCl (10⁻³M).

Adults were placed by 4-6 in tanks (fish facility home tanks for several weeks, novel tank for 10min or 24h). They were quickly immersed in water at 1°C, and immediately frozen to avoid losing blood during dissection. The head was immediately cut and the brain dissected out and placed in 400µl of HCl (10⁻³M) to measure monoamines, while the body (with gills) was placed in 1ml of HCl (10⁻³M) to measure cortisol. Samples were stored at -80°C.

High-performance liquid chromatography assays were performed on fresh tissue, as previously described (Gamache et al., 1993; Kema et al., 1993). Before analysis, the brains were homogenized at 10.000 rpm in 500 µL of HCl 0.001 N containing ascorbic acid and EDTA (10 µmol/L), using Ultra-Turrax T8® (IKA Labortechnik, Netherlands). Homogenates were then centrifuged at 22.000g for 20 min at 5 °C. The supernatants were collected and filtered through a 10-kDa membrane (Nanosep, Pall, NY, USA) by centrifugation at 7000g. A 20µl aliquot of sample was analyzed for serotonin by fluorometric detection (Kema et al., 1993). The concentrations of dopamine, norepinephrine, and metabolites [3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)] were measured by electrochemical detection on a serial array of coulometric flow-through graphite electrodes (CoulArray, ESA, France) (Gamache et al., 1993). Cortisol was analyzed by immune-chemo-luminescence (kit Cortisol 8D15 840607/R4; Abbott Alinity, Illinois, USA).

Cardiac rhythm: The experiments were performed on homozygote mutant, heterozygote and non-mutant SF (siblings), and on mutant and non-mutant CF. 8dpf larvae were anesthetized in a 140ppm tricaine solution, and the cardiac beats were counted manually under a binocular microscope. We cannot rule out that tricaine had a

bradycardic effect. However, if any, the effect was the same on all fish lines. Of note, the concentration of tricaine used here was low and this method was preferred to, e.g., low temperature, which had a clear and immediate effect on cardiac frequency.

Statistical analyses: No statistical method was used to predetermine sample size. No data were excluded from analysis, and sample allocation was random after genotyping. Sex was not considered in the analyses as it is impossible to determine sex in *Astyanax mexicanus* before the age of 6-7 months without dissection/sacrifice. Analyses (except automated analyses by Viewpoint software) could not be blinded: for anatomical analyses, brains from SF or CF are easily recognizable by eye size, and for behavioral analyses, the investigator can also easily recognize the morphs on the videos. All experiments (except anatomy for mutant SF and their siblings in Fig. 3 and feeding assay in group in Fig. 6) were reproduced at least twice (=technical replicates), and the results were pooled (=biological replicates, corresponds to the n values indicated on graphs). All graphs show mean±sem, and the number of samples included is systematically indicated on graph bars.

Statistical analyses (except for 2- and 3-way ANOVA below) were performed with BiostaTGV, using R (<https://biostatgv.sentiweb.fr/>). All data were analyzed in appropriate pair-wise comparisons using non-parametric Mann-Whitney tests (normal distribution was not tested). P values are shown in figures, with *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$ and * $p < 0.01$. Further, more detailed statistical analyses were carried out for Fig. 7 to account for the effect of time and its potential interactions with the genotype and morphotype of the fish.

For Fig. 7A, Man-Whitney pairwise comparisons were completed by a Kruskal-Wallis analysis, accounting for all comparisons of independent means across morph and genotypes.

For Fig. 7B, in order to test for a variation of stress behavior along habituation time, Friedman tests were performed for each SF genotype (repeated measures: the same fish were tested at 10min, 24h and 96h). In addition, a 2-way ANOVA with repeated measures was performed to account for the time (i.e. 10min, 24h, 96h) and the genotype (wildtype or mutant) of the three SF groups repeatedly assayed. Tukey's multiple comparisons tests were performed to highlight significant differences.

For Figure 7C, a 3-way ANOVA was performed to account for the 3 investigated factors, i.e. genotypes, morphotypes and contexts (time spent in a familiar or novel tank), prior examining significant differences between each independent cortisol sample using a Holm-Sidak's multiple comparisons test (Graph Pad Prism). A one-way ANOVA was also performed to test for variations along time for each type of sample. Exhaustive summary statistics for Fig. 7 are given in Fig. Supp 7.

Results

Distribution of *mao* alleles in wild *A. mexicanus* populations

To estimate the spread of *mao* P106L in natural populations, and its potential relevance to cave adaptation, we analyzed fin clips sampled during field expeditions. We genotyped 232 cavefish from 11 caves, and 425 surface fish from several rivers in the region of Ciudad Valles, SLP, México (Fig. 2). Caves are subdivided into 3 geographical groups: Micos, Guatemala and El Abra, in which the different CF populations probably derive from independent colonization events (Bradic et al., 2012). The P106L *mao* mutant allele was present in high proportions in all sampled caves of the El Abra group (from North to South: Pachón, Tinaja, Los Sabinos, Curva, Toro and Chica), but not the Micos and Guatemala groups (Fig. 2A). Whereas the wildtype allele was recovered in Pachón, Tinaja, Toro and Chica, all fish sampled in Curva (n=23) and Los Sabinos (n=33) were homozygous mutants. This suggested that the mutation has reached fixation in these 2 caves.

Conversely, the P106L mutation was never found in the 425 genotyped SF (=850 alleles). Noteworthy, in *mao* exon 4 which contains the P106L mutation and in exons 5/6 which were also amplified, we identified a synonymous (not shown) and a non-synonymous mutation at position 107 (M107I), adjacent to P106L (Fig. 2B). This indicated the presence of polymorphisms in *mao* in natural river populations of *A. mexicanus* (see also Suppl Fig. 6 and Discussion). Thus, the P106L mutation is either absent from the SF populations, or present at a very low frequency.

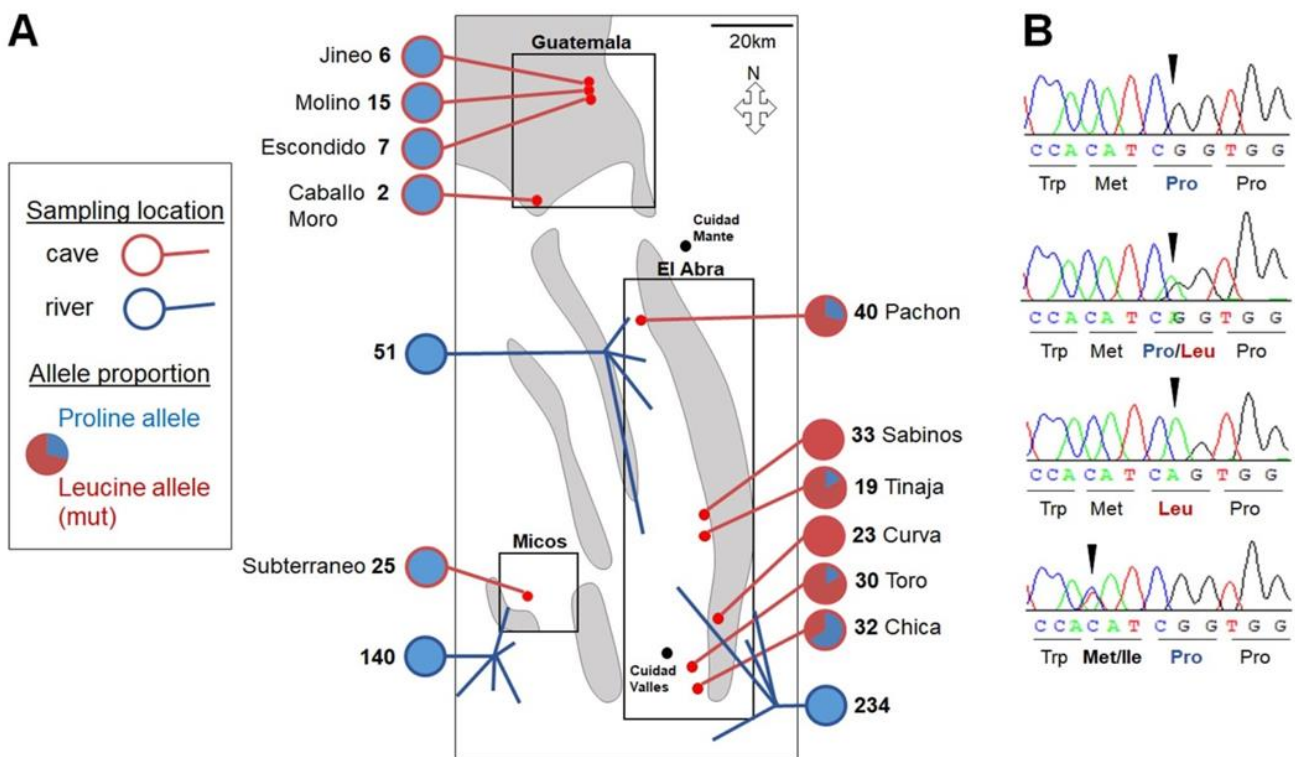


Fig 2

Figure 2. Distribution of *mao* alleles in the wild.

(A) Proportion of mutant alleles for 11 caves (red edges) and 3 zones of sampling in surface (13 locations, blue edges). The number of fish sampled is indicated. (B) Sequence chromatograms centered on MAO amino acid 106. From top to bottom: a non-mutant CF, a heterozygote, a mutant homozygote, and last, a SF with heterozygous M107I mutation.

To study the phenotypic effects of the P106L *mao* mutation, below we systematically compared 4 lines of fish: SF and Pachón CF, wild type or mutant/P106L. To generate these lines, we took advantage of the presence of heterozygous individuals in our Pachón CF laboratory colony: Pachón CF without the mutation were obtained by crosses between 2 heterozygotes (Fig. 1A), and SF carrying the mutation were obtained by successive backcrosses (Fig. 1B and Methods).

mao P106L does not affect the neuroanatomy of monoaminergic systems

The P106L mutation decreases MAO enzymatic activity, resulting in an increase of monoamine levels in brain and body (Elipot et al., 2014; Pierre et al., in prep). As serotonin can modulate neurogenesis and differentiation of the serotonergic system and its targets (Lauder, 1993; Pérez et al., 2013; Urtikova et al., 2009; Vitalis et al., 2013; Whitaker-azmitia et al., 1996), we asked if *mao* P106L could be responsible for anatomical variations reported in the serotonergic system between the two *Astyanax* morphs (Elipot et al., 2013). We also analyzed catecholaminergic neurons, because links between the different monoaminergic systems are reported (Di Giovanni et al., 2008; Di Giovanni et al., 2010). Neurons were labelled using immunohistochemistry against 5-HT (serotonin) and TH (tyrosine hydroxylase), respectively, on 6dpf larvae of the 4 different lines.

The fish serotonergic system is composed of 3 clusters of neurons in the hypothalamus plus the rhombencephalic raphe. In agreement with previous studies (Elipot et al., 2013), the size of the PVa (anterior paraventricular nucleus) was larger in CF than in SF (Fig. 3A-D, M). Here, we found that the PVi (intermediate nucleus) was also larger in CF. However, the sizes of these 5-HT clusters were similar in P106L mutants (SF or CF) and their non-mutant counterparts. This showed that the P106L mutation does not modify the size of 5-HT clusters (a proxy of neuron numbers).

The fish dopaminergic system is more diffuse and organized in many discrete clusters showing different cell shapes and labelling intensities (Rink and Wullimann, 2002) (Fig. 3E-K). We counted neuron numbers in some of them. For some clusters like the anterior preoptic parvocellular group, the number of cells was the same for all 4 studied lines. For some others like the posterior tuberal nucleus, CF possessed more cells than SF (Fig. 3N). However, similarly to the 5-HT system, we could not detect any influence of the P106L mutation on the number of cells or the organization of the dopaminergic and noradrenergic systems (Fig. 3N; Fig. Supp. 1).

Overall, these data suggested that the differences observed between SF and Pachón CF in serotonin PVa and PVi sizes, or else in posterior tuberculum and telencephalic dopaminergic cell numbers were not due to *mao* P106L but rather to other, morph-dependent developmental factor(s).

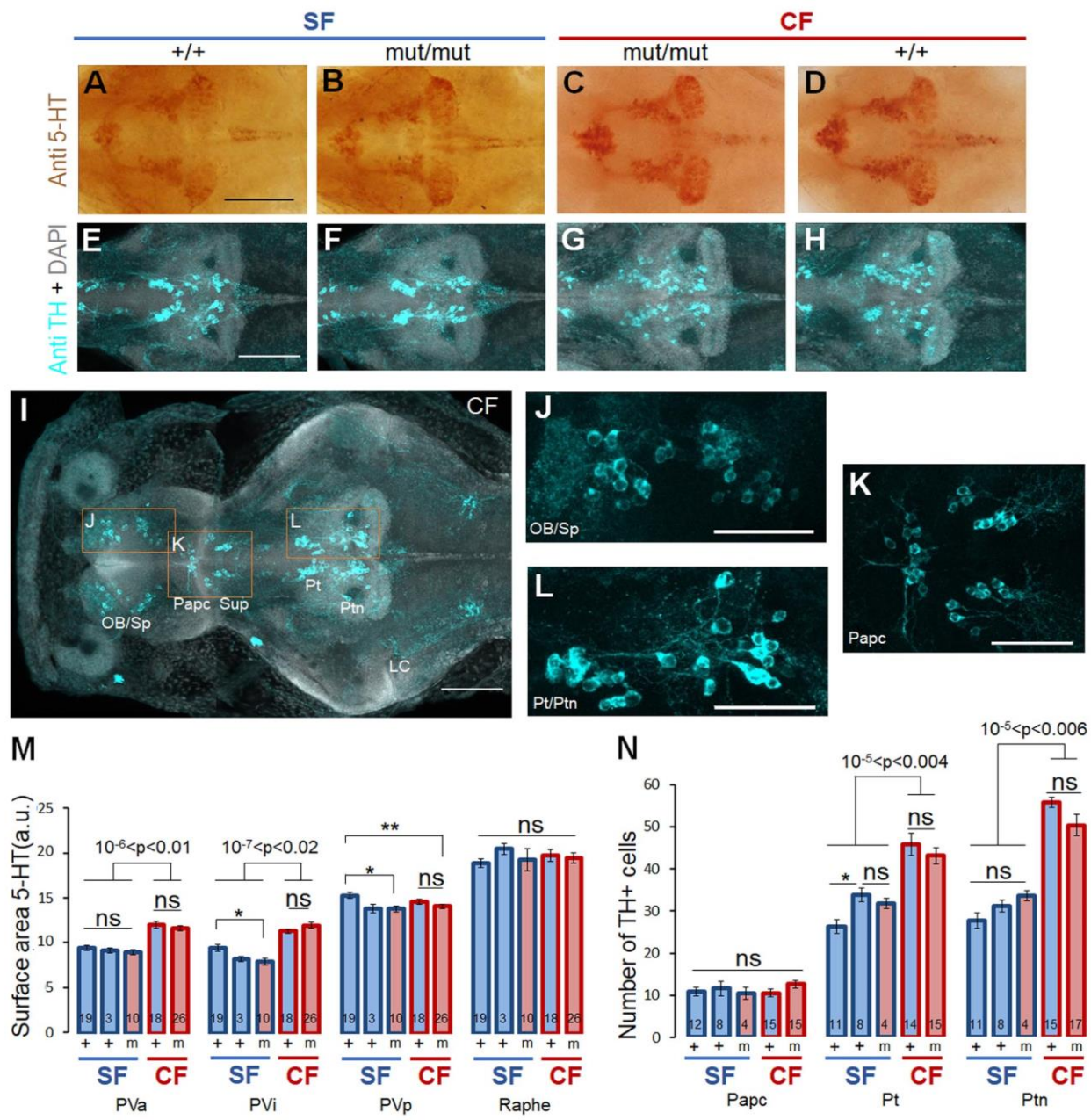


Fig3

Figure 3. 5-HT and DA systems in 6dpf larvae.

(A-H) Immunohistochemistry for 5-HT (A-D) and immunofluorescence for TH (E-H) in brains of the 4 lines. (I) Image of a CF whole-brain, showing a general view of TH-positive cells. Scale-bars: 100µm. (J-L) High magnification views of TH-positive clusters of olfactory bulb and subpallium (OB/Sp), preoptic anterior parvocellular (Papc) and suprachiasmatic (Sup) clusters, and posterior tuberculum (Pt) and posterior tuberal nucleus (Ptn). Scale-bars: 50µm. LC: Locus coeruleus. (M) Size of 5-HT clusters, for the indicated genotypes. PVa/i/p stands for anterior/intermediate/posterior paraventricular nucleus. (N) Number of TH-positive cells in Papc, Pt and Ptn. Non-mutant SF (+) shown are either wildtype (first bar of each series), or mutants siblings (second bar).

The *mao* P106L mutation and the cavefish “behavioral syndrome”

A major difficulty inherent to studies comparing behaviors in the two *Astyanax* morphs is to disentangle the contribution of blindness and genetics for the expression and evolution of CF behavioral traits. Indeed, numerous behaviors are visually-driven. Below, using the powerful approach allowed by the comparison of the effects of the P106L mutation in the 4 generated lines, we could bring definitive answers to some long-standing questions.

Previous studies had shown that deprenyl, a selective MAO inhibitor, decreases aggression and schooling in SF (Elipot et al., 2013; Kowalko et al., 2013b). As these behaviors are typically lost in CF, we first tested the possibility that *mao* P106L could be responsible for their evolution.

Aggressiveness was assessed using a resident-intruder test, by counting the number of attacks performed between 2 individuals in 1hour. As described, SF were way more aggressive than Pachón CF (Fig. 4A) (Elipot et al., 2013). However, there was no difference in aggressiveness between mutated and non-mutated SF, nor between mutated or non-mutated CF. We concluded that *mao* P106L has no influence on the evolution of aggressive behavior in *Astyanax*.

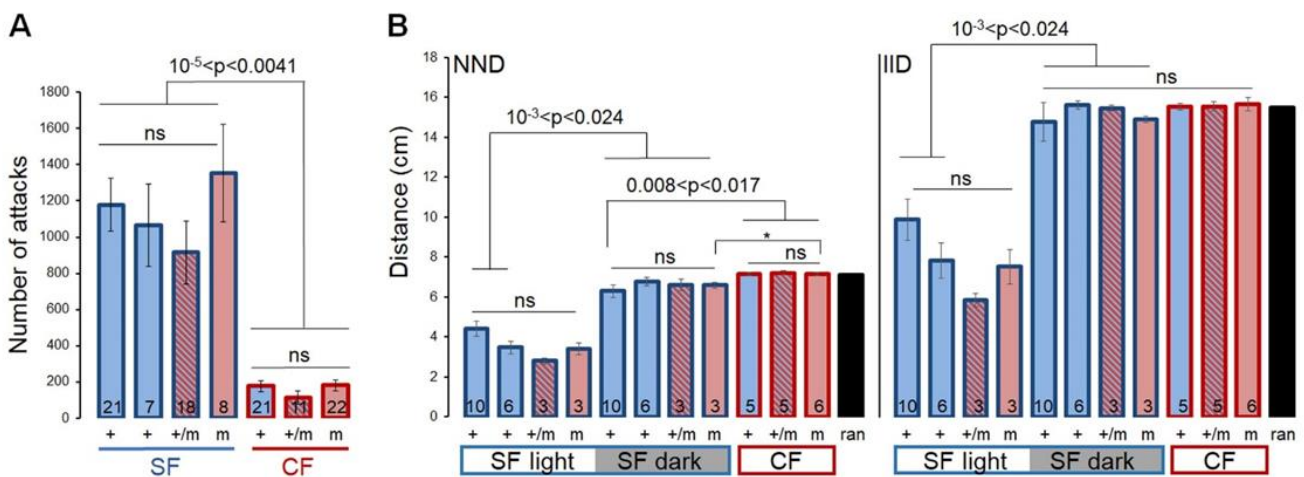


Fig4

Figure 4. Aggression and schooling.

(A) Number of attacks counted during 1h for fish of the indicated genotypes. Non-mutant SF (+) tested are either wildtype (first bar of each series), or mutants siblings (second bar). (B) Nearest-neighbor distance (NND) and inter-individual distances (IID) in groups of fish, measured in the light (SF and CF) or in the dark for SF. N=1 corresponds to a group of 6 fish of same morphotype and genotype.

Similarly, we analyzed shoaling by measuring inter-individual and nearest-neighbor distances (IID/NND) in groups of 6 fish (Fig. 4B). As reported (Kowalko et al., 2013b), in SF IID and NND in the light were shorter than in the dark. In the dark, values were identical to those obtained by simulation of a random distribution of the fish (black bars, Fig. 4B). Thus, SF shoal in the light and light is required for shoaling. This behavioral pattern was markedly different when SF groups were habituated in their tanks for a few days (Fig. Supp. 2): there, SF decreased shoaling in the light and reached IID values similar to CF or random fish distribution; and their mean IID at night was even greater, suggesting that they voluntarily moved away from each other.

For CF in contrast, IID and NND were alike those obtained with a random fish distribution, showing that they do not shoal. Finally, regarding *mao* genotypes, SF with or without P106L, and CF with or without P106L were indistinguishable, both in the light and the dark, both without or with habituation (Fig. 4B and Fig. Supp. 2). Therefore, *mao* P106L has no influence on the evolution of shoaling in *Astyanax*.

Next, we studied locomotion, a “simple” trait. At 6dpf, CF larvae were more active than SF larvae, but again there was no influence of the P106L mutation on the distance swam (Fig. 5A).

For older fish aged 2 or 5 months, CF were still more active than SF (Fig. 5B). The distance travelled by mutant SF was similar to wildtype siblings. However, in CF at these older ages, an effect of the mutation progressively emerged, with mutant CF being more active than CF carrying the wildtype *mao* allele. Thus, the P106L mutation specifically enhanced locomotion in adult CF, but not in SF.

The locomotion recordings above were performed after 1h of habituation, as commonly done in zebrafish assays. Yet, we noticed that CF placed in a novel tank for locomotion assay displayed strong thigmotaxis and frenetic swimming (Fig. 5C), i.e., behaviors described as anxiety-related behaviors in zebrafish (Blaser and Gerlai, 2006; Maximino et al., 2010; Schnörr et al., 2012). This occurred immediately after transfer into the test tank and continued after 1hour (Fig. 5C), suggesting that CF were still stressed by the novel environment. Moreover, SF also still displayed anxiety behaviors such as freezing 1hour after transfer in a novel tank (not shown). We concluded that a 1-hour habituation period was insufficient to quantify accurately locomotion, without being parasitized by stress behaviors. Also, as SF are social animals as shown by schooling, being alone in a tank certainly could be stressful.

To circumvent these biases, we studied locomotion in groups and analyzed the time-course of activity during 5 days (Fig. 5D). Strikingly, CF were initially more active than SF, but progressively decreased locomotion and reached SF levels after 60 hours. Moreover, after 3 days of habituation there was no more influence of the morphotype nor of the P106L mutation on the activity level. These data suggested that *mao* P106L increased locomotion only if the fish was alone and in a novel tank.

Finally, since serotonin plays a role in the control of food intake (Pérez-Maceira et al., 2016; Voigt and Fink, 2015) we quantified food intake in CF, alone or in groups (Fig. 6A). Alone, P106L mutant CF ate twice less food than non-mutant. Heterozygotes were intermediate. In groups, fish with either *mao* genotypes ate more than when they were alone, and there was no more influence of *mao* P106L on food intake. Thus, similarly to locomotion, *mao* P106L affected food intake only when fish were alone.

A mutation in the *mc4r* gene, which causes hyperphagy in CF, has been described (Aspiras et al., 2015). This mutation is not fixed in the Pachón population, so we genotyped the individuals used in our food intake assays. All the Pachón fish used carried the same *mc4r* allele, the mutant one (Fig. 6B). Thus, the differences in food intake reported above cannot be due to melanocortin signaling, and are specific to *mao* P106L mutation.

Taken together, these data suggested that *mao* P106L was not responsible for the evolution of aggressive or social behaviors it was previously suspected to control. Importantly, for other traits such as locomotion and feeding, the effects of P106L strongly depended on the context (habituation time, group size), suggesting that these behavioral phenotypes were rather read-outs of another parameter, such as stress or anxiety.

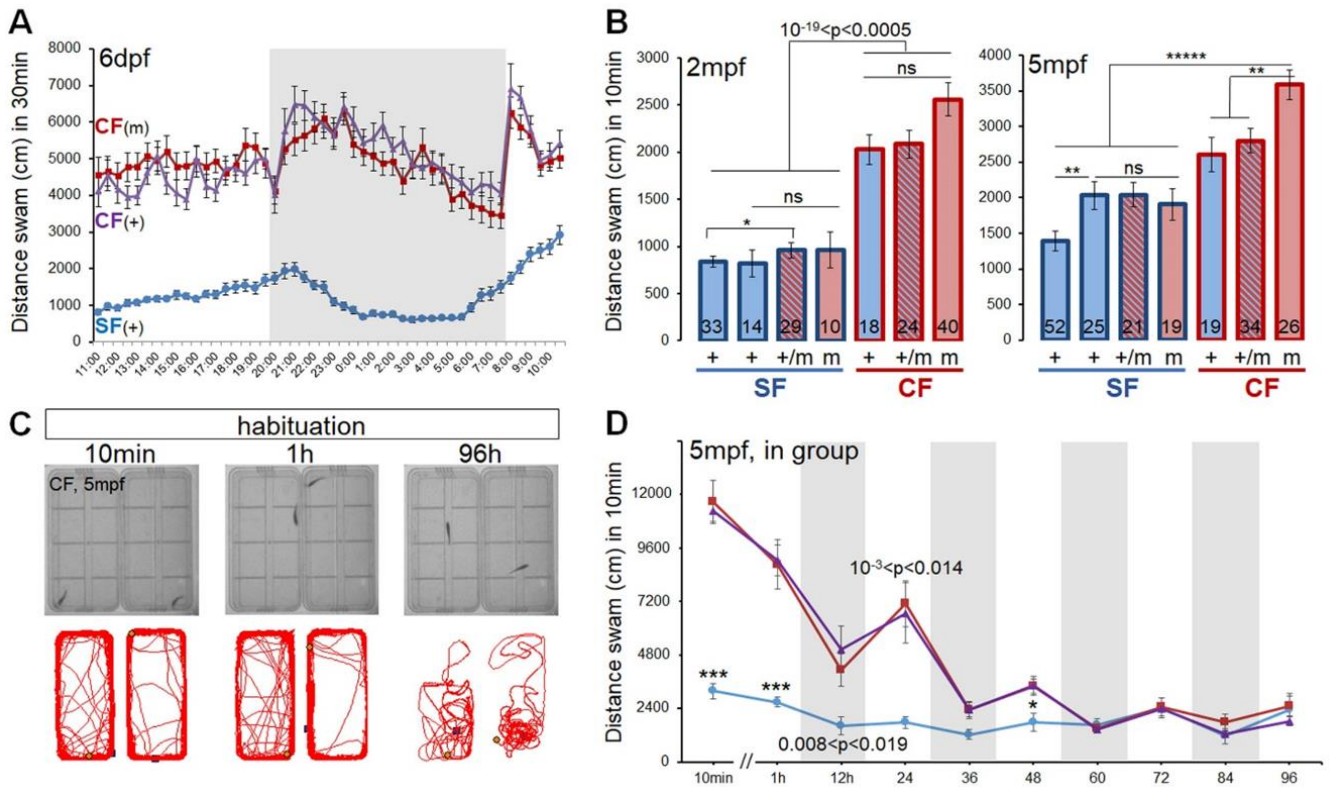


Figure 5. Locomotion.

(A) Distance travelled by 6dpf larvae in SF (blue; n=46), P106L mutants CF (red; n=30) and non-mutant CF (purple; n=26) during 30min recordings. (B) Distance travelled during 10min recordings by 2 or 5 month-old fish, 1h after the beginning of the experiment. The fish lines are indicated. Non-mutant SF (+) tested are either wildtype (first bar), or mutants siblings (second bar). (C) Screen-shots of 5 month-old CF in the test tank and their trajectories during 10min periods, at 10min, 1h and 96h after the beginning of the experiment. (D) Distance travelled during 10min recordings for groups of six 5 month-old fish, during 5 days. Fish tested are SF (blue; n=5), P106L mutant CF (red; n=10), and non-mutant CF (purple; n=12).

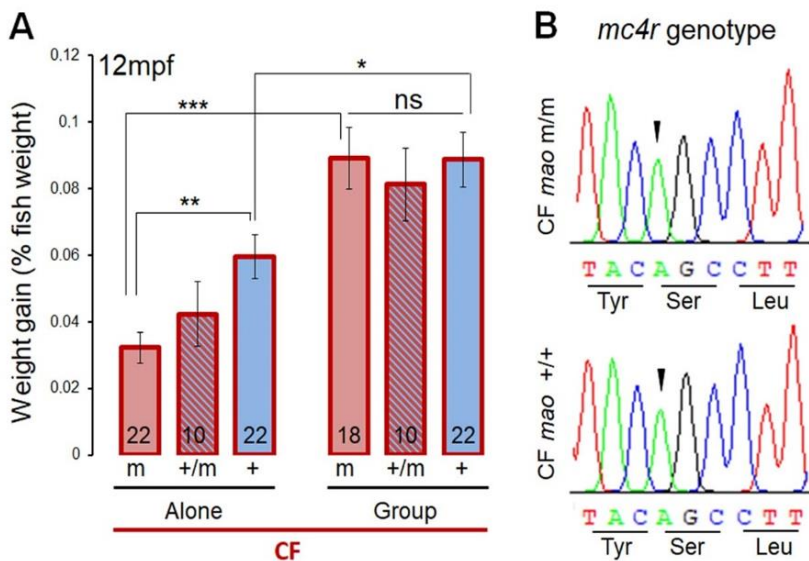


Figure 6. Food intake in CF and *mc4r* genotype.

(A) Weight gain in 1-year old CF, either alone with 5 days of habituation, or in groups in their facility home tank. The same fish (genotypes indicated) were tested in the 2 conditions. (B) Sequence chromatograms centered on the Gly-to-Ser *mc4r* mutation of a P106L *mao* mutant CF (top), and a non-mutant CF (bottom). Both carry the homozygous *mc4r* mutation.

Fig 6

Effects of the *mao* P106L mutation on stress behaviors and stress hormones

We measured adrenalin (Adre) and noradrenalin (NA) levels in 6dpf larvae. Mutants CF had elevated levels of NA in heads (Fig. 7A) and bodies (not shown), and elevated levels of Adre in bodies (Fig. 7A). Importantly, the Adre and NA levels were identical in SF and non-mutant CF, demonstrating that *mao* P106L alone was fully responsible for increased levels of the two “stress catecholamines” in mutant CF.

Altogether, the above data suggested that *mao* P106L could increase fish anxiety. To test this hypothesis, we quantified stereotyped stress behaviors 10min, 24h and 96h after fish were placed alone in a novel tank. For SF, we quantified 4 behaviors: freezing, thigmotaxis, erratic movements, and attempts to dive (Methods).

A first observation was that SF had individual preferences for the expression of stress behaviors: some fish almost exclusively displayed freezing, while some others only showed thigmotaxis, and this preference could vary along time (Fig. Supp. 4A-B). Therefore, it was impossible to compare anxiety by quantifying specific stress behaviors independently. Instead, we considered the total time spent showing at least one of the 4 stress behaviors (Fig. 7B). At 10min after the beginning of the test, mutant and wildtype SF spent equivalent time exhibiting stress behaviors. After 24h and 96h of habituation, mutant SF spent much more time exhibiting stress behavior than siblings and wildtype SF. The time-course of response to stress was different as a function of the genotype (2-way ANOVA-RM: $F_{(1,898,45,54)}=12.38$, $p<0.0001$ for time; $F_{(2,24)}=29.41$, $p<0.0001$ for genotype). We concluded that the P106L *mao* mutation increased anxiety in SF.

On the other hand, measures of the time performing thigmotaxis in CF (the only stress behavior expressed by cave morphs among the 4 defined above) did not show any difference between mutant and non-mutant fish (Fig. Supp. 3; Video Supp. 1-3).

To bring final support to the involvement of *mao* P106L in the evolution of anxiety behaviors in *Astyanax*, we measured cortisol levels, a reliable stress indicator, in the 4 fish lines. We measured cortisol 10min and 24h after fish were placed in a novel tank, as well as in their facility home tanks (Fig. 7C). In their home tanks, P106L mutant CF had less cortisol than non-mutant CF ($p=0.036$, Mann-Whitney test). The same tendency was observed for SF ($p=0.063$). Thus, the P106L mutation seemed to reduce basal cortisol levels in a familiar tank. After 10min in a novel tank, cortisol increased for all the lines, as expected. For both morphs, the *mao* mutants showed cortisol increases that were about twice higher than their non-mutant counterparts (Fig. 7C). SF heterozygotes were intermediate. This demonstrated that the P106L mutation potentiates the stress reaction in response to a change of environment. Finally, after 24h in a novel tank, cortisol levels were back to initial levels for non-mutant CF, but not for mutant CF and for the 3 genotypes in SF. Moreover, mutant SF still had slightly higher cortisol level than wildtype SF ($p=0.057$, Mann-Whitney). Altogether, this suggested that the mutation still influenced cortisol/stress after 24h in a novel tank: P106L mutants needed a longer time to habituate. Finally and regarding the SF/CF comparison, we found that CF cortisol levels went back to baseline quicker than SF. A 3-way ANOVA revealed that context/habituation represented the main source of variation (46%) and showed overall significant interactions between the 3 parameters, i.e. morphotype, genotype and habituation ($F_{(2, 65)}=3.145$; $P=0.0497$) as well as between dual combination of parameters (morph x genotype: $F_{(1,65)}=6.972$, $P=0.0104$; genotype x habituation: $F_{(2,65)}=49.90$, $P<0.0001$; morph x habituation: $F_{(2,65)}=4.033$, $P=0.0223$). Thus, we have uncovered an interaction between the P106L *mao* mutation, which confers stressability in *Astyanax*, and a morph-dependent variable, which increases the time of recovery to baseline in SF.

In parallel to cortisol, we also measured monoamine levels (Fig. Supp. 5). Ten minutes after stress a 2-fold variation of brain NA and 5-HT levels occurred for mutant fish but not for wildtype ones, and in both morphs, further supporting an involvement of these monoamines in stress response.

Altogether, these results showed that the P106L *mao* mutation increases anxiety in a novel environment in *Astyanax*.

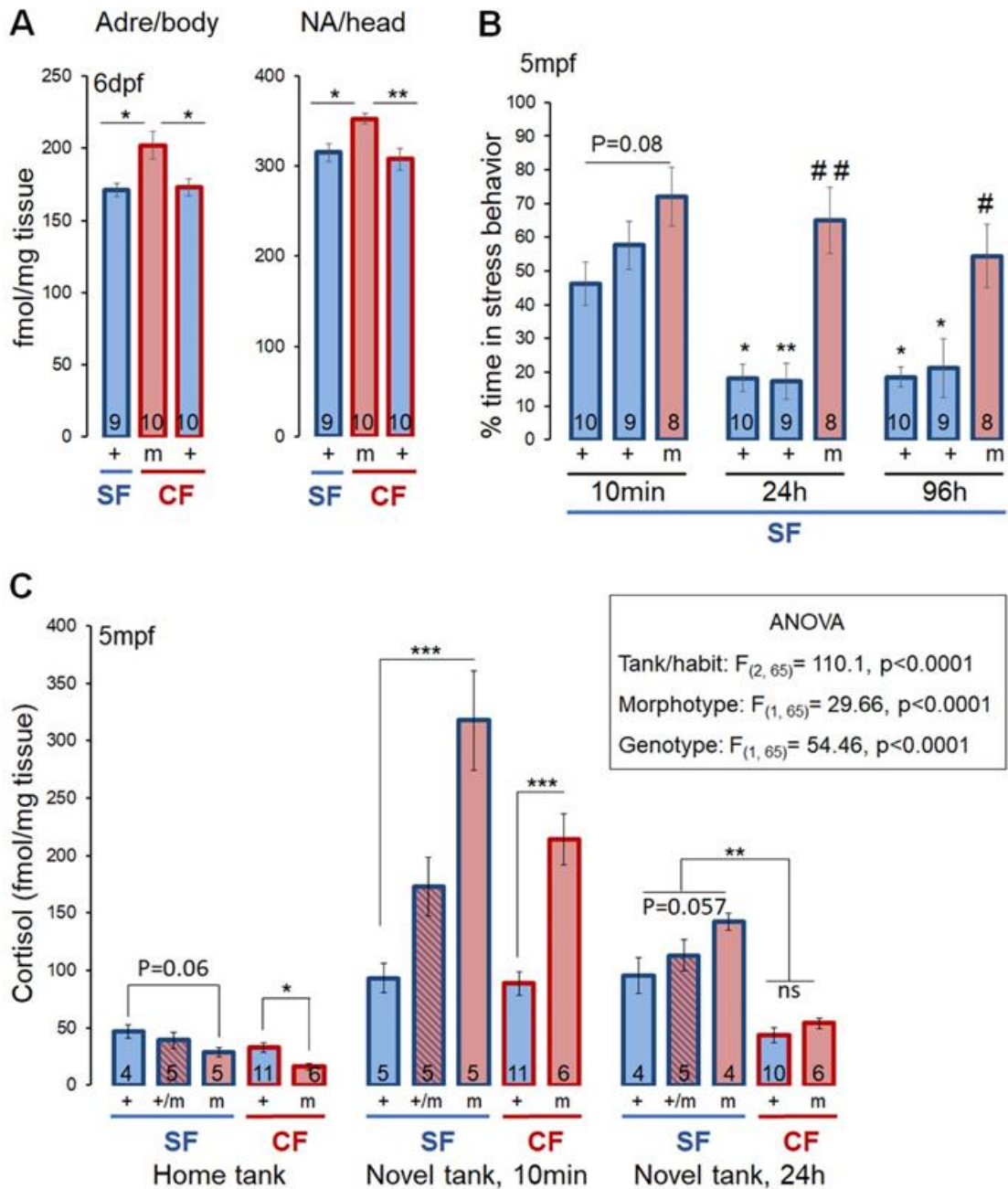


Figure 7. Catecholamine, cortisol and stress behavior measurements.

(A) Adrenaline and noradrenaline measurements in the body and the head respectively, of SF (+), mutant CF (m) and non-mutant CF (+) 6dpf larvae. Kruskal-Wallis test for adrenaline ($p=0.032$) and for noradrenalin ($p=0.003$). (B) Percentage of time spent doing stress behavior (freezing/thigmotaxis/erratic movements/attempts to dive) in 5 month-old SF. Fish lines are indicated. Non-mutant SF (+) tested are wildtype (first bar) or mutants siblings (second bar). Recordings were performed 10min, 24h and 96h after the fish was transferred alone in a novel tank. * indicate time comparisons, # indicate genotype comparisons, two-way ANOVA-RM. Friedman test for wildtype ($p=0.024$), for siblings ($p=0.003$), for mutants ($p=0.32/NS$). (C) Cortisol measurements in 5 month-old fish held in groups of 6 individuals in their home tank, in a novel tank for 10 min, and in a novel tank for 24h (+/m: heterozygotes). The most relevant statistical comparisons are indicated on graph (Mann-Whitney) and inset (3-way ANOVA). Exhaustive comparisons are given in Fig. Supp7.

Effects of P106L mutation on other candidate phenotypes

In mice, serotonin and MAO-A modulate cardiac rhythm, development and function (Abzalov et al., 2015; Mialet-Perez et al., 2018; Nebigil and Maroteaux, 2001; Nebigil et al., 2000; Stoyek et al., 2017). Yet, CF have a low metabolic rate (Hüppop, 1986; Moran et al., 2014; Salin et al., 2010), so we checked if *mao* P106L modified cardiac rhythm in *Astyanax*. In both morphs, mutant and non-mutant fish presented the same cardiac rhythm (Fig. 8A), suggesting no influence of *mao* P106L on this physiological parameter.

Serotonin affects craniofacial and teeth development (Moiseiwitsch, 2000; Moiseiwitsch et al., 1998; Reisoli et al., 2010). Yet, CF possess more teeth than SF (Atukorala et al., 2013), so we tested if *mao* P106L could be involved. Mutant CF had the same number of teeth as non-mutants, ruling out any influence of the P106L mutation on this anatomical trait, nor on fish size (Fig. 8B).

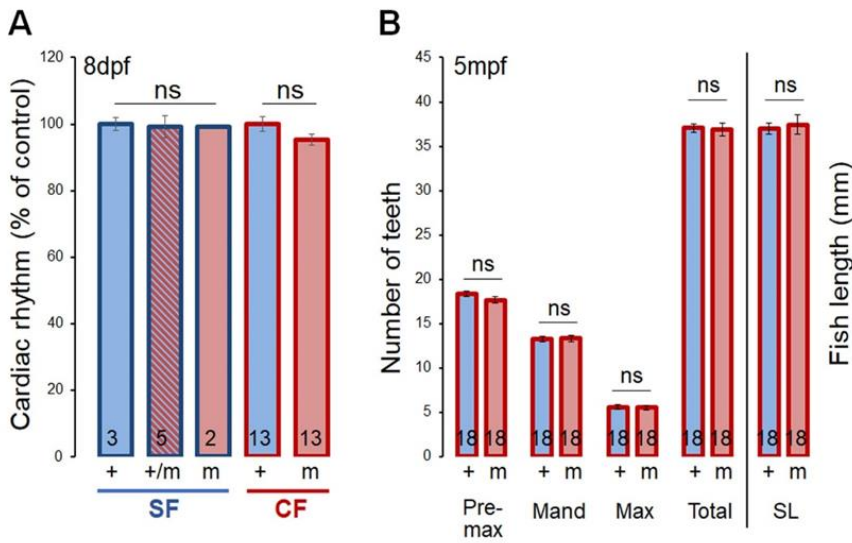


Figure 8. Cardiac rhythm and number of teeth.

(A) Cardiac rhythm of 8dpf larvae, in the indicated fish lines. (B) Number of teeth on pre-maxilla, mandible and maxilla, total number of teeth, and standard length (SL) in P106L mutant (m) and non-mutant (+) CF.

Fig8

Discussion

mao alleles in the wild

Through sampling in *A. mexicanus* wild populations, we built a phylogeographic map of *mao* alleles. The P106L mutation was present exclusively in El Abra caves, with the mutant allele found in large proportions, and fixed in two caves. Thus, either the P106L mutation has been selected, or the observed proportions have been reached by genetic drift, possibly helped by bottleneck effects during colonization or later.

Concerning the origin of the P106L mutation, we can imagine two hypotheses. (i) the mutation appeared in a cave of the El Abra group, and then spread to other caves through karstic subterranean water networks, or (ii) the mutation appeared in the ancestral surface population, and individual(s) carrying the mutation entered one or several El Abra caves. According to this last hypothesis, the P106L mutation may still be present in the surface population, in low proportion, as it is the case for the mc4R mutation (Aspiras et al., 2015). As we did not find the mutated allele in river populations, we could not discriminate between the two hypotheses.

The fact that the mutation is not fixed in most El Abra caves suggests that it is recent. In a further attempt to reconstruct the evolutionary history of the mutation, we screened all polymorphisms in a genomic region of ~4kb around the P106L mutation, for SF and CF originating from nine different caves, in 110 wild-sampled individuals (Fig. Supp. 6). The goal was to find haplotypes corresponding to the mutant and the wildtype *mao* allele, respectively. The total number of polymorphisms encountered in the 4kb *mao* fragment was consistent with current knowledge about the ecology of different populations (Fig. Supp. 6A). Polymorphism was high in the surface population, which is large, as well as in the Chica cave, where introgression of surface alleles is frequent (Elliott, 2018; Mitchell et al., 1977; Torres-Paz et al., 2018). Noteworthy, this also explains why the *mao* P106L allele is found at lower frequency in Chica compared to other El Abra caves. Conversely, polymorphism was lowest in Curva— where the P106L mutation is also fixed. The Curva cave is tiny, and albeit population size is unknown, we can suppose it is small. Our findings regarding shared polymorphisms between cave populations are also consistent, with many polymorphisms shared inside groups of caves, and few between groups (Fig. Supp. 6B). Clear haplotypes emerged (Fig. Supp. 6C), but unfortunately a simple scenario for evolutionary history of the P106L mutation in caves was impossible to draw, since too many recombination events happened. Nevertheless, haplotype distributions strongly suggest that the P106L mutation has travelled and colonized El Abra caves without being counter-selected (conclusions on positive selection cannot be drawn, see below).

Cavefish behavior

Many studies have demonstrated the involvement of serotonin in aggression in vertebrates (Edwards and Kravitz, 1997; Nelson and Trainor, 2007; Olivier, 2004; Popova, 2006). In most models, an increase in 5-HT neurotransmission causes a decrease in aggression (Carrillo et al., 2009; Summers and Winberg, 2006; Winberg and Nilsson, 1993). Accordingly, pharmacological treatments with serotonin reuptake inhibitors or receptors agonists decrease aggression, whereas serotonin receptors antagonists or synthesis inhibitor increase aggression (Buchanan et al., 1994; Deckel and Fuqua, 1998; Filby et al., 2010; Lopez-Mendoza et al., 1998; Lynn et al., 2007; Perreault et al., 2003; Sperry et al., 2003). Moreover, long-term supplementation in tryptophan (5-HT precursor, essential amino-acid) in food also causes an activation of 5-HT system, and reduces aggression in trout (Winberg et al., 2001). However, some studies found no changes in aggression after manipulations of 5-HT neurotransmission (Filby et al., 2010; Winberg and Thörnqvist, 2016), suggesting a complex role for serotonin in the expression of agonistic behavior in fish.

In the species *Astyanax mexicanus*, cavefish are less aggressive than surface fish (Elipot et al., 2013; Espinasa et al., 2005). Therefore, the P106L *mao* mutation was an ideal candidate to serve as the genetic basis of reduced aggression. However, here we demonstrate that even though *mao* P106L does increase 5-HT levels (Fig. Supp5), it does not affect aggressive behavior, regardless of vision being present or not. It is even more surprising because Elipot et al. (2013) had shown that SF under acute fluoxetine treatment were less aggressive. A possible explanation is that an acute increase in 5-HT produced pharmacologically may be very

different from the chronic MAO inhibition produced by the mutation, which could induce plastic changes in neuronal networks and homeostatic compensations to elevated 5-HT levels. Elipot et al. (2013) also performed developmental manipulations in CF using cyclopamine (Sonic Hedgehog signaling inhibitor), which resulted in a decrease in size of the PVa and raphe clusters and an increase in aggression. Here, we did not observe any change in 5-HT clusters size caused by *mao* P106L; only changes in 5-HT levels, which may not suffice to change aggression. Finally, as dopamine (DA) has a stimulatory role on aggression in mammals (Nelson and Trainor, 2007; Rodriguiz et al., 2004) and maybe also in fish (Filby et al., 2010; Winberg and Nilsson, 1993), we can hypothesize that the increase in both 5-HT and DA caused by the *mao* mutation could compensate each other, resulting in no change in aggression.

Schooling or shoaling (as studied here) has advantages as it reduces the threat of predation and facilitates visual food research (Miller and Gerlai, 2011). This behavior is supported by vision and lateral line (Partridge and Pitcher, 1980). Here, we found that light is necessary for SF to shoal, which is consistent with vision being required for this behavior (Kowalko et al., 2013b). We also showed that SF shoal less when they are habituated in their tank, consistent with other fish studies describing a reduction of shoaling due to the habituation to the environment (Al-Imari and Gerlai, 2008; Delaney et al., 2002). Indeed, fear is one of the driving force of shoaling, and if habituated fish are disturbed, they start schooling again (personal observations).

To form a school is important in predator detection and escape. But it requires vision, and becomes dispensable in environments such as caves where predators are absent. Moreover, in the dark, anti-predator advantages of forming a school are lost, and schooling may be disadvantageous since from the predator point of view, all preys are in the same area. Most social fish species do not school at night (Pavlov and Kasumyan, 2000). We found that SF shoals disperse at night, too.

Little is known about neural bases of schooling, but some studies suggested the implication of the DA system. Indeed, treatments with DA agonists or antagonists affect schooling (Echevarria et al., 2008; Scerbina et al., 2012). Even though *mao* P106L changes brain DA levels, we could not show any effect on schooling, again regardless of the fish having eyes or not. Finally, Kowalko et al. (2013) showed reduced schooling in SF after deprenyl treatment. As discussed above, a possible explanation is that deprenyl causes an acute inhibition of MAO activity, whereas the mutation corresponds to a chronic inhibition. We can also predict that chronic MAO inhibition should induce modifications of expression of monoamine receptors, transporters, and other signaling components that rescue a “normal” neuromodulation despite high levels of neurotransmitters. Such compensation phenomena have been described (Evrard et al., 2002).

Previous studies on *Astyanax* have shown that CF are more active than SF at adult (Carlson and Gross, 2018; Yoshizawa et al., 2015) and larval (Duboué et al., 2011) stages. In larvae this difference is due to both sleep reduction and increased waking velocity in CF (Duboué et al., 2011). In adults, it is mostly due to sleep reduction, and hyperactivity has little contribution to the phenotype (Yoshizawa et al., 2015). Our results are consistent with that: we showed a higher locomotor activity in larval CF, but no difference in adults from 72h of habituation. Of note, we did not measure sleep, so we cannot know the parts of sleep loss and waking velocity in these results. In another study on adults, Carlson et al. (2018) showed higher activity in CF than in SF. A major difference with our study is that they recorded single fish whereas we recorded groups. SF are social animals, and a SF placed alone in a tank displays more freezing than in a group (personal observation). It is therefore not surprising to observe reduced locomotion in SF compared to CF in solo condition.

Importantly, it appears that 1h is not enough for habituation to a novel environment in our fish model, as both SF and CF still display stress behaviors. The difference of locomotion between CF and SF (alone or in groups) measured 1h after transfer in the test tank could be explained by the fact that CF spent almost 100% of their time doing thigmotaxis (hence they move), whereas SF also spent some time freezing (hence no movement). In these conditions, it is therefore doubtful that the activity recorded is “true” locomotion. It rather corresponds to a biased read-out of stress behaviors. In line with this, the only effect of the *mao* mutation we observed on “locomotion” was for 5months old CF placed alone in a novel tank since 1h (Fig. 5B). Both mutant and non-mutant CF spent almost 100% of their time doing thigmotaxis, so we can conclude that the difference in distance travelled is only due to increased velocity in mutants. The swimming of mutant CF was more frenetic, which is consistent with our measures of cortisol levels. We did not observe this difference in frenzy/velocity when fish were in groups. This suggests that the group has some anxiolytic effect, even in CF, usually considered as non-social animals.

Many studies have reported a decrease in locomotor activity when serotonin levels are increased (Fingerman, 1976; Gabriel et al., 2009; Perreault et al., 2003; Winberg et al., 1993). Conversely, an increase of DA activity usually results in increased locomotion in mammals (Beninger, 1983) and fishes (Boehmler et al., 2007; Bretaud et al., 2004; Godoy et al., 2015; Irons et al., 2013; Jay et al., 2015; Lambert et al., 2012; Tran et al., 2015). However, although the P106L mutation changes 5-HT and DA levels, it did not affect locomotor activity. We may hypothesize that the changes in 5-HT and DA levels compensate.

Several evidences converge towards the idea that P106L *mao* mutation increases fish anxiety: higher catecholamine levels, lower food intake when fish are alone in their tank, and higher locomotion in a novel tank. The literature also supports a link between serotonin and anxiety (Chen et al., 2004; Herculano and Maximino, 2014; Lillesaar, 2011).

To validate this hypothesis, we quantified stress behaviors using a novel tank test, known to induce anxiety in fishes (Bencan et al., 2009; Blaser et al., 2010; Cachat et al., 2010; Egan et al., 2009; Kysil et al., 2017; Levin et al., 2007) and other species (Moriarty, 1995; Simon et al., 1994; Treit and Fundytus, 1988). Fish have many displays of stress behaviors, which are used to measure anxiety: freezing, thigmotaxis (also called wall-following), erratic movement, leaping, bottom dwelling (diving) (Bencan et al., 2009; Blaser and Gerlai, 2006; Blaser et al., 2010; Cachat et al., 2010; Egan et al., 2009; Gerlai et al., 2006; Levin et al., 2007; Maximino et al., 2010; Schnörr et al., 2012; Speedie and Gerlai, 2008). *Astyanax* SF display all of these behaviors in a novel tank (Chin et al., 2018; personal observations), whereas CF only do thigmotaxis (Abdel-Latif et al., 1990; Patton et al., 2010; Riedel, 1998; Sharma et al., 2009; Teyke, 1989). Such difference in stress-elicited behaviors could be due to the absence of predators in natural cave environment. In rivers, stress behaviors like freezing, erratic movements and diving are necessary to escape from predators and hide in plants or rocks. Whereas in caves, these behaviors are probably not selected or even counter-selected, since freezing reduces the time spent foraging, erratic movement consumes energy, and food can fall at the surface of water, so bottom dwelling is probably non-adaptive.

Consistent with our prediction, P106L mutant SF spent more time expressing anxiety behaviors than non-mutant SF. We also expected more thigmotaxis in mutant CF than in non-mutants, but it turned out not to be the case. A possible explanation could be that in CF, the robust thigmotaxis elicited by a novel environment may not entirely be an anxiety behavior and an attempt to escape, but also a form of exploratory behavior.

In zebrafish and rodents, thigmotaxis is considered an anxiety behavior, since anxiolytic treatment like diazepam decrease it, and anxiogenic treatment like caffeine promotes it (Schnörr et al., 2012; Treit and Fundytus, 1988). Such experiments were not conducted in *Astyanax* SF, but their behaviors in a novel tank are very similar to those of zebrafish. Cavefish may be different. Interestingly, in CF the duration of thigmotaxis is shorter in a simple than in a complex environment, or when the fish is placed in a familiar environment, except when memory consolidation has been impaired (Teyke, 1989). Moreover, CF can detect spatial changes in their environment (Burt De Perera, 2004), and fish can built a cognitive spatial map (Burt De Perera, 2004; Rodriguez et al., 1994). Finally, it seems like CF swim slightly more parallel to the wall than SF when they do thigmotaxis (Sharma et al., 2009), consistent with the fact that thigmotaxis could correspond to a different expression in CF (exploratory) and SF (escape). Then again, spatial learning in fishes involves the telencephalon (Broglia et al., 2010; Rodríguez et al., 2002; Saito and Watanabe, 2006), and CF still display thigmotaxis and habituation after telencephalic ablation (Riedel, 1998). Moreover, since thigmotaxis is an anxiety behavior in SF and other species, including humans (Kallai et al., 2005; Kallai et al., 2007), the most parsimonious hypothesis is that it is also anxiety-related in CF. A simple way to confirm (or not) this idea will be to treat CF with anxiolytic or anxiogenic drugs. Finally, it may be that the two hypotheses (anxiety/exploration) are not exclusive, and thigmotaxis elicited by stress may allow exploration of the environment. Anyway, there must be a stress component in thigmotaxis behavior, as CF placed in a novel environment do show marked increase in cortisol levels.

In fish (as in mammals), an increase of plasmatic cortisol occurs after or during a stressor, like predator visuals (Barcellos et al., 2007), crowded environment (Ramsay et al., 2006), social stress (Øverli et al., 1999; Tea et al., 2019), chasing (Gesto et al., 2008), confinement (Backström et al., 2011a; Gallo and Jeffery, 2012; Kiilerich et al., 2018; Schjolden et al., 2006; Vijayan et al., 1997), or novel tank (Kysil et al., 2017). The hypothalamus releases CRF, which induces ACTH release in blood stream, which in turn stimulates cortisol release by interrenal cells of the head kidney. This is called the hypothalamic-pituitary-interrenal axis (HPI) axis, homologue to the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis of mammals (Mommsen et al., 1999; Wendelaar,

1997). Cortisol has multiple effects on organs and tissues. It induces a reallocation of energy to cope with stress, with an increase of gluconeogenesis/lipolysis/proteolysis, and an inhibition of growth, reproduction, and immune responses (Aluru and Vijayan, 2009; Faught and Vijayan, 2016; Harris and Bird, 2000; Mommsen et al., 1999).

Previous studies concluded to a reduction of anxiety in CF as compared to SF (Chin et al., 2018), but here we showed that the difference between the two morphs is more subtle than “more or less stressed”. In normal conditions (home tank), P106L mutants have lower levels of cortisol than non-mutants. In a novel tank, P106L mutants have higher cortisol levels. In the wild, since most fish in the Pachón cave are mutants, we can assume that they are less stressed than SF in normal conditions, and more stressed in a stressful condition. An explanation to these results may lie in the link between monoamines and cortisol release during stress response. Indeed, positive or negative modulations of cortisol release by catecholamines and serotonin are known (Rotllant et al., 2006; Medeiros et al., 2010; Winberg et al., 1997; Höglund et al., 2002; Saphier et al., 1995), and this would regulate the intensity of the stress response (Gesto et al., 2015). Here, 10min after stress we detected a 2-fold variation of brain NA and 5-HT levels for mutant fish but not for wildtype ones, and in both morphs (Fig. Supp. 5), providing strong support to the involvement of monoamines in the regulation of stress response.

We suggest that the change in basal monoamine levels due to the P106L mutation could alter the balance of 5-HT/DA neuromodulation on the HPI axis. It is also possible that chronic inhibition of MAO by the mutation could induce neuronal plasticity and changes in the monoamine network, and their effect on the HPI axis. Indeed, acute MAO inhibition by deprenyl has no effect on cortisol levels in humans (Koulu et al., 1989), while MAO-A knockout/inactivation induces a decrease in corticosterone levels (Popova et al., 2006). Why a chronic inhibition of MAO induces changes in the regulation of HPI axis remains unclear and needs further investigations.

Finally, we have shown that CF cortisol levels return to basal levels quicker than SF. Therefore, there is a morph-dependent parameter which accelerates the decrease of cortisol in CF. Strickler and Soares (2011) have shown that cannabinoid receptor CB1 expression is upregulated in CF, and the endocannabinoid system is known to modulate the mammalian HPA stress axis, specifically enhancing recovery to baseline following stress (Hillard et al., 2017; Micale and Drago, 2018). The upregulation of CB1 in CF is a good candidate to explain faster recovery of basal cortisol levels in CF.

mao P106L: selected or not?

The high proportion of mutant alleles in El Abra caves questions whether the mutation could be advantageous for cave life, and may be selected. Conversely, it would be counter-selected in rivers.

Rivers appear like stressful environments, with both biotic (predators/parasites) and abiotic stressors (changes in temperature/salinity/turbidity/water levels). Caves are more stable/buffered environments, with no predators, probably less parasitism (intermediate hosts are not always present), and little variations in water parameters (Mitchell 1977). Because of the deleterious effects of cortisol on growth, immune response, reproduction and metabolism, chronically high levels of cortisol are susceptible to impair all these physiological processes (Madison et al., 2015; Pickering and Pottinger, 1989).

For CF, having very low levels of cortisol in standard condition could be adaptive since growth, reproduction and immune system would be spared. Moreover, this could facilitate energy storage and participate to the lower CF metabolic rate (Hüppop, 1986; Moran et al., 2014; Salin et al., 2010). Since caves are a “quiet” environment, at least during the dry season, we can suppose that the wide increase of cortisol observed after stress in our lab study would not occur frequently in the wild – and in any case, they would rapidly return to basal levels.

For SF instead, lower basal cortisol levels could decrease alertness, and impair energy mobilization and predator escape. Moreover, important cortisol rises induced by moderate stress, and so, overreaction to stress, could be deleterious in the long-term. Accordingly, *Brachyraphis episcopi* from high-predation environment show milder stress response than individuals from low-predation environment (Brown et al., 2005). This could prevent energy expenditure for small stressors, and save energy for important ones like predators.

Thus, the mutation may actually be counter-selected in rivers and positively-selected in caves. A less “adaptationist” hypothesis would be that the mutation is essentially neutral in caves, and evolves under a genetic drift regime. Further studies will need to address this question. Noteworthy, since monoaminergic systems are involved in a variety of developmental, physiological and behavioral processes, it is possible as well that *mao* P106L has other unexplored phenotypic effect(s); and if so, we cannot exclude that these effect(s) may contribute to all or part of the selective process, if any.

Supplemental figures and videos:

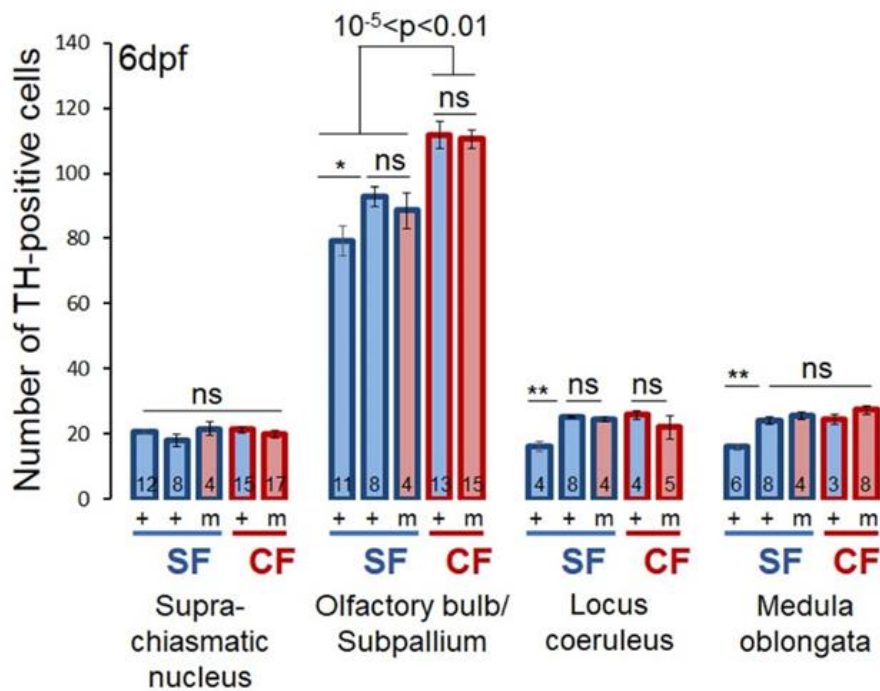


Figure Supp 1. TH positive cells, additional clusters.

Number of TH-positive cells in suprachiasmatic nucleus, olfactory bulb and subpallium, locus coeruleus and medulla oblongata, for SF and CF, both mutant homozygotes (m) or non-mutant (+). Non-mutant SF (+) tested are either wildtype (first bar), or mutants siblings (second bar).

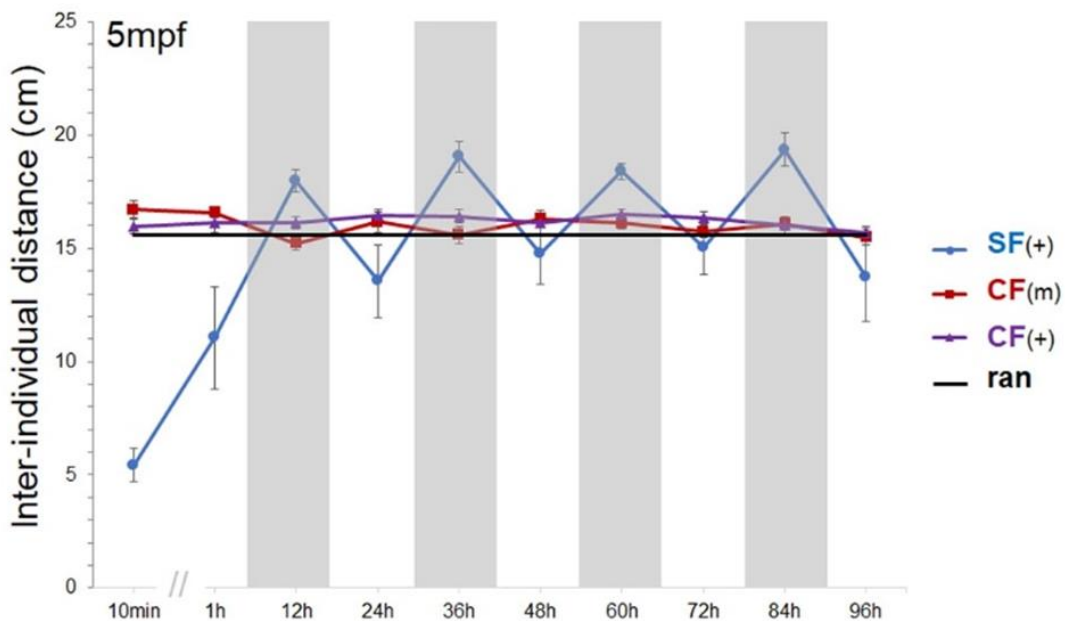


Figure Supp 2. Shoaling in SF and CF, measured over a one week period.

Mean of inter-individual distance (IID) measured during the day or during the night, over 5 days in groups of 6 fish: n=10 groups for P106L mutant CF (red line), n=12 groups for non-mutant CF (purple line), and n=5 groups for non-mutant SF (blue line). The black line is the mean value of inter-individual distance obtained with 100.000 simulations of random distribution of fish (ran).

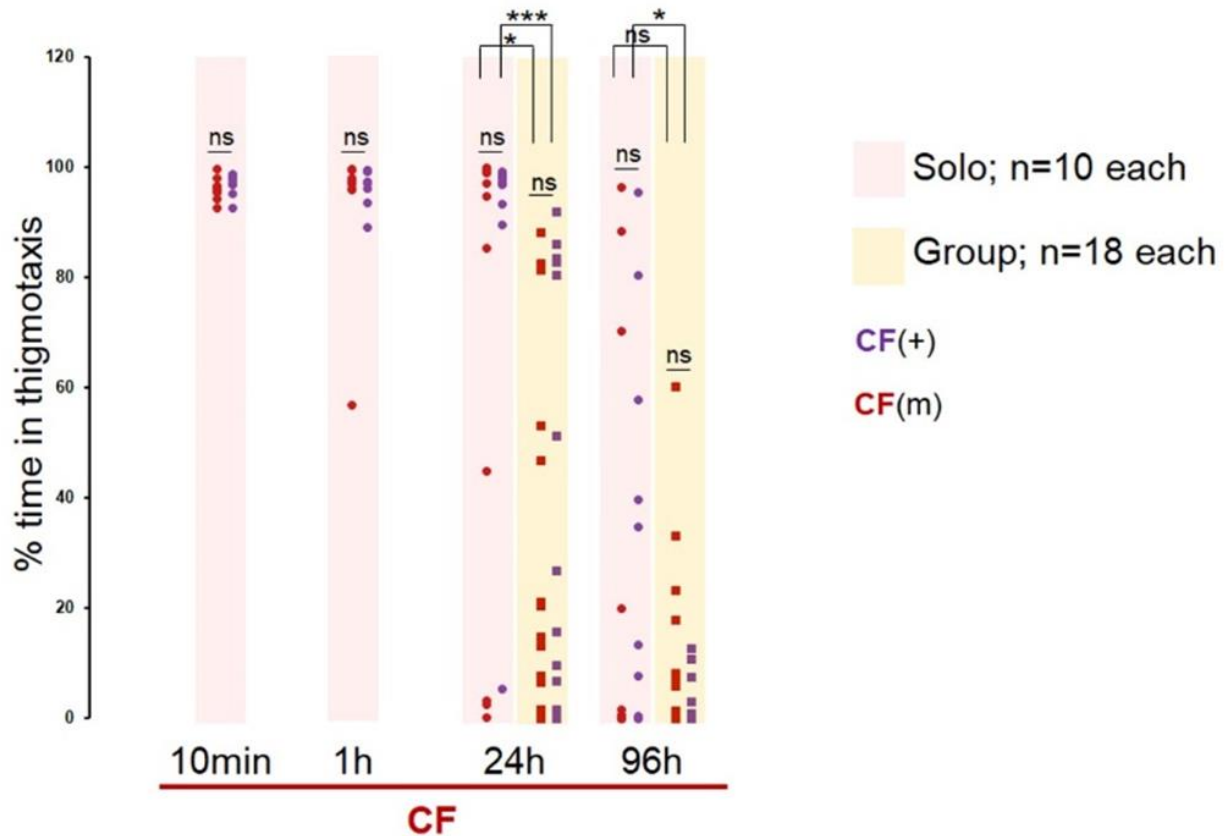
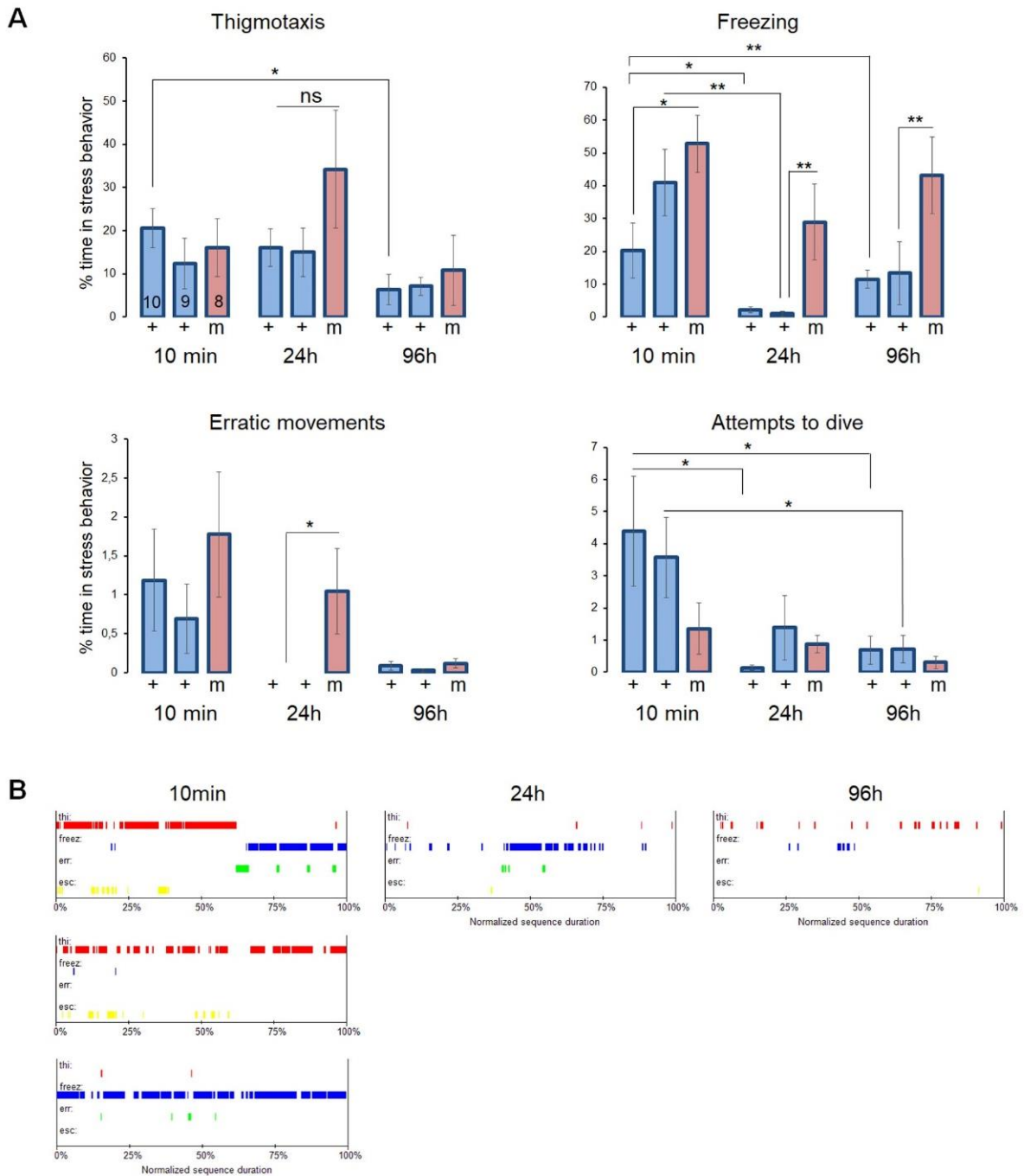


Figure Supp 3. Thigmotaxis in CF.

Measurements of the percentage of time doing thigmotaxis 10min, 1h, 24h or 96h after the fish was/were put alone (pink shade) or in group (yellow shade) in a novel environment. The measurements were performed on P106L mutant CF (red) and non-mutant CF (purple). Data are presented as scattered plots to represent the inter-individual variability of this phenotype at the two later time-points.

At 10min and 1h after transfer in a new tank, CF spent ~100% of their time doing thigmotaxis, regardless of their *mao* genotype. It was impossible to score groups of fish at these times (i.e., no yellow bars for 10min and 1h) because frenetic swimming led to loss of the track of individual fish (manual scoring).

At 24h and 96h after transfer in a new tank, data could be obtained for the 4 conditions: mutant and non-mutant, solo or groups. As inter-individual variability was high, there was no detectable significant effect of the *mao* mutation on thigmotaxis behavior, either alone or in group. However and interestingly, there was a significant reduction of thigmotaxis, for both the mutant and the non-mutant CF, when the fish were in groups as compared to solo. This may suggest that the group has an anxiolytic effect on CF, although the CF morphotype of *A. mexicanus* is often described as a “non-social” animal because it does not show collective behavior such as schooling or shoaling. Of note, we cannot rule out the possibility that the “anxiolytic effect” observed here was not due to the size of the tank. Indeed, groups were tested in larger tanks (40x23cm; 5l) than single fish (19x10cm; 600ml), hence the possibility of a confinement stress in the later.



Supp 4

Figure Supp 4. Stress behaviors in SF.

(A) Measurements of the percentage of time doing thigmotaxis, freezing, erratic movements and attempts to dive. The measurements were performed on P106L mutant SF (m) and non-mutant SF (+), and 10min, 24h or 96h after the fish was put alone in a novel environment. Non-mutant SF tested were either wt (first bar of each group), or siblings of mutants SF (second bar). (B) Representative ethograms for SF, showing the alternation of periods where the fish display thigmotaxis ('thi' in red), freezing ('freez' in blue), erratic movements ('err' in green) and attempts to dive ('esc' in yellow). The 3 ethograms of the top line belong to the same fish, recorded 10min, 24h and 96h after being put in a novel environment. The 3 ethograms of the first column belong to 3 different fish recorded 10min after being put in a novel environment. Note the individual preferences for a given behavior, which can also vary along time for a single individual. Hence, the large error bars on graphs in A, and the necessity to combine all stress behaviors for analysis (as shown in Fig. 7B).

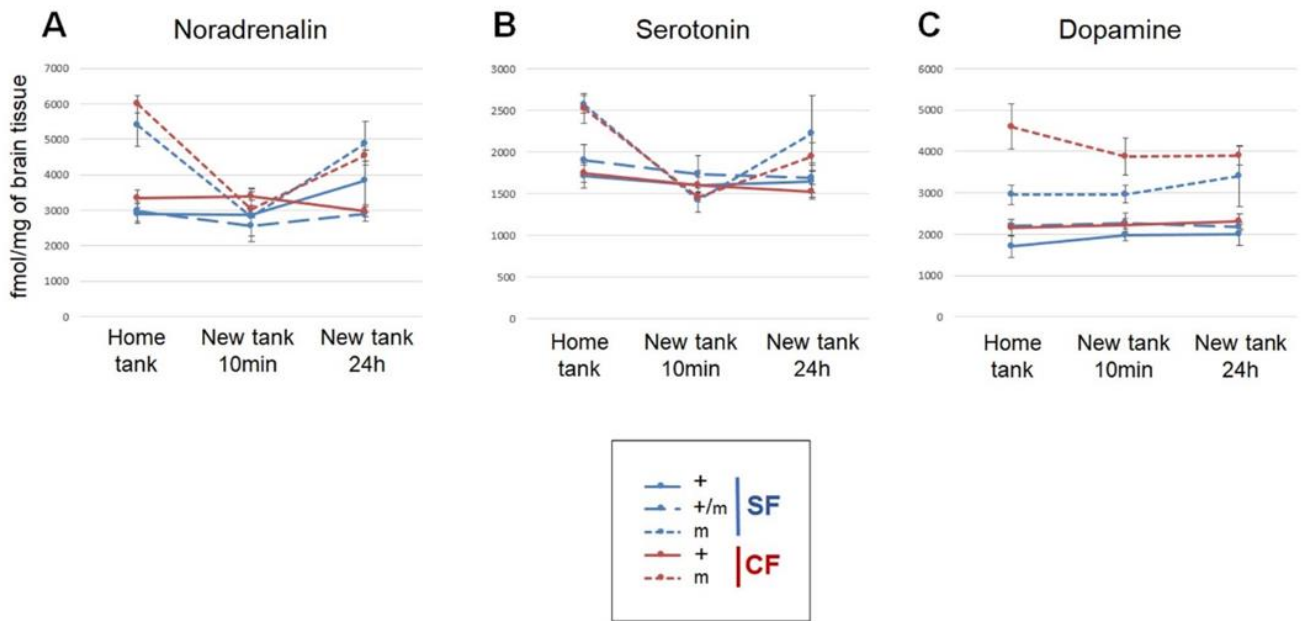


Figure Supp 5. Levels of serotonin, noradrenaline and dopamine in the brain before, during and after a stressor (novel environment).

Noradrenaline (A), serotonin (B) and dopamine (C) measurements in the brains SF and CF, both P106L mutant homozygotes (m, dotted lines) and non-mutant (+, continuous lines), and heterozygotes SF (+/m, long dotted lines). Measurements were performed on fish held in groups of 6 in their home tank (HT) at the fish facility, in a novel tank for 10 min (NT10), and in a novel tank for 24h (NT24). Only mutants show strong variations of brain NA and 5-HT after stress.

Statistics for 5-HT: HT mCF versus HT +CF p=0.0011 ; HT mSF versus HT +SF p=0.0159 ; HT mCF versus NT10 mCF p=0.0022 ; HT mSF versus NT10 mSF p=0.0079 ; NT24 mCF versus NT24 +CF p =0.0312.

Statistics for NA: HT mSF versus HT +SF p=0.0159 ; HT mSF versus HT m/+SF p=0.0079 ; HT mCF versus HT +CF p=0.0002 ; HT mCF versus NT10 mCF p=0.0022 ; HT mCF versus NT24 mCF p=0.0022 ; NT10 mCF versus NT24 mCF p=0.0022 ; NT24 mSF versus NT24 m/+SF p=0.0159 ; NT24 mCF versus NT24 +CF p=0.0002.

Statistics for DA: HT mSF versus HT +SF p=0.0317 ; HT mSF versus HT m/+SF p=0.0079 ; HT mCF versus HT +CF p=0.0031 ; NT10 mSF versus NT10 +SF p=0.0159 ; NT10 mCF versus NT10 +CF p=0.0002 ; NT24 mCF versus NT24 +CF p=0.0010.

A

Location	Number of individuals	Number of polymorphisms intra-location
Surface	20	57
Pachon	20	23
Los sabinos	10	3
Tinaja	12	18
Curva	10	1
Chica	10	32
Molino	9	5
Escondido	7	1
Caballo moro	2	1
Subterraneo	10	13

B

	El Abra						Guatemala		Micos	
	SF	PA	SAB	TIN	CUR	CHI	MO	ES	CAB	SUB
El Abra	SF	11	3	10	5	13	0	0	4	10
PA	11		2	8	7	14	3	3	1	3
SAB	3	2		7	5	3	0	0	1	3
TIN	10	8	7		7	8	0	0	3	6
CUR	5	7	5	7		9	0	0	1	3
CHI	13	14	3	8	9		3	3	2	3
Guatemala	MO	0	3	0	0	3		11	1	0
ES	0	3	0	0	0	3	11		1	0
Micos	CAB	4	1	1	3	2	1	1		2
SUB	10	3	3	6	3	3	0	0	2	

C

	NC_035915.1:32713783	NC_035915.1:32713768	NC_035915.1:32713768	NC_035915.1:32713733	NC_035915.1:32713703	NC_035915.1:32713347	NC_035915.1:32713238	NC_035915.1:32712805	NC_035915.1:32712378	NC_035915.1:32711901	NC_035915.1:32711590
SF	TGACTAG	A	A	T	delA and WT	C and T	WT	G and T	C and T	C	A
Pa	AGCTA	T	C	T	delA	C	WT	T	C	C	A
Tin	TGACTAG	A	A and C	T and C	delA and WT	T	WT	G	T and C	T	A and C
Sab	TGACTAG	A	A	C	WT	T	WT	G	T	T	A and C
Cur	AGCTA	T	C	T	delA	C	deletion 7nt	G	T	T	
Chi	AGCTA	T	C	T	delA	C	deletion 7nt	T	C	T	A

Supp 6

Figure Supp 6. Polymorphism along a ~4 kb fragment of the *mao* gene, and *mao* haplotypes.

(A) Number of wild-sampled individuals tested and number of polymorphisms in the ~4kb fragment around the P106L position in the *mao* gene, detected at each sampling site. For instance, we sequenced 20 fish from the river population, and we found 57 polymorphic positions distributed along the sequenced fragment. (B) Number of shared polymorphisms between surface populations and cave populations from El Abra, Guatemala and Micos groups. Darker colors indicate a high number of shared polymorphisms. Note that they are mostly shared within groups of caves. (C) Haplotypes reconstitution for the P106L mutant allele. Each column corresponds to a polymorphic position. The first line depicts the haplotypes encountered in SF (all Proline at position 106 – homozygote wildtype), and the next lines are haplotypes associated with the Leucine106 (P106L) mutant allele in cave populations of the El Abra group. For instance, all P106L mutant individuals sequenced from Pachón cave had the sequence AGCTA (first column in the table) at the position 32713783, whereas all P106L mutants from the Tinaja cave had the sequence TGACTAG instead at that same position. The P106L mutation is in position NC_035915.1:32711472.

Video Supp 1: thigmotaxis in CF, 10min after being placed in a novel tank.

Video Supp 2: thigmotaxis in CF, 1hour after being placed in a novel tank.

Video Supp 3: thigmotaxis in CF, 96hours after being placed in a novel tank.

Annexes à l'article 1 « A mutation in monoamine oxidase (MAO) affects the evolution of stress behavior in the blind cavefish *Astyanax mexicanus* »

Quelques résultats intéressants, que nous n'avons pas pu insérer faute de place, sont discutés ci-dessous en complément de l'article.

Annexe 1 : Nage en surface de l'aquarium

Chez beaucoup d'espèces de poissons, la position de l'animal dans la hauteur de la colonne d'eau est utilisée pour quantifier le stress. Il est usuellement admis que le pourcentage de temps passé au fond de l'aquarium est directement proportionnel au niveau de stress du poisson. Ce test a été largement utilisé chez le poisson zèbre (Cachat et al., 2010; Egan et al., 2009; Levin et al., 2007), mais aussi chez d'autres espèces de poissons, comme *Gobiocypris rarus* (Zhang et al., 2016), et *Astyanax mexicanus* (Chin et al., 2018).

Dans un nouvel environnement, les poissons cavernicoles passent plus de temps dans la partie supérieure de l'aquarium que les poissons de surface (Chin et al., 2018). Les auteurs en ont déduit que le stress était réduit chez les poissons cavernicoles.

Cependant, après une habitude de 24h, les poissons cavernicoles passent moins de temps dans la partie supérieure qu'avec une habitude d'une heure (Figure annexe 1). Or, après 24h d'habitude, les taux de cortisol sont moins élevés qu'après 1h d'habitude (Figure 7C article 1). Les poissons sont donc très probablement moins stressés avec une habitude de 24h. Ces résultats suggèrent donc que la hauteur de nage dans la colonne d'eau n'est pas pertinente pour quantifier le stress chez le poisson cavernicole.

La nage au fond de l'aquarium est un comportement d'échappement des prédateurs. Un poisson qui est stressé cherchera à se cacher au fond, ce comportement est donc pertinent pour mesurer le stress chez les poissons de surface. En revanche, l'environnement des poissons cavernicoles est dépourvu de prédateurs. Nous pouvons donc supposer que ce comportement d'évitement ait été perdu chez les poissons cavernicoles.

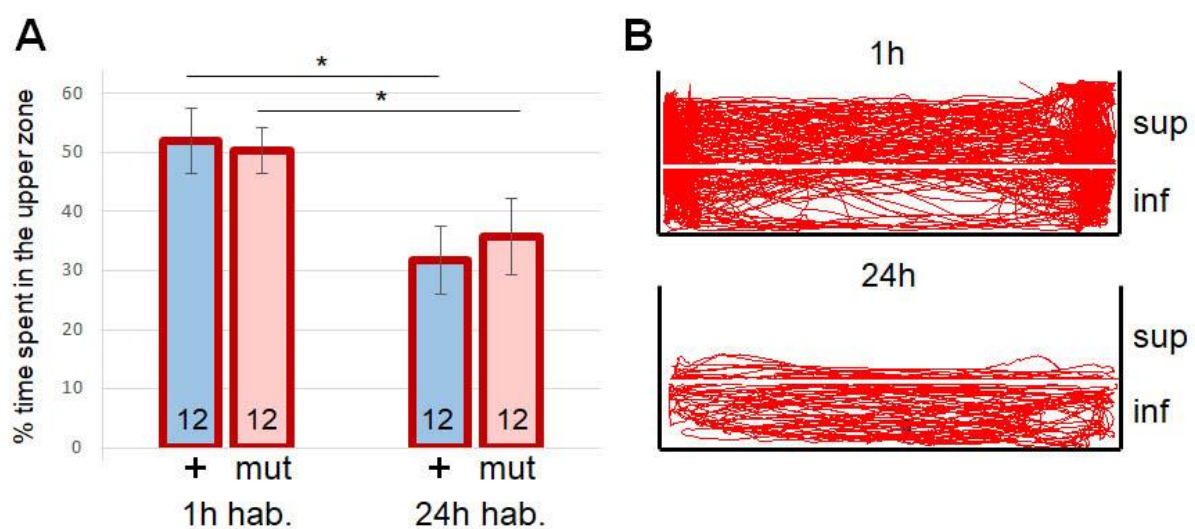


Figure Annexe 1. Hauteur de nage dans la colonne d'eau chez les poissons cavernicoles.

(A) Pourcentage de temps passé dans la partie supérieure de l'aquarium après une heure ou 24h d'habitude dans un nouvel environnement. Les mesures ont été réalisées sur des poissons cavernicoles d'un an, porteurs (mut) ou non (+) de la mutation P106L (homozygotes). Les poissons sont seuls et les enregistrements sont de 10min.

(B) Exemple de trajectoire d'un poisson, après 1h et 24h d'habitude. La caméra était placée sur le côté du bac, de manière à distinguer la partie supérieure (sup) et la partie inférieure du bac (inf).

Annexe 2 : Effet d'un traitement au deprenyl sur l'activité locomotrice

Dans l'article 1, nous avons montré qu'à 5 mois, les poissons cavernicoles mutés P106L ont une activité locomotrice supérieure aux cavernicoles non mutés dans un nouvel environnement (Figure 5B article 1). Afin de tenter de mimer les effets de la mutation P106L sur la locomotion dans un nouvel environnement, nous avons traité les poissons avec du deprenyl (inhibiteur sélectif irréversible de la MAO) à la concentration de 10 μ M pendant 5h. Il est important de noter que dans ces conditions expérimentales où les poissons sont seuls et dans un nouvel environnement, ils sont stressés. Les poissons de surface font majoritairement du « freezing », et les poissons cavernicoles du thigmotactisme. La locomotion enregistrée ici est donc fonction de ces comportements de stress.

Le traitement au deprenyl ne change pas la distance parcourue chez les poissons de surface, mais diminue fortement celle des poissons cavernicoles, qu'ils soient mutés ou non (Figure annexe 2A). Il diminue aussi le thigmotactisme des poissons cavernicoles (Figure annexe 2B). Nous pouvons donc conclure que le deprenyl a un effet anxiolytique chez les poissons cavernicoles, comme cela a été reporté dans la littérature pour un autre inhibiteur de la MAO, le tranylcypromine, chez le poisson zèbre (Stewart et al., 2011). Comme nous n'avons pas mesuré le « freezing » chez les poissons de surface, nous ne pouvons pas conclure sur l'effet du deprenyl chez ce morphe d'*Astyanax*.

Ces données montrent qu'un traitement au deprenyl (qui diminue la locomotion) ne mime pas les effets de la mutation P106L (qui augmente la locomotion) sur la distance parcourue par un poisson en solo dans un nouvel environnement. L'inactivation chronique de la MAO par la mutation P106L entraînerait sûrement des modifications plastiques des systèmes monoaminergiques, que n'induirait pas une inhibition aigüe au deprenyl. Cette idée est d'ailleurs soutenue par les résultats obtenus dans le 2^{ème} article.

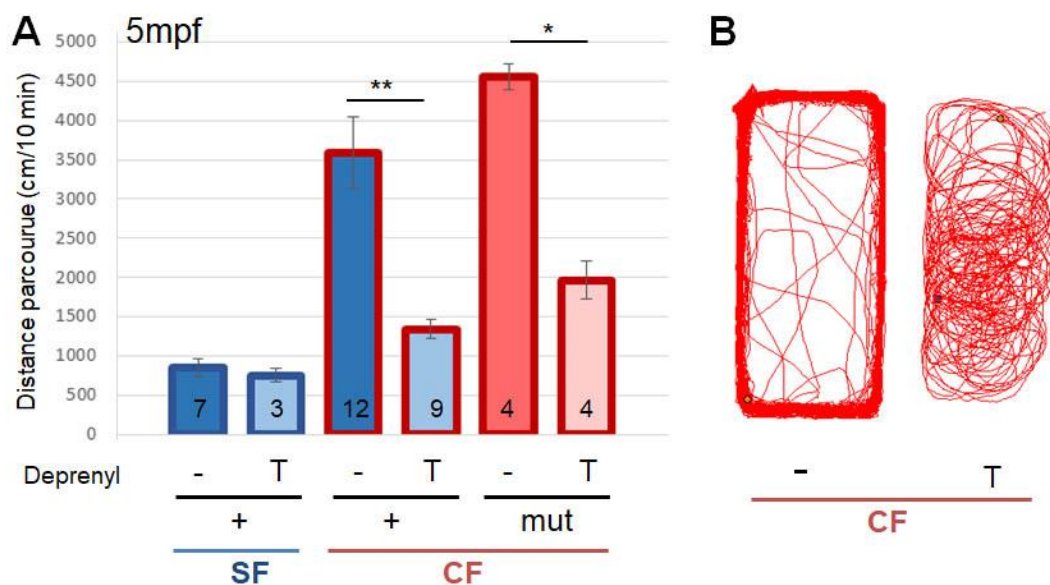


Figure Annexe 2. Effet d'un traitement au deprenyl sur la locomotion en solo dans un nouvel environnement.

(A) Distance parcourue en 10min après X heures d'habitué dans un nouvel environnement. Les poissons utilisés sont des poissons de surface non mutés (+), et des poissons cavernicoles porteurs (mut) ou non (+) de la mutation P106L (homozygotes), et âgés de 5 mois. Ils ont été traités (T) ou non (-) par du deprenyl.

(B) Exemple de trajectoire de poissons cavernicole traité (T) ou non (-) au deprenyl. Les poissons traités font beaucoup moins de thigmotactisme.

Annexe 3 : Activité locomotrice à 2 semaines

Dans l'optique d'étudier le développement progressif des comportements, nous avons mesuré l'activité locomotrice à l'âge de deux semaines. Les résultats obtenus sont très similaires à ceux obtenus à l'âge de 6dpf (Figure annexe 3). Les poissons cavernicoles (tous génotypes confondus) parcourent plus de distance que les poissons de surface, bien que l'écart de locomotion entre les deux morphes soit moins important qu'à 6dpf (comparer avec Figure 5A, article 1). Ces données confirment aussi que les poissons cavernicoles réagissent aux changements de luminosité, mais sans les anticiper, contrairement aux morphes de surface.

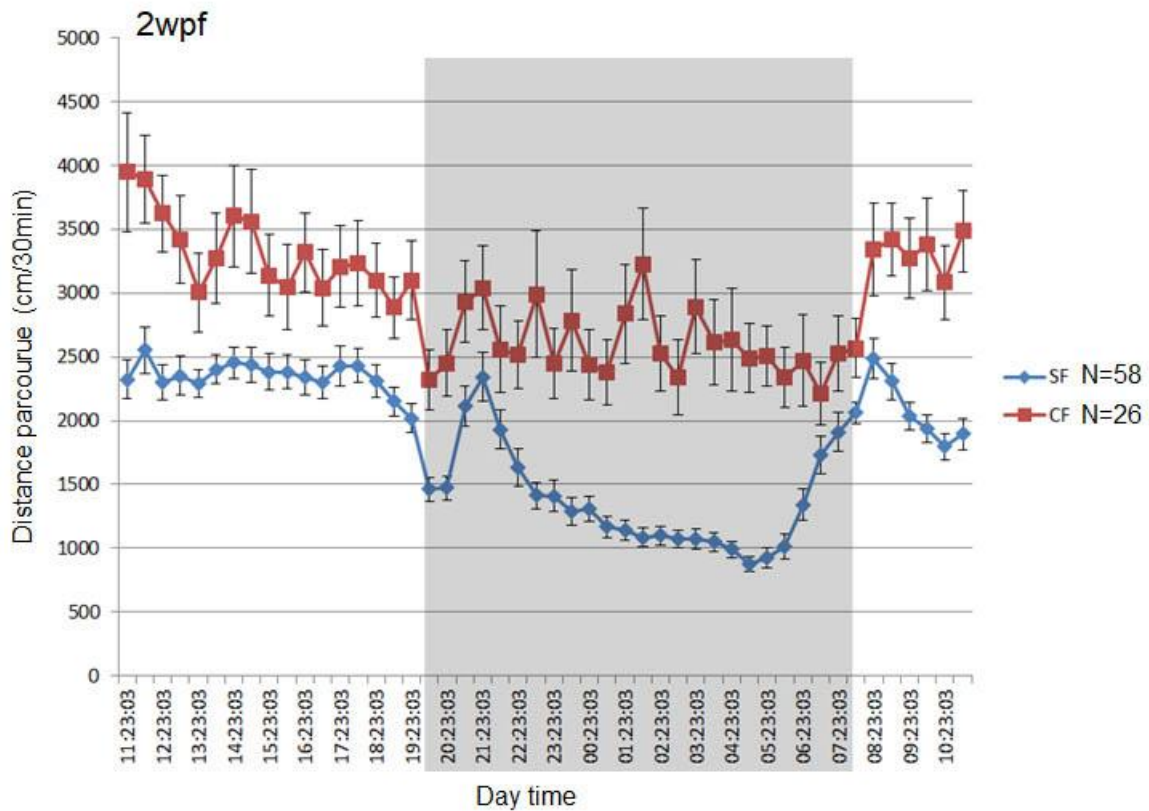


Figure Annexe 3. Locomotion chez des alevins de 2 semaines.

Distance parcourue sur une période de temps de 24h par des alevins de surface (bleu) ou cavernicoles (rouge) âgés de 2 semaines.

Article 2 « The enzymatic and neurochemical outcomes of a mutation in cavefish MAO reveal teleost-specific aspects of brain monoamine homeostasis », manuscrit en préparation

Constance Pierre, Jacques Callebert¹, Jean-Marie Launay¹ and Sylvie Rétaux

Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France, and

¹ Service Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, 75475 Paris, France

Abstract:

Monoamine oxidases (MAO; MAO-A and MAO-B in mammals) are enzymes catalyzing the degradation of biogenic amines, including monoamine neurotransmitters. In humans, coding mutations in MAOs are extremely rare and deleterious. Here, we assessed the structural and biochemical consequences of a point mutation (P106L) in the single MAO of the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. This mutation decreased by ~3-fold the MAO enzymatic activity, probably as a result of decreased flexibility in one of the three loops forming the entrance of the active site, thus reducing the access of substrates. HPLC measurements in brains of mutant and non-mutant larvae and adult fish showed major disturbances in serotonin, dopamine and noradrenalin (and metabolites) contents, demonstrating that the P106L *mao* mutation is fully responsible for monoaminergic disequilibrium in the cavefish brain. The outcomes of the mutation were different in the posterior brain (containing the raphe) and the anterior brain (containing fish-specific hypothalamic serotonergic clusters), revealing contrasting properties in neurotransmitter homeostasis in these different neuronal groups. We also discovered that the effects of the mutation were partially compensated by a decrease in activity of the TPH, the serotonin biosynthesis rate-limiting enzyme. Finally, the neurochemical outcomes of the *mao* P106L mutation differed in many respects from either acute or chronic treatments with deprenyl, an irreversible MAO inhibitor, showing that genetic and pharmacological interference with MAO function are not the same. Our results shade light on our understanding of cavefish evolution, on the specificities of fish monoaminergic systems, and on MAO-dependent regulation of brain neurochemistry in general.

Introduction

Monoamine oxidase (MAO) is a flavoprotein that catalyzes the oxidative deamination of biogenic amines – monoamine neurotransmitters and dietary amines. It is located at the outer membrane of mitochondria in neuronal, glial and other cells, in platelets, liver and kidney for example (Berry et al., 1994; Levitt et al., 1982). In mammals, MAO exists under two isoforms that share 70% identity in primary sequence (Shih et al., 1988) and differ in terms of substrate and inhibitor specificities. MAO-A prefers serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and noradrenalin (NA) as substrates and is sensitive to the irreversible inhibitor clorgyline, while MAO-B prefers phenylethylamine and benzylamine as substrates and is more sensitive to the selective inhibitor deprenyl. Dopamine (DA) and tyramine are common substrates for both isoenzymes (Shih et al., 1999). The two MAO genes are closely linked on chromosome X and share the same exon-intron organization, suggesting that they have evolved from an ancestral gene by tandem duplication (Grimsby et al., 1991).

The enzyme's biomedical relevance is well supported by the proven efficacy of pharmacological inhibitors in treating e.g. depression (Youdim et al., 2006), and the major neurological defects caused by its malfunction or de-regulation. In humans, only two families were reported with mutations in MAO-A, and they show cognitive and mental retardation, with severe behavioral disturbances including violent behavior and impulsive aggressiveness (Brunner et al., 1993; Piton et al., 2014). In mice, MAO-A and MAO-B knock-out lines with elevated brain monoamine levels also display complex behavioral alterations similar to the “Brunner syndrome” and modifications of stress response and anxiety-like behavior, respectively (Cases et al., 1995; Grimsby et al., 1997). The double MAO-A/B knock-out mice show hallmarks of autism spectrum disorder and greater neuropathological alterations than single KO mice (Chen et al., 2004). Moreover, altered MAO gene promoter methylation and its interaction with environmental factors emerges as an important mechanism in the etiology of several mental disorders (Ziegler and Domschke, 2018). Finally, recent work suggests that besides its neurophysiological aspects, MAO also plays important roles in tumorigenesis, diabetes, obesity and cardiovascular disease (Deshwal et al., 2017; Shih, 2018).

The first fish MAO was cloned from trout and displays about 70% identity with MAO-A and MAO-B (Chen et al., 1994). In fact, teleost fish have only one *mao* in their genomes, which is homologous to the mammalian MAOs, is expressed in various tissues like in mammals, and degrades tyramine, serotonin, phenylethylamine (PEA) and dopamine (Aldeco et al., 2011; Anichtchik et al., 2006; Chen et al., 1994; Setini et al., 2005). On the other hand, other authors have reported that DA is a poor substrate for zebrafish MAO (Sallinen et al., 2009). Teleost MAOs seem to exhibit functional properties that are more similar to those of mammalian MAO-A (Aldeco et al., 2011; Sallinen et al., 2009).

In the blind and depigmented, cave-dwelling form of the species *A. mexicanus* (Elliott, 2018; Mitchell et al., 1977), a natural point mutation in the *mao* gene (P106L) has been reported (Elipot et al., 2014a). The substituted proline 106 is homologous to the proline 114 and 105 in human MAO-A and -B, respectively. Therefore, through comparative studies with its river-dwelling conspecific, the cavefish natural *mao* mutant could help us better understand the properties of fish MAO and the impact of MAO deficiencies in the vertebrate brain. The consequences of the P106L mutation in cavefish *mao* on relevant physiological, behavioral and developmental traits have been studied in a previous article (Pierre et al., 2020). In summary, we have found that *mao* P106L has surprisingly little deleterious phenotypic effects and mainly changes stress response in cavefish as compared to surface fish. In the present study, we focused on the impacts of the P106L mutation on enzymatic activity and brain neurochemistry. We report that P106L leads to a 3-fold reduction of enzymatic activity, thus corresponding to a partial loss-of-function mutation, which can be explained by *in silico* structure-function analyses. In the cavefish brain, P106L causes a major disequilibrium in 5-HT, DA and NA neurotransmission indexes, but we found that 5-HT homeostasis is partially compensated for at synthesis level. Finally, we showed that acute or chronic pharmacological treatments reducing MAO activity have markedly different outcomes than the P106L genetic mutation in cavefish, suggesting that plastic and compensatory mechanisms must occur and may buffer the deleterious effects of mutation.

Methods

Fish husbandry: Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish and cavefish (Pachón population) were obtained in 2004–2006 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD, USA and were since then bred in our local Gif facility. Fish were maintained at 23–26 °C on 12:12-h light: dark cycle and they were fed twice a day with dry food. The fry were raised in Petri dishes and fed with micro-worms after opening of the mouth (~6dpf, days post-fertilization). Animals were treated according to the French and European regulations for handling of animals in research. SR's authorization for use of *Astyanax mexicanus* in research is 91-116 and the Paris Centre-Sud Ethic Committee protocol authorization number related to this work is 2017-05#8604. The animal facility of the Institute received authorization 91272105 from the Veterinary Services of Essonne, France, in 2015.

Fish lines: To obtain Pachón CF without the P106L mutation, we crossed heterozygotes fish identified among our lab Pachón breeding colony, taking advantage that the P106L mutation is not fixed in the Pachón population (see Pierre et al. 2020). To obtain a SF line carrying the mutation, a cross between a SF (wild type mao) and a CF carrying the P106L (homozygote mutant) was followed by 4 backcrosses with SF (see Pierre et al. 2020). Then, to obtain SF homozygote mutants, we intercrossed the last generation together. Note that the generation time between the spawn of the n generation and the spawn of the n+1 generation was about 8 months.

mao P106L allele genotyping: To genotype adults, we took fin-clips and performed a lysis with proteinase K in lysis buffer (100mM Tris; 2mM EDTA; 0.2% Triton; 0.01µg/µl PK), followed by a PCR (primer F-GGGAATCATATCCATCAAGGGG; primer R-CTCCATGCCCATCTTGCCATAG), and a purification of DNA (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up). We used the genotyping service of Eurofins Genomics. Homozygotes and heterozygotes at position 106 were easily detected and identified on sequence chromatograms. We did not genotype larvae as they were obtained from genotyped groups of adults breeding fish.

Sampling for biochemistry: 6dpf larvae were anesthetized in water at 1°C, and the head was cut from the body. A sample (n=1) was formed with 15 heads or bodies in 400µl of HCl (10-3M). The same protocol was used for 1month-old larvae, but samples were made up of 10 heads or bodies. Adults (5months-old) were quickly anesthetized in water at 1°C. Then the head was cut with a scalpel, the brain dissected out and cut in two halves to separate the anterior part (with hypothalamus serotonergic clusters) and the posterior part (with raphe nuclei). The 2 parts of the brain were individually placed in 400µl of HCl (10-3M).

HPLC and enzymatic activities:

For HPLC: before analysis, tissues were crushed and centrifuged at 20.000g for 1h. The supernatant was analyzed by fluorimetry for serotonin (HPLC), coulometry for catecholamines (HPLC).

For enzymatic activities: MAO activity was measured as described in Elipot et al. (2014), using tyramine as substrate. TPH activity was measured by radio-enzymatic assay. Tissue homogenate (25 µL) was added to a reaction mixture containing 0.05 mM tryptophan, 50 mM Hepes (pH 7.60), 5 mM DTT, 0.01 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 0.5 mM 6-MPH₄, 0.1 mg/ml catalase, and 3H-tryptophan (1 µCi/reaction). The enzymatic reaction was allowed to proceed at 37°C for 20 min. Unreacted tryptophan and the product 5-HTP were adsorbed with 500 µl of 7.5% charcoal in 1 M HCl at the end of the incubation. The samples were thoroughly vortexed and centrifuged at 14,000 × g for 2 min. The supernatant (350 µL) was centrifuged, and a 200-µl aliquot of the final supernatant was added to 3 mL of scintillation fluid and the radioactivity was measured by a liquid scintillation counter (Beckman LS 6000SC). Blank values were obtained by performing the reaction in the absence of tissue homogenate and in the presence of boiled homogenate. The counts per minute were converted to pmoles of 5-HTP formed per milligram of tissue per hour using the formula described by (Vrana et al., 1993).

Deprenyl treatments: Adults were placed in water containing 10µM of deprenyl for 5hrs for an acute treatment. Larvae were chronically treated with deprenyl at 1µM and 5µM from 35hpf (hours post-fertilization) onwards during 6 days.

3D Modeling: 3D Modeling was performed with iTasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), 3D alignment with TM-align, and secondary structure predictions and normalized B-score with ResQ (Yang et al., 2015; Yang et al., 2016b).

Statistical analyses: No statistical method was used to predetermine sample size. No data were excluded from analysis, and sample allocation was random after genotyping. Sex was not considered in the analyses as it impossible to determine sex in *Astyanax mexicanus* before the age of 6-7 months without dissection/sacrifice. Analyses were not be blinded (note that for anatomical analyses, brains from SF or CF are easily recognizable by eye size and presence of pigmentation). Statistical analyses were performed with BiostaTGV (<https://biostatgv.sentiweb.fr/>), using non-parametric Mann-Whitney tests (normal distribution was not tested). All graphs show mean±sem, and the number of samples included is systematically indicated on graph bars. P values are shown. In all figures, *** p<0.0001, ** p<0.001 and * p<0.01.

Results

The P106L mutation decreases the enzymatic activity of *A. mexicanus* MAO.

A previous study had measured MAO enzymatic activities on *A. mexicanus* surface fish (SF) and cavefish (CF) originating from the Pachón cave (Elipot et al., 2014a). However, we have recently discovered that the P106L mutation is not fixed in the Pachón CF population (Pierre et al., 2020). Therefore, the CF used in the previous study were probably a mix of mutants, non-mutants and heterozygotes, prompting the need to assess MAO enzymatic activity on samples with homogeneous genetic backgrounds. Here, we measured MAO enzymatic activities on brain extracts from P106L homozygous mutants and homozygous non-mutant CF obtained from crosses. We found that the P106L mutation causes a ~3-fold reduction of MAO enzymatic activity, using tyramine as a substrate (Fig 1A). Consistently, this reduction was stronger than the 2-fold reduction we previously reported on samples that were probably non-homogeneous genetically.



We also planned to measure MAO enzymatic activity in heterozygotes. Samples are collected and will be processed after Covid-19 lockdown.

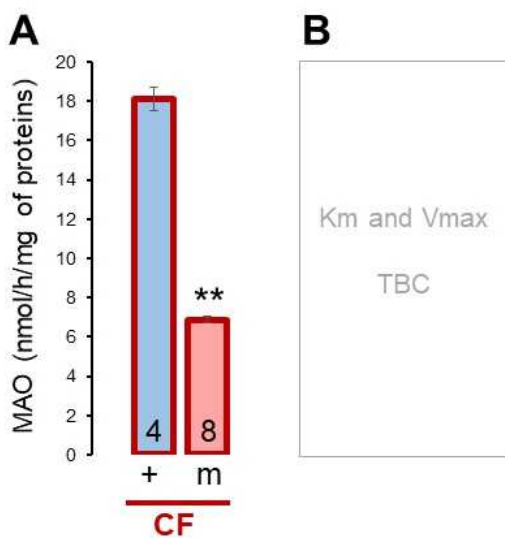


Figure 1. Enzymatic properties of P106L mutant and non-mutant MAO.

(A) Measures of enzymatic activities in brains of cavefish that are homozygote P106L MAO mutants (m) or non-mutants (+).

(B) Measures of K_m and V_{max} for both MAO.

In this and subsequent figures, all graphs show mean±sem, the number of samples included is indicated on bars, and p values are shown (*** p<0.0001, ** p<0.001 and * p<0.01; Mann Whitney tests).

The P106L mutation probably limits entrance of the substrate to the enzyme active site.

To get insights on the effects of the *mao* P106L mutation on the structure-function of the enzyme, we accessed 3D-modeling of the mutant and non-mutant proteins. First, a 3D model of *A. mexicanus* MAO was obtained with iTasser (Fig 2A). Even if the P106L mutation should theoretically remove a bend in the polypeptide chain, the two proteins modeled with either a proline or a leucine in position 106 had the same C α trace and perfectly overlapped, with a TM score between 0.995 and 1 depending on the models used (Fig 2B). The TM score is comprised between 0 and 1, with the value 1 indicating a perfect match between two structures. Thus, the P106L mutation did not change the structure of the protein.

In human MAOs, the entrance channel for the substrate towards the deep active site is formed by 3 loops (V93-E95; Y109-P112; F208-N212) (Son et al., 2008) (see also Fig 2A). Since this entrance is narrow, conformational fluctuations of the 3 loops are necessary to let the substrates enter the active site (Binda et al., 2002; Son et al., 2008). Mutations which cause a rigidification of the loop have been associated with a reduction of the enzymatic activity (Son et al., 2008).

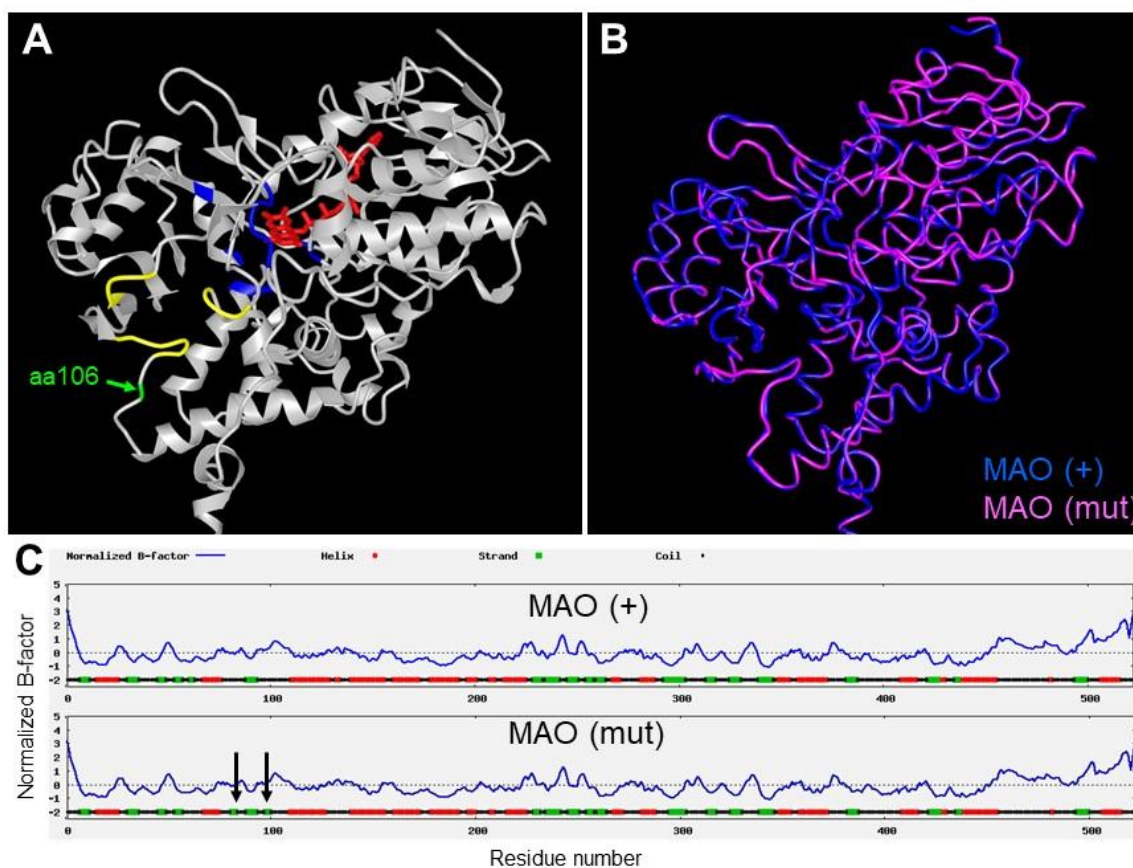


Figure 2. Structure of P106L mutant and non-mutant MAO.

(A) 3D model of the globular part of *Astyanax mexicanus* MAO wild-type, with FAD cofactor in red. Blue amino acids belongs to the active site and bind serotonin, the three loops in yellow form the entrance to the active site (Son et al. 2008). The position 106 is in green (arrow).

(B) P106L mutant (pink) and non-mutant MAO (blue) structure superposition.

(C) Normalized B-factor (blue line) and secondary structure prediction along the protein sequence for the two MAO proteins. The normalized B-score is calculated with local variations of modeling simulations. If the normalized B-score is under zero, the residue is defined as stable, and flexible otherwise.

A. mexicanus MAO showed a structure very similar to human MAOs, with TM scores of 0.97415 and 0.94971 when compared to MAO-A and MAO-B, respectively. The proline106 in *Astyanax* MAO is homologous to the proline114 in human MAO-A, so that the P106L mutation found in cavefish is located at the edge of one of the 3 loops (Fig 2A). In terms of secondary structure, the predictions obtained with ResQ showed two additional strands formed next to the position 106 in the mutant protein (Fig 2C). Helix and strands are more rigid than unfolded coil. Thus, combining our analyses in *Astyanax* MAO together with previous studies on human MAO-A (Son et al., 2008) suggested that the P106L mutation could rigidify one of the loops forming the entrance of the active site, and therefore limit the access of substrates. It should be noted, however, that the normalized B-score whose calculation is based on local variations of modeling simulations, and so is an indicator of the flexibility, is not very different between the two proteins (Fig 2C).



If the P106L mutation limits the substrate's accessibility to the active site, then we can predict that the affinity of substrates for the enzyme should be modified. We planned to measure and compare the K_m and V_{max} of the wildtype and mutant MAO proteins. Samples are collected and will be processed after Covid-19 lockdown.

Finally, to get insights on the severity of the P106L mutation from another, independent, perspective, we assessed its pathogenicity score in MutPred2 (Pejaver et al., 2017). MutPred2 is a machine learning-based predictor of the impact of missense variants in humans. The cavefish *mao* P106L mutation had a MutPred2 score, i.e., the probability that the amino acid change is pathogenic, of 0.456. This is close to the pathogenicity threshold (0.5). Of note, we have incidentally found another non-synonymous mutation just next to position 106, M107I, in a wild-caught surface fish individual (Pierre et al., 2020). By comparison, this mutation had a MutPred2 score of 0.247, suggesting that contrarily to P106L, the M107I mutation found in a surface fish is not deleterious for the enzyme function.

Altogether, these data provided structural, biochemical and computational evidences that the cavefish *mao* P106L mutation corresponds to a partial loss-of-function mutation. Below, we further analyzed its consequences on cavefish brain neurochemistry.

The P106L mutation affects monoamines homeostasis.

The P106L mutation increases monoamine levels and decreases metabolite levels in the brain, in a region-specific manner.

To assess the consequences of decreased MAO enzymatic activity on brain neurochemistry, we measured monoamines and metabolites levels in heads and bodies of 6dpf larvae and brains of 5mpf (=young adults) *A. mexicanus*. We reasoned that comparing surface fish (with wildtype, non-mutant *mao*) with P106L mutant cavefish as well as non-mutant cavefish would enable us to disentangle the effect of the morphotype (surface versus cave) and the mutation (*mao* wildtype versus P106L) on brain monoamines.

As expected, in larval heads, the levels of the 3 monoamines 5-HT (serotonin), NA (noradrenalin) and DA (dopamine) were higher in P106L *mao* mutants than in non-mutant samples (Fig 3A, left). The P106L mutation increased by 1.26, 1.15 and 1.30 times the levels of 5-HT, NA and DA, respectively. Conversely, the levels of 5-HT and DA metabolites (5HIAA, DOPAC and HVA) were lower in CF *mao* mutants. The NA metabolite VMA was non-detectable. Importantly, the levels of 5-HT and NA were identical in SF and non-mutant CF. The slight difference in DA content between SF and non-mutant CF observed in 6dpf larvae disappeared at older stages (1 month-old and 5 month-old) (Fig 3C and Fig 1 Supp).

The index of neurotransmission is often estimated by the metabolite/neurotransmitter ratio (inversely proportional to the "strength" of neurotransmission or signaling). In the heads of 6dpf larvae, the 5HIAA/5-HT and (DOPAC+HVA)/DA ratios were lower in CF, both mutant and non-mutant, and were further decreased by the mutation within CF (Fig 3A, right). This suggested a very low 5-HT and DA index and thus a strong 5-HT and DA neurotransmission in P106L *mao* mutant CF larval heads.

We also measured monoamine and metabolites in bodies of 6dpf larvae. There, the P106L mutation also increased by 1.17, 1.23 and 1.17 times the levels of 5-HT, NA and Adrenaline, respectively (Fig 3B). The metabolites 5HIAA, DOPAC and HVA were increased. VMA and DA were non-detectable in bodies. The only morph-dependent difference between non-mutant CF and SF was a higher level of 5-HT in SF. Again, this difference between non-mutant CF and SF disappeared in 1 month-old fish (Fig 3C and Fig 1 Supp).

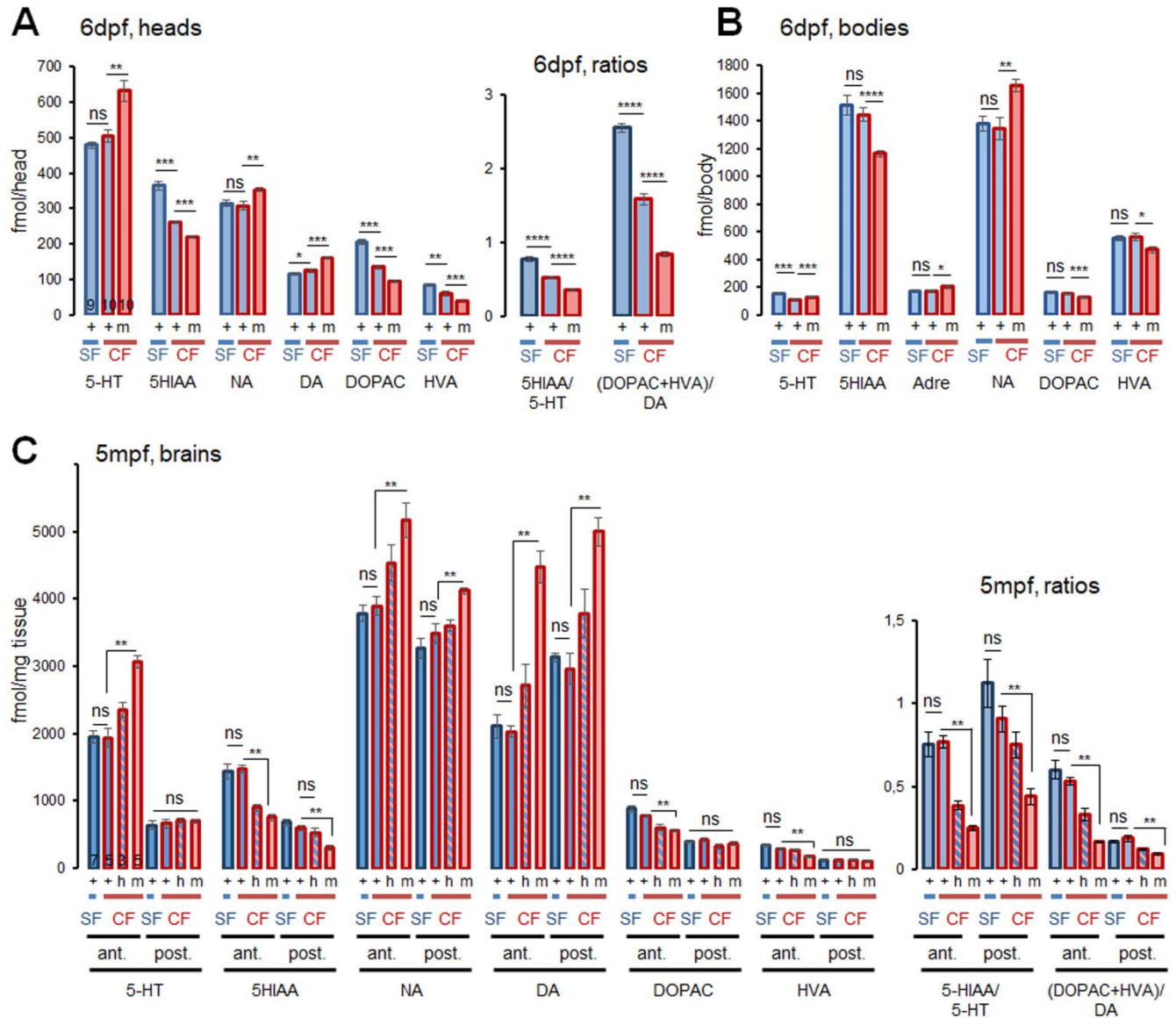


Figure 3. Monoamine and metabolite levels in *mao* P106L mutant or non-mutant *A. mexicanus*.

On all graphs, the mutant (m), non-mutant (+) or heterozygous (h) state of the *mao* P106L mutation is indicated, as well as the morph (SF or CF), the type of sample (larval brain, body, or anterior/posterior adult brain) and the molecule measured. (A) Measures of monoamines and metabolites in heads of 6dpf larvae and calculated ratios 5-HIAA/5-HT and (DOPAC+HVA)/DA in wt SF and CF, both mutant homozygotes (m) and non-mutant (+). Each sample corresponds to 15 mixed heads of the same genotype.

(B) Measures of monoamines and metabolites in bodies of 6dpf larvae and calculated ratio 5-HIAA/5-HT in wt SF and CF, both mutant homozygotes (m) and non-mutant (+). Each sample corresponds to 15 mixed bodies of the same genotype.

(C) Measures of monoamines and metabolites in the anterior (first 4 bars) and posterior (last 4 bars) parts of brain of 5 month-old fishes and calculated ratios 5-HIAA/5-HT and (DOPAC+HVA)/DA in wt SF and CF, both mutant homozygotes (m), non-mutant (+) and heterozygotes (h).

The fish brain serotonergic system is composed of two groups of clusters of neurons, in the hypothalamus and in the raphe. Hypothalamic and raphe clusters are distinct in terms of gene expression and transcriptional factors involved during their development (Lillesaar, 2011). We therefore hypothesized that the P106L *mao* mutation could have distinct consequences in the two groups of serotonergic clusters. We thus analyzed separately the anterior (including the hypothalamic clusters) and the posterior (including the raphe nuclei) parts of the brain in 5 months-old fish (a cut at the midbrain/hindbrain junction was possible on 5mpf brains). At this age, for all monoamines and metabolites and in the two brain parts, measures and ratios were identical in SF (wildtype) and non-mutant CF (Fig 3C). This demonstrated that all the variations described below between mutant CF and wildtype SF/CF are totally and exclusively due to the P106L mutation.

Regarding 5-HT, the P106L mutation increased its levels by 1.58 times in the anterior brain; but the 5-HT levels in the posterior brain were unaffected by the mutation. On the other hand, P106L decreased 5HIAA levels in both parts of the brain. This was unexpected but consistent with previous studies (Elipot et al., 2014a) where the difference in 5-HT levels reported between SF and CF (non-genotyped) were only different in the anterior part of the brain, whereas the 5HIAA levels were different in the two parts of the brain.

Moreover, the mutation increased NA and DA levels in the two parts of the brain, and decreased the DA metabolites in the anterior part only. The most drastic effect of the mutation was on DA levels in the anterior brain, where a 2.2-fold increase was observed in mutant CF as compared to their non-mutant counterparts.

Finally, the 5HIAA/5-HT and (DOPAC+HVA)/DA ratios in both parts of the brain were the same in SF and non-mutant CF, further showing that the P106L mutation was fully responsible for the variations observed between CF (mutant) and SF.

Altogether, these data show major modifications in the brain neurochemistry caused by the P106L *mao* mutation in CF, with subtle but significant differences between anterior and posterior parts of the brain.



To reinforce these conclusions and further support the central role of P106L in the observed variations of brain neurochemistry, we planned to measure monoamines and metabolites in brains of SF carrying the P106L mutation. Samples are collected and will be processed after Covid-19 lockdown.

P106L mutant CF show a reduced TPH activity.

The enzymatic activity of MAO was reduced 2.64 times by the P106L mutation (Fig 1A). However, the levels of neurotransmitters were more modestly increased (1.58X for 5-HT in the anterior brain; maximum 2.20X for DA in the anterior brain)(Fig 3). We therefore wondered if there could be a compensation at the level of neurotransmitters synthesis. We measured and compared TPH activity (Tryptophan Hydroxylase; 5-HT synthesis rate-limiting enzyme) in mutant and non-mutant CF. TPH activity was strongly decreased in mutant CF (Fig 4). The reduction was more important in the anterior part (2.02 times) than in the posterior part (1.40 times) of the brain. Thus, we concluded that a significant compensation of the effects of the mutation exists at the 5-HT synthesis level.



To reinforce these conclusions, we planned to measure TPH activity in brains of SF carrying the mutation. Samples are collected and will be processed after Covid-19 lockdown.

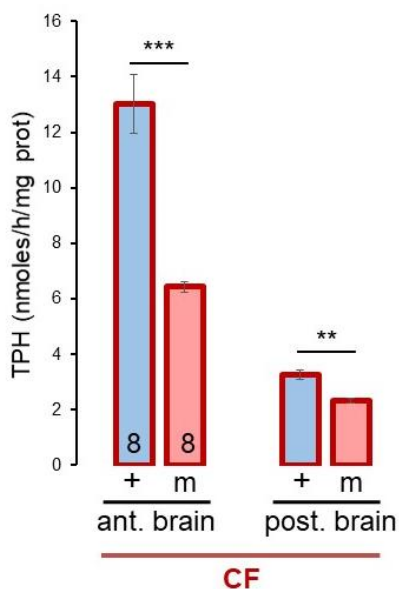


Figure 4. Tryptophan hydroxylase activity in *mao* P106L mutant or non-mutant cavefish.

TPH activity was measured in the anterior and posterior brain of 5 month-old cavefish, both mutant (m) and non-mutant (+).

A chronic treatment with deprenyl does not mimic the P106L genetic mutation.

We next asked to what extent the effects of the P106L mutation in the cavefish brain could be compared to MAO inhibition by drug treatment. We thus analyzed the effects of deprenyl, a selective and irreversible MAO inhibitor, on brain neurochemistry.

Acute treatment on 5 months-old, young adult fish increased 5-HT levels by 2.03X and 2.36X in non-mutant CF, and by 1.35X and 2.47X in mutant CF, in the anterior and the posterior part of the brain, respectively (Fig 5A). As expected, the treatment also decreased 5HIAA levels. The modifications caused by deprenyl, at the concentration used (10 μ M), were stronger than those observed with the P106L mutation. Of note, this acute pharmacological treatment also increased 5-HT levels in the posterior part of the brain, contrarily to the mutation (Fig 5A). On the other hand and surprisingly, deprenyl had no effect on NA and DA levels, but their metabolites were systematically and significantly decreased. Taken together, these results showed that an acute MAO inhibition by deprenyl had markedly different effects on brain neurochemistry than a chronic MAO inhibition by partial loss-of-function genetic mutation.

In an attempt to mimic more closely the effect of the *mao* P106L mutation, we next chronically treated SF larvae with deprenyl, from 35hpf onwards during 6 days. We chose this stage because the onset of MAO mRNA expression is between 24-36hpf in *Astyanax* and zebrafish, and MAO activity can be detected at 42hpf in zebrafish (Sallinen et al., 2009) and 60hpf in *Astyanax* (Elipot et al., 2014a). Such chronic treatment dose-dependently increased the 5-HT levels by 1.44 and by 1.85 for deprenyl concentrations of 1 μ M and 5 μ M, respectively, and decreased the 5HIAA levels in a dose-dependent manner as well (Fig 5B). The increase with the lowest concentration (1 μ M) was slightly higher than the increase observed with the P106L *mao* mutation (1.26X at 6dpf, and 1.41X at 1month; Supp Fig 1). Consistently, the 5HIAA/5-HT decreased after treatment (Fig 5B, right panel). However, the treatment did not cause any change in the DA and NA levels (Fig 5B), which was surprising since at this stage the P106L mutation also changes catecholamine levels. The (DOPAC+HVA)/DA ratio was unchanged after chronic treatment (Fig 5B, right panel). Therefore, a chronic deprenyl treatment starting at the onset of expression/activity of the enzyme is not equivalent to a *mao* genetic mutation.

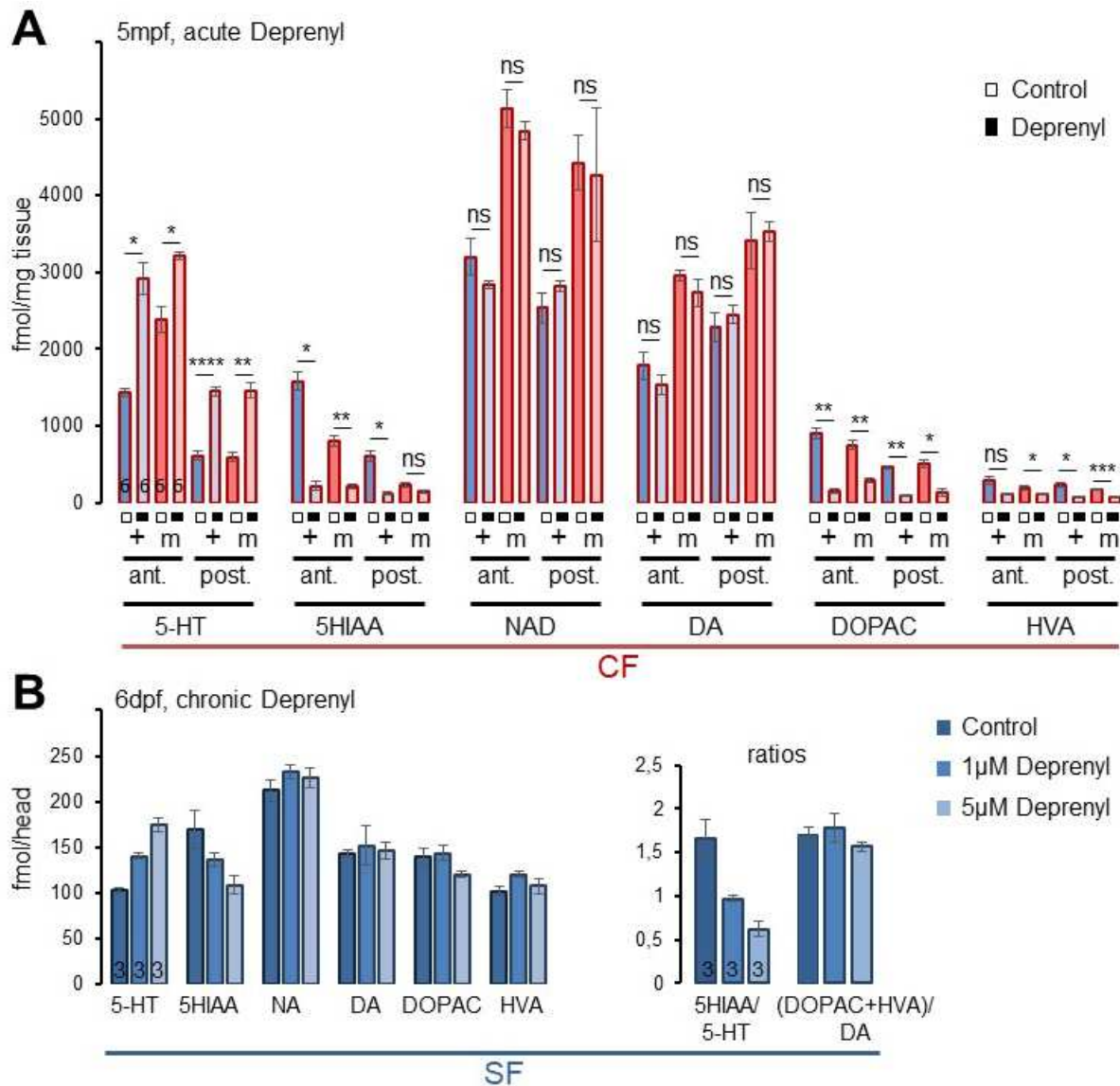


Figure 5. Effects of acute or chronic deprenyl treatment on brain neurochemistry.

(A) Monoamine and metabolites levels in the anterior and posterior parts of the brain of 5 month-old fishes, after acute 10µM deprenyl treatment (black squares) or not (white squares); n=6 each. Fish used are CF, both mutant (m) and non-mutant (+).

(B) Monoamine and metabolites levels in heads of SF larvae, and corresponding 5-HIAA/5-HT and (DOPAC+HVA)/DA ratios. SF were chronically treated with 1µM or 5µM deprenyl from 35hpf onwards during 6 days, or non-treated; n=3 each (one sample corresponds to a pool of 15 treated or control SF larvae).

Measuring fish MAO activity on dopamine as a substrate.

Most of what is currently known on monoamine metabolism in fish comes from the zebrafish model. In this species, MAO is thought to display strong affinity for 5-HT but a modest one for DA (Sallinen et al., 2009), possibly explaining how MAO inhibition by deprenyl strongly increases 5-HT levels but does not affect DA and NA levels. However, this does not explain how DA and NA metabolites are decreased after deprenyl, nor the discrepancy observed between pharmacological or genetic interference on MAO function.



To better characterize MAO properties in fish models, we planned to measure and compare *A. mexicanus* and zebrafish MAO activities on dopamine as a substrate. Samples are collected and will be processed after Covid-19 lockdown.

Discussion

Our data provide insights, 1) for understanding cavefish phenotype and evolution, 2) for understanding the specificities of fish monoaminergic and particularly serotonergic systems, and 3) for understanding MAO-dependent regulation of brain neurochemistry in general. These 3 aspects are discussed below.

mao P106L: specific considerations related to cavefish biology

The first crystal structures of human MAO-B and rat MAO-A were obtained in 2002 and 2004, respectively (Binda et al., 2002; Ma et al., 2004), and subsequent, increasingly higher resolution structures (De Colibus et al., 2005; Son et al., 2008) helped the development of effective and selective inhibitors. The C-terminal region of the protein corresponds to transmembrane alpha-helices that anchor the enzyme to the mitochondrial outer membrane. The active site is a flat hydrophobic cavity occupied by the covalently-bound FAD coenzyme at the distal end. To access the active site, the substrate (or inhibitor) must negotiate a turn near the intersection of the enzyme with the surface of the membrane, and enter through 3 loops which form a narrow path. In the human MAO-A, the entrance is surrounded by residues V93-E95, Y109-P112, and F208-N2012 which lie in 3 different loops, and therefore loop flexibility is critical for opening the entry for substrates (Son et al., 2008). In the *A. mexicanus* MAO, we have found that the overall 3D structure of the enzyme is very well conserved. However, the P106L mutation is precisely located on one of these 3 entrance loops, and it confers additional rigidity to the loop, as suggested by predicted extra beta-strands on the secondary structure. Therefore, we propose that the P106L mutation in cavefish MAO could impair the conformational fluctuations necessary for loop flexibility and substrate entrance into the enzyme active site. This hypothesis derived from structural *in silico* modeling is well supported by computational predictions on the pathogenicity of the mutation obtained from the machine-learning based predictor MutPred2 (Pejaver et al., 2017) and, most importantly, by biochemical evidence showing that *A. mexicanus* MAO enzymatic activity is reduced by two thirds by the P106L mutation. Thus, P106L corresponds to a partial loss-of-function mutation, and the oxidative deamination of monoamine neurotransmitters and biogenic amines must be strongly impaired in cavefish metabolism.

The cave-dwelling morphs of *A. mexicanus* are albino. Their lack of melanin pigmentation is due to a mutation in the gene *Oca2* (*Ocular and cutaneous albinism 2*; involved in the transport of melanin precursor into melanosomes) (Protas et al., 2006). It was suggested that a potential benefit of albinism in cavefish could be to provide a surplus of L-tyrosine, the common precursor of the catecholamine and melanin synthesis pathways, and that this could explain the higher levels of DA and NA in cavefish brains (Bilandžija et al., 2013). In support of this hypothesis, morpholino knock-down of *Oca2* expression in surface fish embryos decreased their pigmentation as expected, and simultaneously increased the L-tyrosine and DA content in 3 days-old larvae (Bilandžija et al., 2013). In contrast to this hypothesis though, here we bring strong, genetically-based evidence at different stages, from 6 days to 1 month and up to 5 months of age, that the differences in brain 5-HT, DA and NA content between SF and CF is fully and solely due to the P106L *mao* mutation. Indeed, monoamines and metabolites HPLC patterns and levels were systematically identical in SF and non-mutant CF, and altered in mutant CF, thus pointing to the causal role of *mao* P106L. Of note, the slightly increased DA levels in non-mutant CF as compared to SF (+9%) we observed at 6dpf may correspond to a transient and limited contribution of the *Oca2* mutation to increasing DA levels in cavefish at early developmental stages, when monoaminergic systems are already developed but probably not fully mature (Elipot et al. 2014; Pierre et al 2020). For comparison, even at this early larval stage, the *mao* mutation alone increases DA levels by 30% (Fig. 3A). And at later stages, the *mao* P106L contributes to 100% of the observed differences, and for all monoamines.

In a companion paper on the neuro-behavioral effects of the *mao* P106L mutation, we have found surprisingly little effect on the cavefish phenotype, besides a clear involvement of altered brain monoamine homeostasis in the “stressability”, or amplitude of response to a stress represented by a change of environment (Pierre et al., 2020). This is at odds with the major cognitive and behavioral deficits caused by the only 2 MAO-A mutations (Glu313Stop; Cys266Phe) discovered so far in two human families (Brunner et al., 1993; Piton et al., 2014), and

with the two-third reduction of MAO enzymatic activity and the ~33% increase in monoamine brain levels we have observed in mutant fish. This discrepancy raises two points of discussion. First, there must be multiple and complex compensatory plastic mechanisms occurring in the brain and body of cavefish, and which explain how they can cope with their *mao* mutation. It will be important to study these plastic changes, as they can give valuable information on general mechanisms of homeostasis. Here, we have found that this includes, at least in part, a compensation at the level of neurotransmitter synthesis, as shown by reduction of TPH activity in P106L *mao* mutants. Second, it is well known that cavefish display metabolic alterations, accumulate fat, and suffer hyperglycemia and diabetes due to a mutation in insulin receptor (Aspiras et al., 2015; Riddle et al., 2018b; Salin et al., 2010). As a potential role of MAO in metabolic and cardiovascular diseases has recently been raised (Deshwal et al., 2017; Shih, 2018), it will be important as well to examine a possible contribution of *mao* P106L to non-neural, metabolic phenotypes of cavefish.

General considerations on MAO and 5-HT system in fish

There are two major differences between mammals and fish concerning MAO and the 5-HT system (Lillesaar, 2011). Fish possess only one MAO as opposed to MAO-A and -B in mammals, and they possess clusters of 5-HT neurons both in the hypothalamus and in the raphe, as opposed to raphe only in mammals. *Astyanax mexicanus* does not escape the rule in these respects (Elipot et al. 2013; Elipot et al. 2014 ; Pierre et al., 2020).

Fish MAO has been suggested to have properties closer to mammalian MAO-A, including a suspected poor affinity for dopamine as a substrate. This is mainly because inhibition of MAO by deprenyl in larval zebrafish highly elevates 5-HT levels, but not DA or NA levels (Sallinen et al., 2009). The same holds true in *A. mexicanus* (Fig. 5A). However, in the present study after acute deprenyl treatment, we found no change in DA and NA levels but a very strong decrease in the levels of DA metabolites DOPAC and HVA, which is counterintuitive if DA is not a MAO substrate (NB: DOPAC can only be produced by MAO-dependent degradation, therefore its presence suggest that DA is degraded by MAO). This discrepancy between the variations of metabolites and neurotransmitters cannot be explained easily either if one considers the alternative catabolic pathway for DA, through COMT (catechol-O-methyltransferase). This is why we planned to assess *A. mexicanus* and zebrafish MAO activities on dopamine as a substrate to clarify the issue. This part of discussion will be completed upon obtaining the results (🍌). Anyway, even if the fish MAO happens to degrade efficiently dopamine, a conundrum will remain. Why and how do DA and NA levels remain stable when their metabolites vary? An unknown, fish-specific mechanism must exist, which buffers the expected rise in DA and NA when MAO is pharmacologically inhibited – but not when it is genetically mutated. Indeed in the case of the P106L cavefish mutation, neurotransmitters and their metabolites show logical, inversely correlated variations, which also tends to suggest that DA and NA are *bona fide* MAO substrates in fish.

Interestingly, in our experiments the hypothalamic and the raphe serotonergic neurons did not respond in the same manner to MAO perturbations. In fact, while hypothalamic 5-HT and 5HIAA levels varied according to the *mao* genotype, in the posterior brain the 5-HT levels remained the same for the two morphotypes (CF and SF) and the two genotypes (mutant and non-mutant) while the 5HIAA levels were lower in *mao* P106L mutants (Fig. 3C). This confirmed and reinforced previous results (Elipot et al., 2014a), and suggested a compensation of the effects of the *mao* P106L mutation, in the raphe, to tightly regulate the 5HT levels. The decreased TPH activity we have observed in the posterior brain of the mutant fish may participate to the process. Furthermore, an acute MAO inhibition by deprenyl treatment did modify 5-HT raphe levels whereas a chronic inhibition by the P106L genetic mutation did not. This suggests that the compensation in the raphe, if it exists, takes time to set up.

During embryonic development in zebrafish, the specification of the 5-HT neurons of the hypothalamus and the raphe is controlled by different transcription factors: *pet1* in the raphe (Lillesaar et al., 2007) like in mammals, *versus* *Etv5b* in the hypothalamus (Bosco et al., 2013), suggesting that the serotonergic identity can be acquired by convergent mechanisms. Moreover, hypothalamic and raphe 5-HT neurons express distinct paralogs of the 5-HT pathway markers: *tph1* and *sertb* in the hypothalamus, *tph2* and *serta* in the raphe (Lillesaar, 2011). The timing of their differentiation is also different. We propose that the different ways the anterior/hypothalamic

and the posterior/raphe neurons respond to the partial loss-of-function *mao* mutation in cavefish must be related to their distinct serotonergic identity conferred by their distinct embryonic origins. Hence, the cavefish used as a model for evolutionary biology can bring interesting insights, in a comparative perspective, to basic knowledge on neurotransmission homeostasis.

General considerations on MAO-dependent brain chemistry

In the cavefish brain, as expected, the P106L *mao* mutation increased the levels of 5-HT, DA and NA (except for 5-HT in the raphe, discussed above and below) and decreased the levels of their metabolites. These results are consistent with those found in MAO-A simple mutant or MAO-A/B double mutant mice, where the NA, 5-HT and DA levels are increased, and the 5-HIAA and DOPAC levels are decreased (Cases et al., 1995; Chen et al., 2004; Popova et al., 2001).

Here, we would like to discuss the sometimes-contrasting results observed in P106L *mao* mutants, *versus* acute deprenyl treatment, or else *versus* chronic deprenyl treatment. The P106L *mao* mutation changed DA and NA levels whereas acute or chronic deprenyl treatment did not. The later is consistent with Sallinen *et al.* (2009) who found an increase of 5-HT levels but not NA and DA levels after deprenyl treatment in larval zebrafish. Therefore, pharmacological and genetic interference, or acute and chronic interference on MAO function do not have the same outcomes on fish brain neurochemistry. In mammals too, such contrasting effects have been observed. Let's take the raphe as an example to discuss the possible underlying mechanisms.

The mammalian raphe receives noradrenergic projections from the locus cœruleus (Baraban and Aghajanian, 1981; Levitt and Moore, 1979) and is under tonic activation via α 1-adrenoreceptors (Baraban and Aghajanian, 1980). On the other hand 5-HT_{1A} autoreceptors and α 2-adrenoreceptors mediate an inhibitory effect on raphe 5-HT neuronal activity (Andrade et al., 2015; Numazawa et al., 1995; Raiteri et al., 1990; Starke et al., 1989; Tao and Hjorth, 1992; Trendelenburg et al., 1994). The 5-HT_{2A/2B/2C}, 4 and 6 receptors (Belmer et al., 2018; Boothman et al., 2006; Brouard et al., 2015; Liu et al., 2000; Lucas and Debonnel, 2002), the endocannabinoid system (Haj-Dahmane and Shen, 2011), and GABAergic neurons (Hernández-Vázquez et al., 2019) also modulate the 5-HT system. Little is known about serotonergic modulation in fish, but the teleost and mammalian monoaminergic systems share numerous similarities (Panula et al., 2006) and raphe 5-HT neurons can be considered homologous. Among others, projections to the raphe from the locus cœruleus (Ma, 1994), expression of α 2-adrenoreceptors and 5-HT_{1A} receptor in the raphe (Ampatzis et al., 2008; Norton et al., 2008) have been described in fish.

In mammals, acute MAO-A inhibition causes a decrease of firing activity of 5-HT dorsal raphe neurons (Blier and De Montigny, 1985). The underlying suggested mechanism is that MAO-A inhibition would increase levels of synaptic 5-HT, which normally activates inhibitory 5-HT_{1A} autoreceptors (Haddjeri et al., 1998). Along this line, 5-HT would accumulate both because of the reduction of 5-HT degradation by MAO-A after re-uptake, and because of the reduction of 5-HT released and re-uptaked due to the decrease of firing activity (Haddjeri et al., 1998).

Conversely, with a chronic MAO-A inhibition (chronic pharmacological treatment or MAO-A knockout), the increase in 5-HT levels are more moderate (Haddjeri et al., 1998). Also, a long-term treatment with befloxatone (MAO-A inhibitor) induces a desensitization of inhibitory α 2-adrenoreceptors (Blier and Bouchard, 1994; Mongeau et al., 1994; Owesson et al., 2002), and decreases their density (Cohen et al., 1982). Moreover, several studies suggested that a chronic MAO inhibition decreases the inhibition of firing rate mediated by 5-HT_{1A} autoreceptors (Evrard et al., 2002; Owesson et al., 2002; Palfreyman et al., 1986). Together these effects lead to suppression of 5-HT neurons inhibition. Some studies reported a complete recovery of the raphe firing activity with chronic treatment by clorgyline (MAO-A inhibitor) (Blier and De Montigny, 1985), while others reported that the firing activity of 5-HT neurons was still lowered by 40% in MAO-A KO mice (Evrard et al., 2002). In sum, different responses of the 5-HT raphe system to acute or chronic MAO inhibition are described in mammals: decrease of 5-HT raphe activity with acute inhibition, and complete or partial re-establishment of 5-HT raphe activity with chronic inhibition. Equivalent studies were not performed in fish, but give possible explanations to the different effects of acute (deprenyl) and chronic (P106L mutation) MAO inhibition on 5-HT raphe levels in fish.

Finally, we discovered a compensation to the effects of the P106L mutation by a decrease of tryptophan hydroxylase (TPH) activity in mutant CF, and in both parts of the brain. This could attenuate the increase of 5-HT levels in mutant CF, and explain why MAO enzymatic activity is proportionately more reduced than monoamine levels are enhanced in mutant brains. Of note, we did not detect such a significant reduction of TPH activity in our previous study when we used cavefish samples that were probably not genetically homogeneous (Elipot et al., 2014). This highlights the importance of re-examining all parameters in genetic lines with known genotypes, and the potential hidden pitfalls of working on natural, polymorphic populations. Further studies are needed to know if the expression of *tph* is decreased and, more generally, whether and how the brain transcriptome as a whole is profoundly affected or dys-regulated in the *mao* mutant context. The mechanism of the “TPH compensation” is also unknown, but one possibility could be that the excess of synaptic 5-HT leads to a negative feedback on 5-HT synthesis. For example, increased TPH activity has been shown after destruction of 5-HT-containing nerve terminals in mice (Stachowiak et al., 1986). But conversely, Popova *et al.* (2001) showed that in the MOA-A KO mice, the TPH activity in frontal cortex, hippocampus and amygdala was increased, which did not attenuate but rather aggravated the effects of MAO deficit. We can also wonder whether the synthesis of DA and NA is modified as well by the P106L mutation, which could compensate the increase of DA and NA levels in mutant CF. Indeed, in mammals, several studies showed modifications of TH activity after acute or chronic inhibition of MAO-B (Lamensdorf and Finberg, 1997; Vrana et al., 1992).

Conclusion and perspectives

Using the cavefish as a natural mutant, we have uncovered several novel aspects of monoaminergic regulation in fish. Fish are doubly special as compared to mammals because they have only one *mao* gene but possess diversified and diffuse clusters of monoaminergic neurons in their brains. However, they can serve as valuable models because most characteristics and most functions are shared with mammals. Our findings open a width of perspectives for future studies. This will include the understanding of the enigmatic differences in homeostatic properties between hypothalamic and raphe serotonergic neurons, or the deciphering of the probably complex plastic compensatory mechanisms that occur in the cavefish brains and allow them thrive in caves despite a deleterious mutation in a major enzyme, MAO.

Supplemental figure:

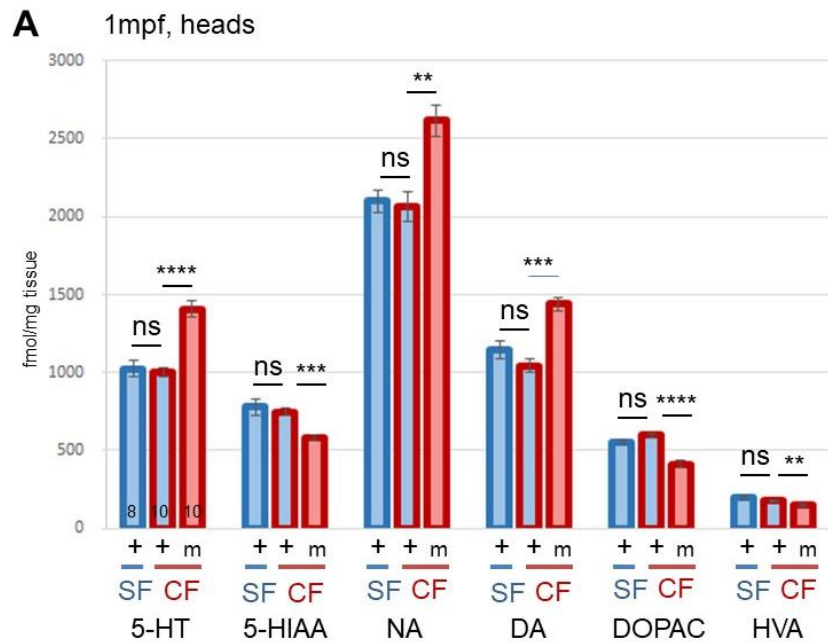


Figure Supp 1. Monoamine and metabolite levels in 1mpf *mao* mutant or non-mutant *A. mexicanus*.

(A) Measures of monoamines and metabolites in heads of 1 month-old juveniles in SF and CF, both mutant homozygotes (m) and non-mutant (+). Each sample corresponds to 10 heads of the same genotype.

The results were identical in the bodies (not shown).

Quelques résultats que nous n'avons pas inséré pour le moment dans le manuscrit, sont discutés ci-dessous en complément de l'article.

Annexe 4 : Rythmes circadiens des monoamines

Les vertébrés, et notamment les téléostéens, présentent des variations journalières des taux de monoamines (Fingerman, 1976; Khan and Joy, 1988). Or les *Astyanax* cavernicoles ont un rythme circadien altéré (Beale et al., 2013). Nous nous sommes donc demandé si les poissons cavernicoles présentaient toujours un rythme circadien des taux de monoamines.

Nous avons entraîné des poissons de surface et cavernicoles de 5 mois à un rythme 12h:12h LD (light-dark) pendant une semaine. Puis, nous avons disséqué le cerveau de trois poissons de chaque type toutes les deux heures pendant 26h et mesuré les taux de monoamines et de leurs métabolites par HPLC, dans les parties antérieures et postérieures du cerveau. Il s'agit du même protocole d'HPLC que celui décrit dans le deuxième article. Pour le moment, les données sont disponibles pour les poissons de surface et cavernicoles non mutés.

Nos résultats montrent, comme attendu, que des variations cycliques des taux de monoamines existent aussi chez l'*Astyanax* (Figure annexe 4). Les taux de sérotonine, dopamine et noradrénaline ont le même profil de variations circadiennes : les niveaux sont bas pendant la première partie de la nuit, puis ré-augmentent pendant la deuxième partie de la nuit pour être plus élevés pendant le jour. Les profils sont aussi similaires dans les deux parties du cerveau. Ces résultats sont cohérents avec les données collectées chez d'autres téléostéens, c'est à dire que les taux de sérotonine, dopamine et noradrénaline sont moins élevés la nuit (Fingerman, 1976; Khan and Joy, 1988). Huang et al. (2015) et Khan and Joy (1988) ont montré une expression et une activité MAO plus importantes la nuit, ce qui pourrait en partie expliquer les variations circadiennes des monoamines. De fait, l'expression du gène de la *mao* chez le poisson zèbre est modulée par des facteurs du rythme circadien, comme *Clock1a*, *Bmal1b*, *Per1b* et *Cry1ab* (Huang et al., 2015).

Dans notre étude, les variations des taux des métabolites ne sont pas toujours inversées aux variations des monoamines. C'est le cas uniquement pour le DOPAC dans la partie antérieure du cerveau, plus élevé la nuit que le jour, et chez les 2 morphes ; et, dans une moindre mesure, pour le 5HIAA mais cette fois dans la partie postérieure du cerveau seulement. Hormis pour ces cas, les variations circadiennes des monoamines ne peuvent donc pas s'expliquer uniquement par la variation de l'activité MAO. Il est aussi intéressant de noter que les différences régionales observées entre les parties antérieures et postérieures du cerveau confortent l'idée que les groupes de neurones sérotonergiques et dopaminergiques de l'hypothalamus (au sens large) présentent des propriétés régulatrices distinctes de celles du cerveau postérieur (raphé et noyaux catécholaminergiques).

Les variations des taux de monoamines chez le poisson cavernicole non mutés suivent très fidèlement les variations des poissons de surface. Dans ces conditions expérimentales, c'est-à-dire avec un entraînement au rythme jour-nuit, le rythme circadien des monoamines des poissons cavernicoles n'est pas altéré. Il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences sans entraînement jour-nuit afin de voir si ce rythme persiste chez les poissons cavernicoles.



Nous avons aussi réalisé cette manipulation sur les poissons cavernicoles porteurs de la mutation P106L, mais nous n'avons pas encore pu analyser les résultats en raison de la crise du Covid-19. Etant donné que les taux de monoamines chez ces poissons sont totalement altérés par la mutation, il sera intéressant de savoir si un rythme circadien des taux de monoamines persiste ou non.

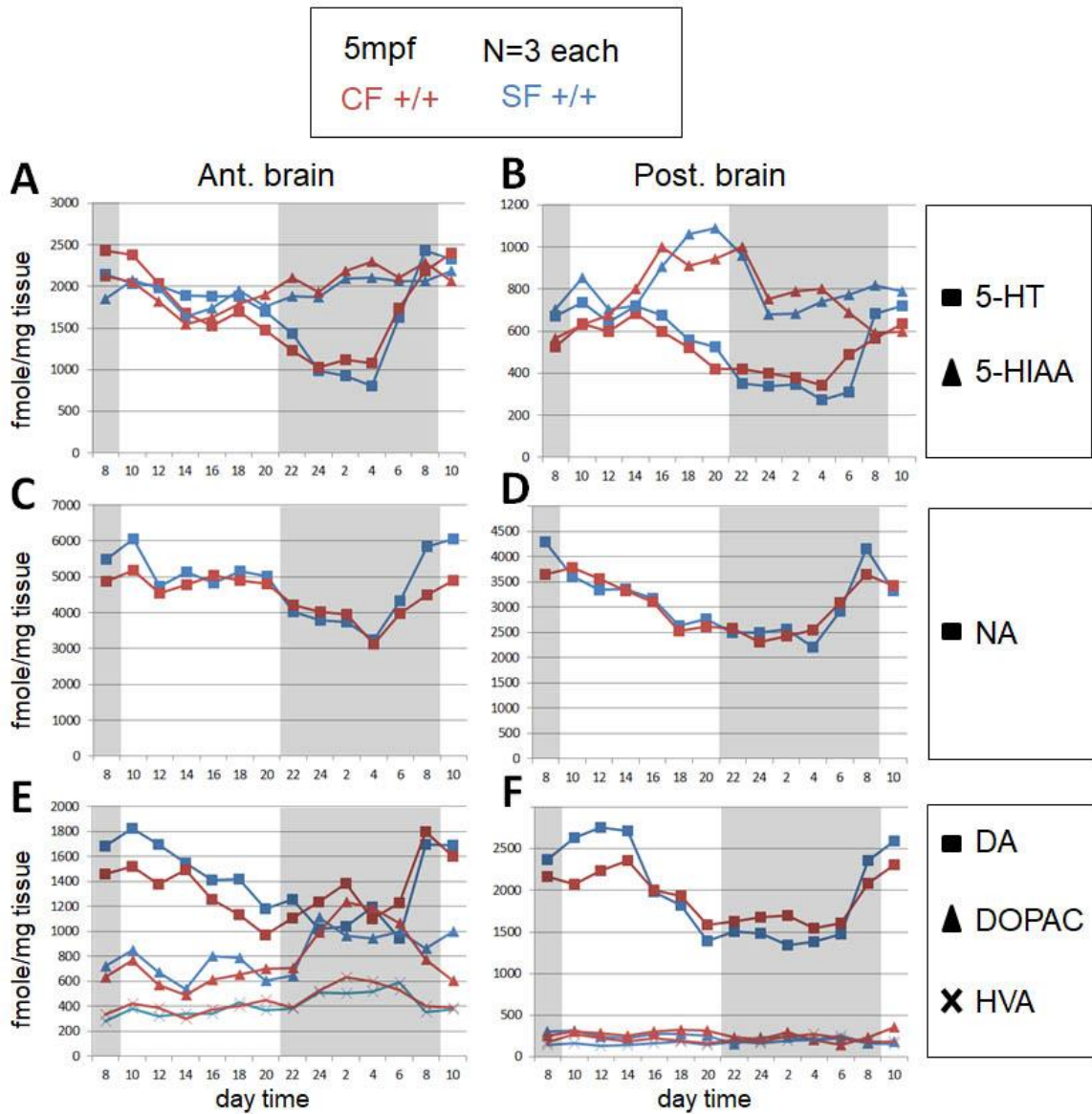


Figure Annexe 4. Variations circadiennes des taux de monoamine et de leurs métabolites.

(A, B) Taux de sérotonine (5-HT) et du métabolite 5-HIAA dans les parties antérieure (A) et postérieure (B) du cerveau.

(C, D) Taux de noradrénaline (NA) dans les parties antérieure (C) et postérieure (D) du cerveau.

(E, F) Taux de dopamine (DA) et des métabolite DOPAC et HVA dans les parties antérieure (E) et postérieure (F) du cerveau.

Les mesures ont été réalisées chez des poissons de surface wt (bleu) et des poissons cavernicoles non porteurs de la mutation P106L (rouge). Les résultats pour les poissons cavernicoles mutés sont en attente. Pour chaque point, n=3 poissons.

Génération et début de caractérisation de deux lignées *Astyanax* de surface *mao* knockout (KO)

En regard des études reportées dans les deux articles précédents, nous avons tenté de générer le poisson de surface porteur de la mutation P106L avec la technologie CRISPR-Cas9. Le but était d'obtenir une lignée de poissons de surface mutante, dans un fond génétique 100% SF – ce qui n'est pas le cas avec la méthode des backcross que nous avons utilisée en parallèle et qui a porté ses fruits. Malgré des efforts importants, l'édition de génome pour remplacement d'allèle n'a pas fonctionné. Mais nous avons rapidement et avantageusement produit deux lignées de poissons de surface knockout (KO) pour le gène *mao*. Il s'agit, à notre connaissance du premier poisson KO *mao*. Sa caractérisation nous permettra non seulement de mieux cerner les effets de la mutation P106L sur le phénotype, en « aggravant » la perte de l'activité enzymatique de la MAO, mais aussi, et plus généralement, de mieux comprendre l'implication des monoamines sur le développement du cerveau, la physiologie et les comportements chez le poisson.

Matériel et méthodes

Presque tous les protocoles sont décrits dans la section « Methods » de l'article 1. Les protocoles non décrits dans cette section sont les suivants :

-Les lignées KO pour la MAO ont été obtenues par la technologie CRISPR-Cas9. Ces expériences ont été réalisées par un post-doctorant de l'équipe, Jorge Torres-Paz. Des sgRNA ont été dessinés pour cibler la séquence génomique de la *mao* contenant la position polymorphique SF/CF (Fig. 1A), en utilisant le site CRISPOR-TEFOR. Deux sgRNA ont été testés, et ils ont tous deux généré des indels au niveau de la séquence ciblée.

Un mix de Cas9 mRNA (200ng/μL), sgRNA1 or sgRNA3 (500 ng/μL) et phenol red (0.05%) a été injecté dans des embryons SF au stade 1-cellule. Les embryons injectés (G0 ; fondateurs) ont été élevés jusqu'à l'âge adulte, et leur descendance (G1) criblée et génotypée pour des mutations indels (Fig. 1B). Le génotypage a été réalisé sur Labchip GX touch (Perkin Elmer).

-Les tailles des cerveaux des poissons de 6 dpf ont été mesurées sur les images DAPI prises en même temps que les images du système dopaminergique.

-Mesure de la motilité intestinale : le même protocole que celui décrit dans (Riddle et al., 2018a) a été utilisé. Des embryons de 8dpf ont été anesthésiés dans une solution avec 140 ppm de tricaine. Leur tube digestif a ensuite été filmé en prenant une image toutes les secondes pendant 15 minutes, puis des kymographes ont été produits pour chaque poisson.

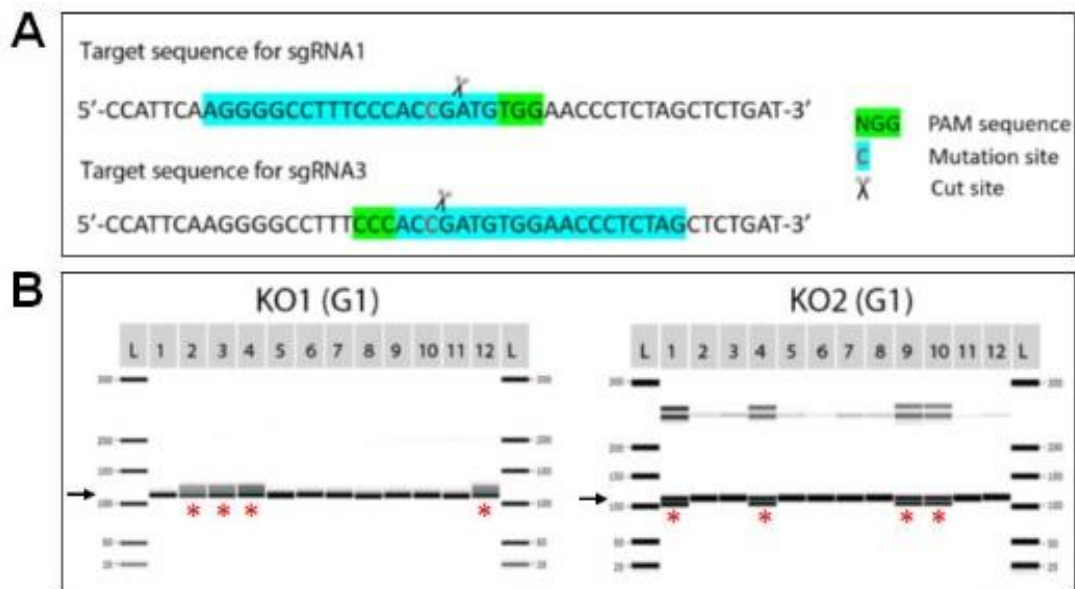


Figure 1. Génération de lignées *A. mexicanus* SF knockout pour le gène *mao* par CRISPR-Cas9.

(A) Séquences ciblées par les sgRNA dessinés sur l'exon 4 du gène *mao*. Le site de coupure désiré est au niveau de la mutation ponctuelle C>T conduisant à la mutation P106L chez le CF, car notre ambition était initialement de réaliser de l'édition de génome pour générer un poisson de surface porteur de la mutation, en co-injectant un oligonucléotide de réparation. Ici, il s'agit d'une « simple » inactivation de gène par CRISPR-Cas9, par génération d'indels au site de coupure. (B) Génotypage par Labchip sur des poissons G1 (1^{ère} génération), c'est-à-dire les descendants des poissons G0 injectés. A gauche, la lignée KO1, et à droite, la lignée KO2. Les astérisques rouges indiquent les individus hétérozygotes portant un indel dans l'exon 4, ce qui se manifeste par l'apparition de plusieurs bandes correspondant à des hétéroduplexes du fragment de PCR. La flèche noire indique la bande normale attendue.

Résultats

Génération de lignées *mao* KO

Le crible des SF G0 injectés (mosaïques) a révélé 26 adultes porteurs de 1 à 6 mutations différentes dans la lignée germinale (moyenne : 1.69). Le taux moyen de transmission des mutations en G1 était de 8.7% (entre 3.1% et 36.3%). Deux lignées mutantes indépendantes ont été établies et gardées à l'état hétérozygote (Figure 1B). L'une présente une délétion de 1 nucléotide (lignée appelée KO1), l'autre de 11 nucléotides (KO2) (Jorge Torres-Paz) (Figure 2A et 2B). Les deux délétions décalent le cadre de lecture à partir du 106^{ème} acide aminé de la protéine (sur 522). Ceci fait apparaître des codons STOP et donne des protéines tronquées de 146 et 127 acides aminés pour les mutations KO1 et KO2 respectivement. Une vérification de la perte totale d'activité enzymatique chez les KO homozygotes était prévue, et les échantillons ont été générés, mais à cause de l'épidémie de CoVid-19, ils n'ont pas pu être analysés à temps. Etant donné l'importance de la délétion, nous pouvons raisonnablement postuler que la perte de fonction est quasi-totale.

En croisant les poissons portant la mutation KO à l'état hétérozygote entre eux (des lignées KO1 ou KO2), on obtient théoriquement la moitié d'embryons hétérozygotes (+/-), un quart d'embryons non mutants (+/+), et un quart d'embryons KO homozygotes (-/-). Pourtant, en génotypant les poissons des pontes à l'âge de 2 mois (ce qui correspond à un âge où le poisson est assez grand pour pouvoir prélever un morceau de nageoire suffisamment gros pour le génotypage, mais sans provoquer de dommages irréversibles sur le poisson), aucun poisson KO -/- n'a été détecté. Ce résultat est très reproductible : aucune ponte, provenant des lignées KO1 et KO2 n'a fourni de poisson -/- à 2 mois. En revanche, en génotypant les poissons à l'âge de 6 dpf, nous avons détecté des poissons -/-. Un génotypage à 6 dpf donne 24% et 28% de poissons -/- pour les lignées KO1 et KO2

respectivement (Figure 2C). Ces observations montrent que la mutation *mao* KO à l'état homozygote provoque la mort des poissons au cours du développement. Celle-ci commence après 6 dpf, puisque les pourcentages de poissons -/- sont aux alentours des 25% attendus à ce stade, et tous les poissons -/- meurent avant l'âge de 2 mois.

Nous avons commencé le phénotypage des poissons KO *mao* -/- et +/- . Toutes les mesures n'ont pas été faites sur les deux lignées de poissons knockout (KO1 et KO2), mais toutes les mesures faites sur les deux lignées donnent des résultats semblables entre les deux lignées.

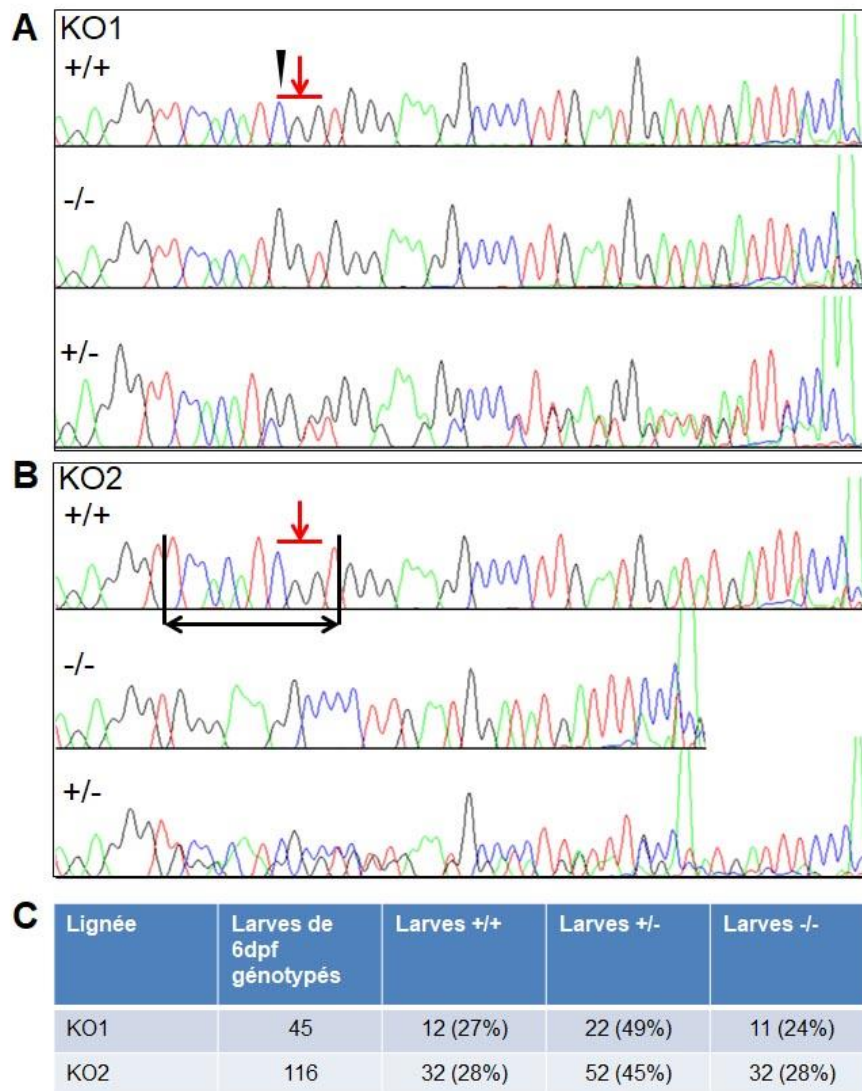


Figure 2. Les deux lignées *A. mexicanus* SF knockout pour le gène *mao*.

(A,B) Chromatogrammes montrant la séquence appartenant à l'exon 4 du gène *mao* pour les poissons des lignées KO1 (A) et KO2 (B). La première ligne correspond à la séquence de poissons non mutants (+/+), la deuxième ligne à celle des poissons KO (-/-), et la troisième ligne à celle des KO hétérozygotes (+/-). La flèche rouge représente le codon du 106^{ème} acide aminé, les marquages en noir les nucléotides délétés. Le décalage du cadre de lecture provoqué est clairement visible sur les chromatogrammes des hétérozygotes.

(C) Nombres et pourcentage de chaque génotype à 6 dpf dans les pontes issues de poissons hétérozygotes +/- pour chaque lignée.

Aspect général

L'aspect des poissons de toutes les lignées (SF, CF, mutants P106L ou non, KO ou non) a été comparé à 8dpf (Figure 3). La présence ou non de la mutation P106L ne modifie pas l'aspect des poissons, que ce soit chez les morphes de surface ou cavernicoles. Les poissons KO +/- ont aussi un aspect normal. En revanche, les poissons *mao* -/- (KO2) semblent plus petits et voutés que leurs frères non mutants (+/+).

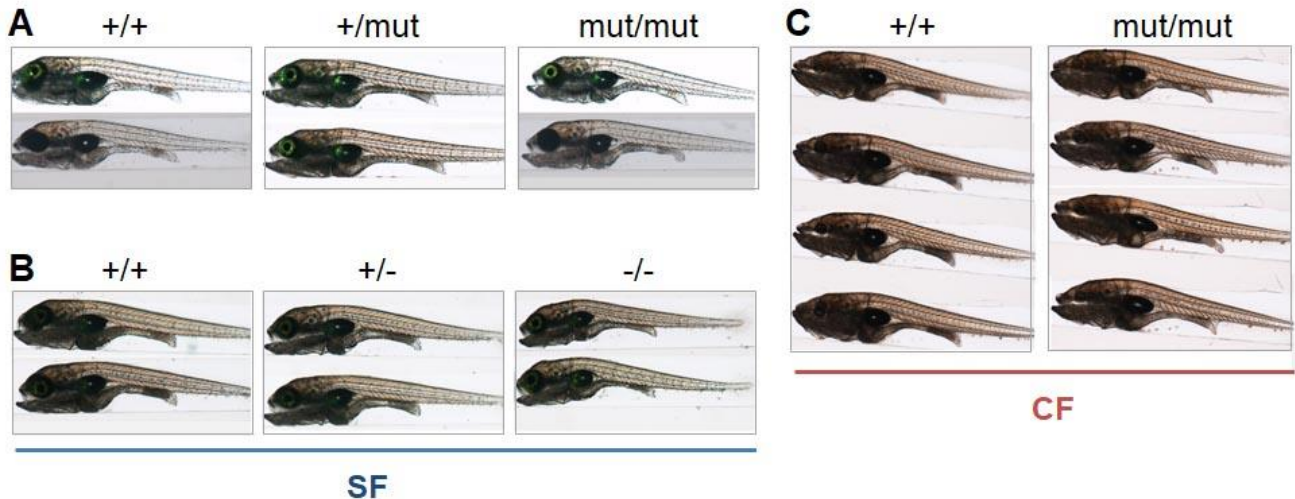


Figure 3. Aspect comparé des poissons *mao* mutants P106L, KO et non mutants de 8dpf.

(A) Comparaison des poissons de surface porteurs de la mutation P106L à l'état homozygote (mut/mut), et de leurs frères hétérozygotes (+/mut) ou non mutants (+/+).

(B) Comparaison des poissons de surface porteurs de la mutation KO (lignée KO2) à l'état homozygote (-/-), et de leurs frères hétérozygotes (+/-) ou non mutants (+/+).

(C) Comparaison des poissons cavernicoles porteurs de la mutation P106L à l'état homozygote (mut/mut), et les poissons non mutants (+/+).

Les poissons font environ 5mm de long.

Bien que la sérotonine ait un effet sur le rythme, le développement et la fonction cardiaque chez les souris (Abzalov et al., 2015; Mialet-Perez et al., 2018; Nebigil and Maroteaux, 2001; Nebigil et al., 2000; Stoyek et al., 2017), les SF *mao* -/- (KO2) ont le même rythme cardiaque à 8dpf que leurs frères non mutants ou +/- (Figure 4A).

La locomotion des poissons *mao* -/- de 8dpf n'a pas été mesurée, mais visuellement, elle ne semble pas être gravement impactée. Les poissons -/- (KO1 et KO2) présentent toujours des épisodes de nage en burst, apparemment normaux.

Même si les poissons SF *mao* -/- (KO1) semblent plus chétifs que leurs frères, la taille de leur cerveau à 6dpf est la même (Figure 4B).

Note : il existe des différences significatives de taille du cerveau entre les pontes, y compris appartenant à un même génotype. La Figure 4C montre une différence de taille du cerveau entre deux pontes de poissons de surface WT au même âge. Pour connaître l'effet de la mutation KO sur le phénotype, il vaut donc mieux comparer les individus d'une même ponte entre eux, et ne pas prendre en compte la différence de taille observée entre les poissons WT et les poissons +/+.

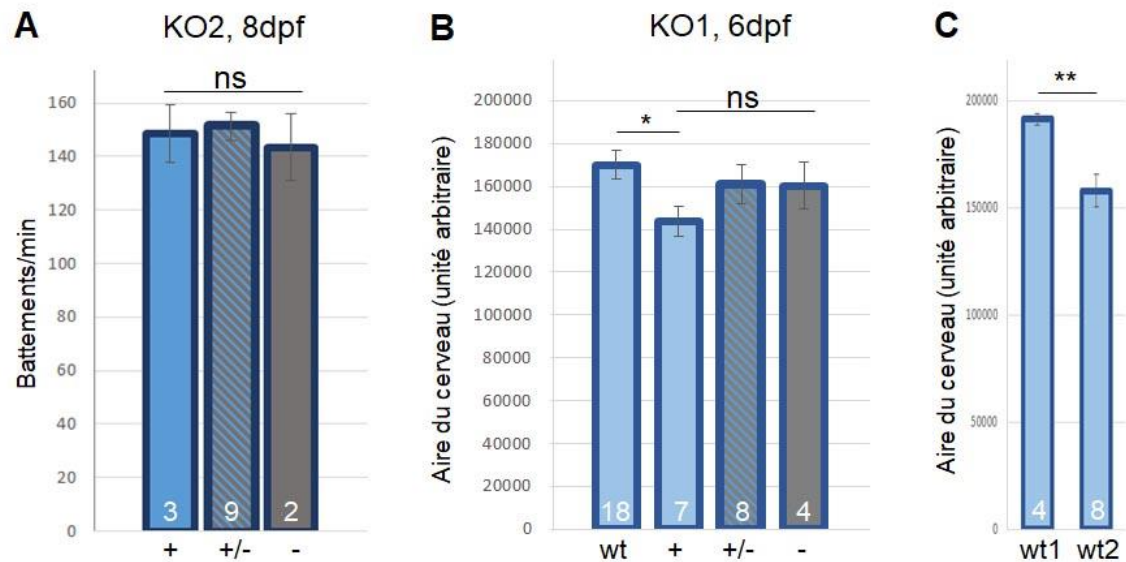


Figure 4. Rythme cardiaque et taille du cerveau des poissons -/-.

(A) Rythme cardiaque de poissons -/- (-) (KO2) et de leurs frères hétérozygotes (+/-) ou non mutants (+), à 8dpf.

(B) Aire du cerveau des poissons -/- (-) (KO1) et de leurs frères hétérozygotes (+/-) ou non mutants (+, deuxième barre) (même ponte). La première barre correspond à des poissons wt (+/+) issus d'autres géniteurs.

(C) Aire du cerveau de poissons wt (+/+) issus de deux pontes différentes, illustrant la variabilité.

Neuroanatomie des systèmes dopaminergique et sérotoninergique

Nous avons ensuite comparé la neuro-anatomie des systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques des poissons de surface KO avec leurs frères non mutants, à 6dpf.

Le système dopaminergique des SF *mao* -/- (KO1 et KO2) ne diffère pas de celui de leurs frères +/- et +/+. Tous les noyaux dopaminergiques sont présents et d'aspect identique (Figure 5A et 5B). Pour la presque totalité des noyaux dopaminergiques, le nombre de cellules TH-positives est le même pour tous les poissons d'une ponte (+/+, +/- et -/-) (KO1 et KO2) (Figure 5C). Seul le nombre de cellules du noyau suprachiasmatique (Sup) diffère entre les poissons -/- et +/- de la lignée KO1 et entre les poissons +/+ et +/- de la lignée KO2. Ces mesures n'ont été réalisées qu'une seule fois pour chaque lignée (donc une seule ponte étudiée pour chaque lignée) et doivent être répliquées pour pouvoir conclure sur un éventuel effet de la mutation KO sur le nombre de cellules suprachiasmatiques. Ces données suggèrent que l'inactivation du gène *mao* n'a pas ou très peu d'effet sur le développement, le nombre et l'organisation des neurones dopaminergiques.

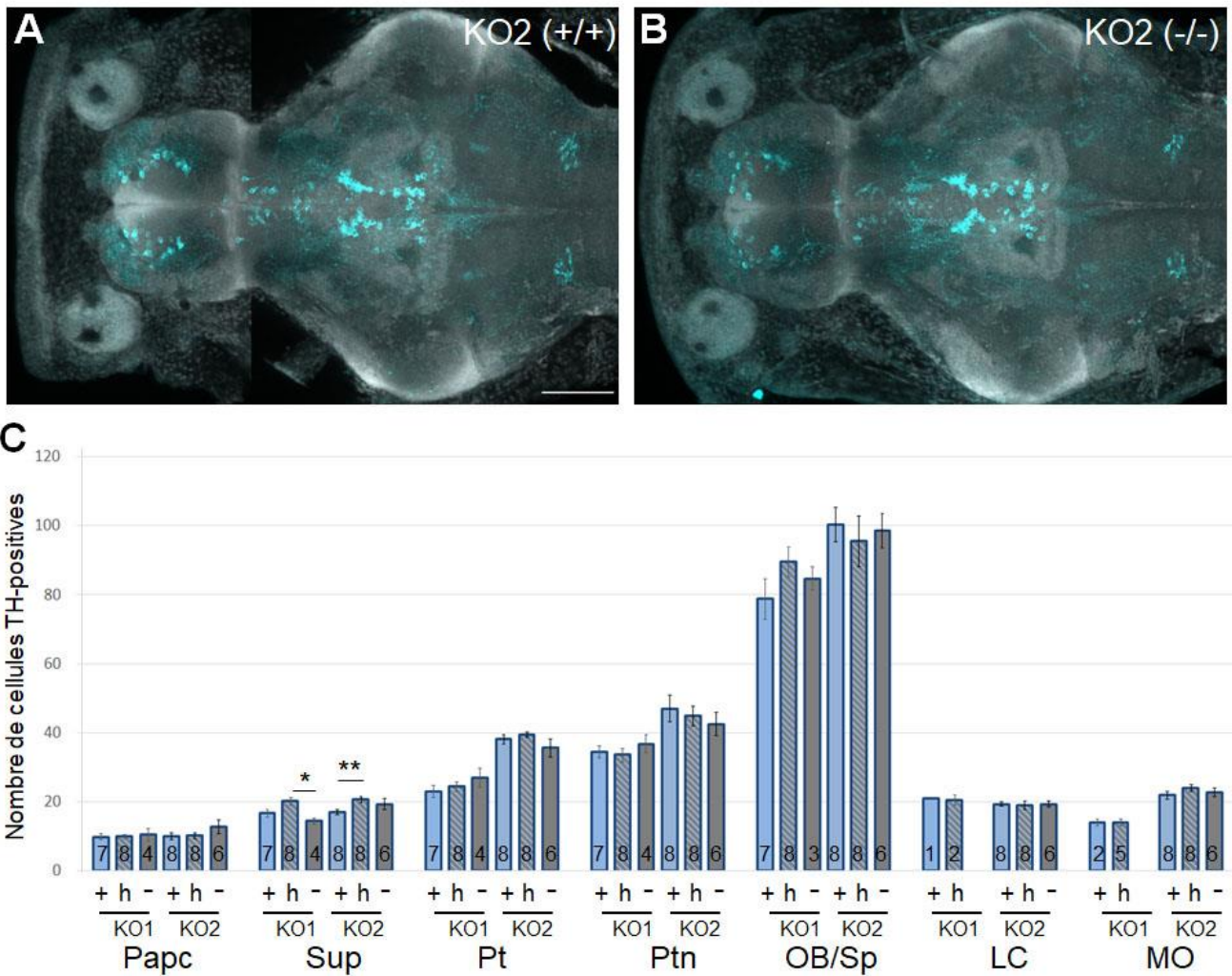


Figure 5. Système dopaminergique des poissons *SF mao* $-/-$ à 6 dpf.

(A,B) Projections d'images confocales de cerveaux entiers montrant une vue générale des cellules TH-positives chez un poisson $-/-$ (KO2) (B) et l'un de ses frères non mutant $+/+$ (A), à l'âge de 6 dpf. Echelle : 100 μ m.

(C) Nombre de cellules TH-positives dans les noyaux préoptique antérieur parvocellulaire (Papc), suprachiasmatique (Sup), le tubercule postérieur (Pt), le noyau tubéral postérieur (Ptn), les bulbes olfactifs/subpallium (OB/Sp), le locus coeruleus (LC) et la medulla oblongata (MO). Les comptages ont été effectués sur des poissons des deux lignées (KO1 et KO2), et des poissons des trois génotypes ($-/-$, $+/-$ et $+/+$). Pour le LC et la MO, aucun comptage n'a été fait pour les poissons $-/-$ de la lignée KO1, à cause d'une mauvaise qualité de marquage dans la partie dorsale des embryons.

Contrairement au système dopaminergique, le système sérotoninergique des *SF mao* $-/-$ (KO1 et KO2) est lourdement impacté. Les cellules sérotoninergiques des noyaux de l'hypothalamus PVa, PVi et PVp ne sont pas détectées par immunohistochimie (anticorps anti-5-HT) (Figure 6AB). Sur certaines préparations, elles apparaissent comme une « ombre ». En revanche, les cellules du raphé présentent un marquage qui ne diffère pas de celui des poissons $+/-$ et $+/+$. Aucune différence de marquage n'est observée entre les poissons $+/-$ et $+/+$ (KO1 et KO2). En plus du marquage quasi inexistant dans l'hypothalamus, les poissons $-/-$ (KO1 et KO2) présentent un plus fort marquage dans le prétectum (Figure 6C), ainsi que des cellules 5-HT-positives ectopiques dans le rhombencéphale dorsal (Figure 6C), à l'extrémité de la corde (Figure 6DE), et dans la glande pituitaire (Figure 6E). Le marquage dans la glande pituitaire est très variable d'un individu à l'autre : certains poissons $-/-$ présentent un marquage très faible, peu différent de celui des poissons $+/+$ et $+/-$, tandis que d'autres ont un marquage très fort (Figure 6E).

L'aire du PVa et du PVi des poissons $+/-$ est plus grande que chez les poissons $+/+$. L'aire du PVp ne diffère pas. L'aire du raphé est plus grande chez les poissons $-/-$ que les poissons $+/+$ et $+/-$ (KO1). L'inactivation du gène

mao augmenterait donc la taille du PVa, PVi et du raphé. La taille des clusters 5-HT chez les SF *mao* *-/-* n'a pu être analysée puisque le marquage est absent. L'ensemble de ces données suggère que l'inactivation du gène *mao* a des conséquences majeures sur le développement, l'organisation et le nombre des cellules sérotoninergiques chez le poisson.

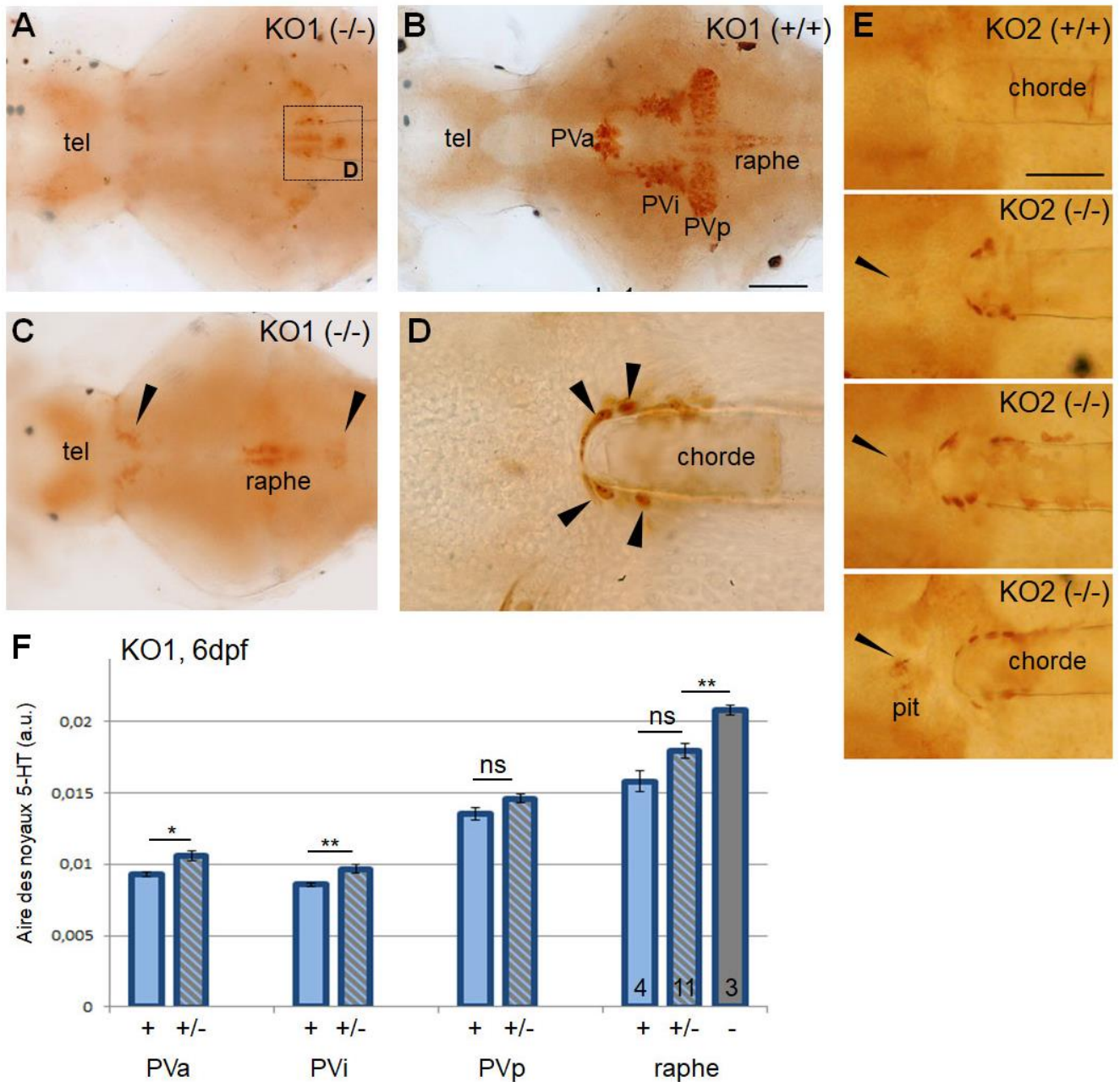


Figure 6. Système sérotoninergique des poissons *-/-* à 6dpf.

(A-C) Image de cerveaux entiers montrant une vue générale des cellules 5-HT-positives chez un poisson *-/-* (KO1) (A et C) et l'un de ses frères non mutant *+/+* (B), à l'âge de 6dpf. Echelle : 100µm. Les images A et B sont des projections, l'image C est prise en faisant le focus sur la partie dorsale du cerveau, permettant de mieux distinguer le marquage dans le prétectum et le rhombencéphale (flèches).

(D et E) Images de l'extrémité de la corde chez des poissons *-/-* (KO1 : D et KO2 : E) et *+/+* (E). Echelle 50µm. Les images montrent les cellules 5-HT positives ectopiques à l'extrémité de la corde, et un marquage variable dans la glande pituitaire chez les poissons *-/-*, mais néanmoins plus fort que chez les poissons *+/+*.

(F) Quantification des aires des noyaux sérotoninergiques chez les poissons *-/-*, *+/-* et *+/+* (KO1).

Motilité intestinale

La sérotonine est fortement impliquée dans la fonction intestinale, et notamment la motilité (Bülbring and Crema, 1958; Gershon, 2013; Mawe and Hoffman, 2013). Un déficit de la fonction intestinale pourrait causer la taille réduite des poissons $-/-$. Des mesures de motilité intestinales ont été commencées chez des embryons de 8dpf (KO2). Les poissons $-/-$ présentent une motilité intestinale qualitativement similaire à celle des poissons $+/+$ et $+/-$ (Figure 7). Nous n'avons malheureusement pas pu réaliser d'étude quantitative par manque de temps.

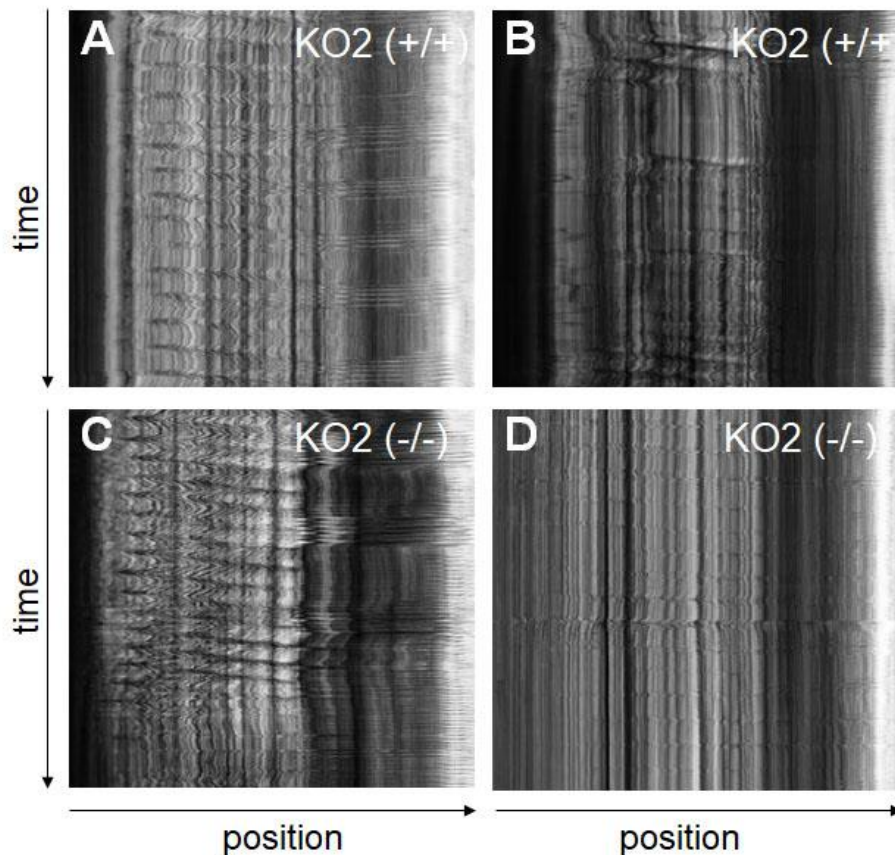


Figure 7. Motilité intestinale des poissons *SF mao* $-/-$ à 8dpf.

Exemples de kymographes pour des poissons $-/-$ (C et D; KO2) et $+/+$ (A et B). L'ordonnée représente le temps, l'abscisse le long du tube digestif depuis l'estomac jusqu'au rectum. Les vagues de péristaltisme sont très visibles sur les images A et C. Les poissons des deux génotypes ($+/+$ et $-/-$) ont des phases où le péristaltisme est intense (A et C), et d'autres phases où il est moins intense (B et D).

Comportement des poissons KO hétérozygotes ($+/-$)

Les études du comportement ont été réalisées sur des poissons de 3 à 5 mois, donc uniquement sur les poissons $+/-$ et $+/+$, puisque les poissons $-/-$ meurent avant l'âge de 2 mois.

Aucune différence d'agressivité n'a été observée entre les poissons $+/-$ (KO1 et KO2) et leurs frères $+/+$ (Figure 8B).

Les distances interindividuelles et les distances avec le plus proche voisin des *SF mao* $+/-$ (KO1 et KO2) sont plus petites à la lumière qu'à l'obscurité, montrant que les poissons se regroupent. Aucune différence dans ces distances n'a été détectée entre les poissons $+/-$ et $+/+$. Le regroupement en banc est donc similaire entre les poissons $+/-$ et $+/+$ (Figure 8A).

La locomotion des poissons a été mesurée chez des poissons seuls et après une heure d'habituat. A l'âge de deux mois, les poissons +/- (KO1 et KO2) parcourent plus de distance que les poissons +/+. Cette différence disparaît à 5 mois (pour KO1 ; KO2 non testé) (Figure 8C et D).

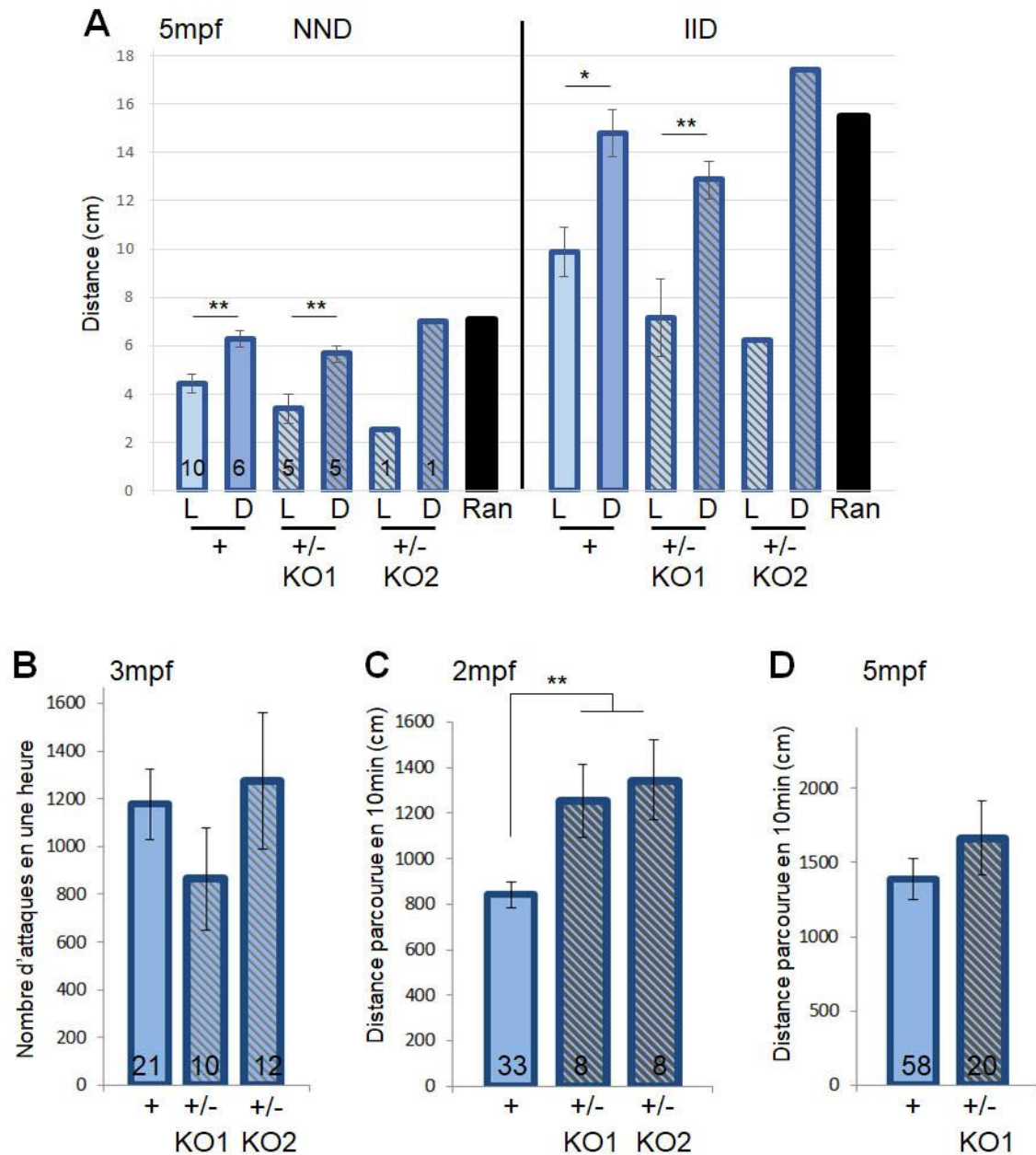


Figure 8. Nage en banc, agressivité et locomotion des poissons *SF mao* +/- jeunes adultes.

(A) Distances avec le plus proche voisin (NND) et distances interindividuelles (IID) pour des groupes de 6 poissons +/+ ou +/- (KO1 et KO2). Les mesures ont été réalisées à la lumière (L) ou à l'obscurité (D). Les valeurs obtenues avec une répartition aléatoire des poissons est aussi notée (ran).

(B) Nombre d'attaques en une heure dans un test résident-intrus pour des poissons +/+ et +/- (KO1 et KO2).

(C, D) Distance parcourue en 10min après 1heure d'habituat en solo dans un nouvel environnement pour des poissons de 2 mois (C) ou de 5 mois (D), +/+ et +/-.

Discussion

Des lignées knockout pour la MAO sont décrites dans la littérature chez la souris, avec l'inactivation du gène *MAO-A*, *MAO-B* ou des deux. Mais à notre connaissance, nous avons ici généré le premier poisson knockout pour le gène *mao*.

Les poissons *-/-* semblent plus petits que les poissons *+/+*, ou même que les poissons hétérozygotes *+/-*. Les souris double knockout *MAO-A* et *MAO-B* présentent aussi un poids diminué comparé aux souris WT (Chen et al., 2004). La cause de ce poids diminué n'est pas connue. Il pourrait être dû à l'hyperactivité ou l'anxiété chronique de ces souris (Chen et al., 2004). De plus, étant donné l'implication de la sérotonine dans la fonction digestive et le contrôle de la prise alimentaire, les souris *MAO-A/B* KO pourraient avoir un contrôle de la prise alimentaire perturbé.

Le phénotype le plus marquant chez les poissons SF *mao -/-* est sans aucun doute la perte de marquage sérotoninergique dans l'hypothalamus. Il pourrait être dû à une absence de développement des neurones sérotoninergiques, un défaut de synthèse de sérotonine dans ces neurones, ou encore à une apoptose des neurones. Le fait que le marquage soit toujours présent quoique très léger chez certaines larves *mao -/-* laisse supposer un défaut de synthèse de la sérotonine. Des mesures d'activité de la TPH devront être réalisées. Nous prévoyons aussi d'analyser le développement précoce des neurones 5-HT hypothalamiques, dès 18-20hpf (Elipot et al., 2013) afin de comprendre si le défaut de synthèse de sérotonine apparaît dès la différenciation ou s'il se manifeste progressivement. Ces expériences pourraient aussi permettre d'estimer l'effet du KO *mao* sur le contrôle du nombre de neurones 5-HT hypothalamiques.

Le raphé en revanche présente un marquage normal. La présence de la MAO est donc nécessaire au développement et à l'expression du phénotype complet des neurones sérotoninergiques de l'hypothalamus, mais ne semble pas nécessaire à celui des neurones du raphé. Le développement des neurones sérotoninergiques de l'hypothalamus et du raphé n'impliquent pas les mêmes réseaux de gènes. Par exemple, le facteur de transcription Pet-1 est nécessaire au développement des neurones sérotoninergiques du raphé (Alenina et al., 2006; Deneris and Wyler, 2013; Kiyasova and Gaspar, 2011), mais n'est pas exprimé dans l'hypothalamus (Lillesaar et al., 2007). Ou encore, la *tph2* est exprimée par les neurones du raphé mais pas ceux de l'hypothalamus (qui expriment *tph1*); d'ailleurs les poissons zèbres mutants *tph2^{-/-}* ont un système sérotoninergique « en miroir » de celui des *Astyanax mao^{-/-}* : leurs clusters 5-HT hypothalamiques sont intacts, mais leur raphé est indétectable par immuno-histochimie anti-sérotonine (Oikonomou et al., 2019).

Les poissons hétérozygotes *+/-* semblent avoir un PVA et PVI plus gros que les poissons *+/+*. Ceci est surprenant puisque la mutation P106L, entraînant aussi une inactivation (partielle) de la MAO, ne modifie pas la taille de ces noyaux. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la mutation KO à l'état hétérozygote induit un effet plus important que la mutation P106L, même à l'état homozygote. Il était prévu de comparer les activités MAO chez ces poissons, et les échantillons ont été préparés, mais nous n'avons pas pu les analyser (coronavirus). Nous ne pouvons donc pas conclure. De plus, les expériences doivent être répliquées, notamment avec l'autre lignée de KO (KO2).

Nous avons montré l'existence de cellules sérotoninergiques ectopiques chez les poissons SF *mao -/-*. Ceci est cohérent avec l'étude de Sallinen et al., (2009) qui ont montré qu'un traitement chronique au deprenyl induisait l'apparition de cellules 5-HT-positives dans le diencephale. Ces cellules n'apparaissent pas avec un traitement par un inhibiteur de la recapture de la sérotonine (fluvoxamine), suggérant que ces cellules 5-HT positives ectopiques recapturent la sérotonine mais ne la synthétisent pas.

Le fait que le système dopaminergique soit normal chez les poissons SF *mao -/-* est surprenant, puisque les systèmes sérotoninergique et dopaminergiques sont en interaction (Di Giovanni et al., 2008; Di Giovanni et al., 2010) et que le système sérotoninergique est connu pour moduler le développement de ses cibles (Lauder, 1993; Pérez et al., 2013; Urtikova et al., 2009; Vitalis et al., 2013; Whitaker-azmitia et al., 1996).

Les souris KO pour le gène *MAO-A*, ou double KO *MAO-A* et *MAO-B* sont très agressives et présentent des troubles autistiques (Cases et al., 1995; Chen et al., 2004). Pourtant, nous n'avons pas observé de différence d'agressivité ou de nage en banc entre les poissons hétérozygotes *+/-* et les poissons *+/+*. Mais ces résultats

sont cohérents avec nos précédents résultats sur les poissons mutants P106L, où aucune différence d'agressivité et de nage en banc n'ont été montrées.

Les souris *MAO-A/B* KO sont hyperactives (Chen et al., 2004). Nous n'avons pas noté de différence de locomotion notable entre les larves *-/-* et *+/+* de 8dpf, mais nous n'avons pas réalisé de mesure quantitative. En revanche, nous avons montré que la locomotion des poissons hétérozygotes *+/-* est plus élevée que celle des poissons *+/+* à 2 mois, et cette différence s'estompe néanmoins à 5 mois. La locomotion a été mesurée après une heure d'habituation, et nous supposons que chez *Astyanax*, ce laps de temps n'est pas suffisant pour réduire le stress engendré par le nouvel environnement. De plus, le poisson de surface est social et fait plus de « freezing » lorsqu'il est seul (observations personnelles). Le protocole utilisé ne permet donc pas de mesurer la locomotion non parasitée par des comportements de stress. La différence de distance parcourue à deux mois pourrait s'expliquer par une différence de stress ou d'expression des comportements de stress. Les poissons *+/+* pourraient être plus immobiles, les poissons *+/-* présenter plus de thigmotactisme. Un stress modifié chez les poissons *+/-* ne serait pas une hypothèse aberrante compte tenu d'une part de l'implication de la mutation P106L dans le stress et d'autre part du marquage sérotoninergique dans la glande pituitaire qui semble être plus important chez les poissons *-/-* à 6 dpf. D'autres études seront nécessaires pour comparer le stress chez ces poissons, notamment des mesures de cortisol et de comportement de stress.

Les poissons *-/-* meurent au cours de leur développement, à un stade compris entre 6 dpf et deux mois. La cause de la mort n'est pas connue, mais nous pouvons néanmoins émettre quelques hypothèses. L'hypothalamus contrôle la prise alimentaire chez les poissons (Lin et al., 2000) et nous avons montré que le système sérotoninergique de l'hypothalamus était gravement impacté chez les poissons *-/-*. L'hypothèse d'une prise alimentaire diminuée chez ces poissons est à considérer. Lors des premiers jours de développement, les poissons utilisent les réserves de leur vitellus. Les alevins d'*Astyanax* commencent à se nourrir vers 5dpf lorsque leur bouche s'est ouverte, mais les réserves vitellines ne s'épuisent réellement qu'au bout de 10dpf. Le moment de la mort des poissons *-/-* pourrait coïncider avec l'épuisement de leurs réserves de vitellus. Une diminution de la prise alimentaire et l'épuisement de leurs réserves pourrait provoquer leur mort. L'hypothèse d'un défaut de croissance ou de maturation des organes peut aussi être envisagée, puisque les poissons *SF mao -/-* ont une taille réduite et un marquage 5-HT dans la glande pituitaire altéré.

Le système sérotoninergique intervient dans beaucoup d'autres fonctions, il est donc possible que la mort des poissons *-/-* soit provoquée par un faisceau de caractères dysfonctionnels.

Discussion générale, conclusions, perspectives

Mon projet de thèse consistait en l'étude de la mutation MAO P106L découverte chez un poisson cavernicole, depuis l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle des populations.

A l'échelle moléculaire, nous avons pu montrer des changements de structure secondaire entre les protéines mutées et non mutées, s'accompagnant vraisemblablement de modifications de flexibilité à l'entrée du site actif.

A l'échelle des neurotransmetteurs, nous avons montré des modifications drastiques de taux de monoamines et de leurs métabolites chez les poissons mutés, avec notamment une augmentation des taux de sérotonine.

Nous ne connaissons pas l'effet de la mutation sur l'intensité de la neurotransmission monoaminergique. En effet, les forts taux de monoamines dans le cerveau des poissons porteurs de la mutation ne s'accompagneraient pas forcément d'une augmentation de la neurotransmission s'il y a des compensations au niveau des récepteurs et transporteurs par exemple. Une diminution du nombre de récepteurs ou une augmentation du nombre de transporteurs pourraient compenser le déficit de dégradation des monoamines et rétablir une intensité de la neurotransmission normale. Ceci est d'autant plus intéressant à étudier que nous n'avons finalement pas trouvé beaucoup d'effets de la mutation P106L sur le phénotype, alors que les monoamines sont impliquées dans beaucoup de fonctions. Nous avons commencé à étudier les niveaux d'expression de gènes de récepteurs et de transporteurs sérotoninergiques et dopaminergiques par RT semi-qPCR. Malheureusement, les résultats n'étaient pas assez précis pour être exploitables. Nous prévoyons d'opter pour une approche transcriptomique globale par RNAseq, qui sera non seulement plus précise, mais nous donnera davantage d'informations, sans les biais de l'approche par gène candidat, concernant l'effet d'une inactivation chronique de la MAO sur le cerveau du poisson.

Curieusement, lors de nos expériences préliminaires de RT semi-qPCR, lorsque nous avons équilibré les réactions de PCR avec les transcrits contrôles (β -actine, ADN-polymérase II et GAPDH), nous avons trouvé des résultats cohérents pour la β -actine et l'ADN-polymérase II, mais pas pour la GAPDH. La GAPDH semble être exprimée plus fortement chez le poisson de surface que chez le poisson cavernicole, et ne serait donc pas un bon contrôle dans les études comparées du transcriptome. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour valider ce résultat, néanmoins peu surprenant. La GAPDH intervient dans de nombreuses fonctions, dont la lutte contre des pathogènes et le stress oxydant (Dastoor and Dreyer, 2001; Nakajima et al., 2007; Perez-Casal and Potter, 2016; Tsai et al., 2013; Wagener et al., 2013). Ces deux fonctions seraient probablement de moindre importance dans un environnement cavernicole, sans UV et avec moins de pathogènes.

Nous avons aussi montré l'existence d'une compensation partielle de l'effet de la mutation P106L par une diminution de l'activité de synthèse de la TPH, et que l'inhibition pharmacologique de la MAO n'était pas équivalente à une inhibition génétique. Ceci ouvre de nouvelles voies vers la compréhension du fonctionnement des systèmes monoaminergiques chez le poisson.

Dans un article venant tout juste d'être publié, Bilandžija et al., (2020) décrivent dans une sous-partie de leur résultats que les taux de sérotonine sont plus faibles chez les poissons cavernicoles que chez les poissons de surface. Ces données sont donc totalement contraires aux nôtres, et ne sont pas discutées. Cependant, nous sommes sereins et convaincus que nos résultats sont valides et plus recevables. 1) Yannick Elipot en 2014 et moi-même, 6 ans plus tard, trouvons les mêmes résultats quel que soit l'expérimentateur et l'âge des poissons, allant de 6 dpf à 5 mois. 2) Nous avons trouvé et validé le déterminisme génétique des augmentations de sérotonine chez les poissons cavernicoles : nos résultats montrant des taux de 5-HT identiques chez les CF non mutés et les SF constituent un argument génétique définitif. 3) Chez tous les modèles et dans tous les paradigmes expérimentaux, une diminution de l'activité MAO s'accompagne (logiquement) d'une augmentation des taux de sérotonine et d'une diminution des taux de 5HIAA. 4) Aucune vérification du génotype *mao* des poissons utilisés n'a été faite dans l'étude de Bilandžija et al., 2020.

A l'échelle des réseaux neuronaux, nous n'avons pas montré d'effet de la mutation P106L sur l'anatomie des systèmes monoaminergiques, ce qui est surprenant étant donné l'implication de la sérotonine dans le développement des systèmes monoaminergiques.

A l'échelle du comportement, la mutation P106L dans la MAO était une bonne candidate pour expliquer la réduction de l'agressivité ou de la nage en banc chez le poisson cavernicole, étant donné l'implication des monoamines dans ces comportements, et les effets de drogues comme la fluoxétine et le deprenyl sur ces comportements chez l'*Astyanax* (Elipot et al., 2013; Kowalko et al., 2013b). Ceci souligne encore la non-équivalence entre les inhibitions pharmacologiques et génétiques de la MAO.

Nous avons montré une hausse de cortisol chez les poissons de surface et les poissons cavernicoles lorsqu'on les place dans un nouvel environnement. Dans ce contexte, les poissons de surface expriment des comportements de stress communs aux autres poissons et largement décrits dans la littérature. Les poissons cavernicoles, en revanche ne font que du thigmotactisme. La signification de ce comportement est encore peu claire et de futures expériences sont nécessaires pour déterminer s'il s'agit d'un comportement de stress et/ou d'exploration. Par exemple, traiter les poissons cavernicoles avec des anxiolytiques et anxiogènes et analyser les modifications éventuelles du thigmotactisme serait un bon début.

La littérature chez l'*Astyanax* concernant le stress et les taux de cortisol n'est pas très rigoureuse. Certains articles ou communications orales à l'International Astyanax Meeting (AIM) affirment que les poissons cavernicoles sont moins stressés que les poissons de surface. D'autres affirment le contraire. Et les deux camps se basent... sur le même article (Gallo and Jeffery, 2012) ! De plus, certaines études utilisent les comportements de « freezing » et de nage au fond du bac pour quantifier le stress chez les poissons cavernicoles. Or, nous avons montré que les poissons cavernicoles n'expriment jamais le premier comportement, même en cas de stress, et que le second n'était pas pertinent pour évaluer le stress chez le poisson cavernicole (Voir Annexe 1). Nous espérons que notre article, qui montre à la fois une augmentation du stress aigu et une réduction de l'anxiété chez le poisson cavernicole, apportera quelques réponses dans la communauté *Astyanax*, et ne subira pas le même sort que l'article (Gallo and Jeffery, 2012), utilisé en même temps pour affirmer « A » et son contraire.

De précédentes études dans l'équipe ont montré que les poissons cavernicoles de Pachón ont plus de neurones NPY/AgRP orexigènes et moins de neurones POMC anorexigènes que les poissons de surface (Alié et al., 2018). On aurait donc dû s'attendre à ce que les poissons cavernicoles mangent plus que les poissons de surface. Or ce n'est pas le cas (Alié et al., 2018). Nous avons donc émis l'hypothèse que les taux élevés de sérotonine, considérée comme anorexigène, chez les poissons cavernicoles (porteurs de la mutation P106L) pourraient compenser le déséquilibre au niveau des neuropeptides et ramener la prise alimentaire au niveau de celle des poissons de surface. Cependant, la prise alimentaire des poissons cavernicoles porteurs ou non de la mutation P106L est la même, ce qui réfute cette hypothèse. Les analyses transcriptomiques que nous projetons (voir plus haut) éclaireront sans doute les nombreux phénomènes de compensation et d'homéostasie qui régulent les comportements des poissons cavernicoles porteurs de la mutation MAO P106L.

A l'échelle des organes, nous nous sommes intéressés à quelques points pertinents (et peu chronophages), comme le nombre de dents et le rythme cardiaque, mais la mutation P106L n'a pas d'effet sur les caractères étudiés. Étant donné la multitude de processus comportementaux, développementaux et physiologiques dans lesquels les monoamines sont impliquées, il ne serait pas surprenant si la mutation P106L avait des effets sur des aspects du phénotype que nous n'avons pas étudiés. Nous avons tout juste commencé à analyser la motilité intestinale, mais nous ne pouvons pas conclure pour l'instant. De manière générale, cette thèse s'est plutôt concentrée sur les effets de la mutation P106L sur le cerveau et les comportements. Or la sérotonine est aussi impliquée dans de nombreuses fonctions périphériques, et nous avons montré que les taux de monoamines périphériques étaient eux aussi impactés par la mutation. Étant donné les différences de métabolisme entre les poissons de surface et les poissons cavernicoles, et les rôles de la sérotonine dans le

métabolisme, il sera très intéressant de se pencher sur ce sujet dans le futur. Comparer la glycémie et la masse de tissu adipeux chez les poissons porteurs ou non de la mutation P106L sera, ici aussi, un bon début.

A l'échelle des populations, nous avons montré la présence de l'allèle muté P106L dans toutes les grottes échantillonnées du groupe El Abra (6 grottes), depuis la grotte la plus au Nord (Pachón) jusqu'à l'une des grottes les plus au Sud (Chica). Les deux grottes étant espacées d'environ 100km. La mutation n'est pas fixée dans certaines grottes, ce qui suggérerait une origine récente. Malheureusement, nous n'avons pas pu reconstituer une histoire évolutive malgré nos efforts.

Concernant l'aspect évolutif, une autre zone d'ombre reste à éclaircir : est-ce que la mutation a été sélectionnée ? et si oui, pourquoi ? De futures études de balayage sélectif seront nécessaires pour répondre à la première question. Quant à la seconde, nous pouvons émettre quelques hypothèses. Dans un environnement cavernicole, les espèces tendraient petit à petit vers une stratégie K. Or, il a été démontré qu'un traitement au deprenyl (inhibiteur de la MAO) augmente la durée de vie chez les mammifères, et même chez la drosophile. Il aurait un effet antioxydant et limiterait la croissance des tumeurs (Miklya, 2016). L'inhibition de la MAO chez l'*Astyanax* cavernicole pourrait peut-être augmenter sa durée de vie. Simon et al., (2017) n'ont cependant pas noté de différence notable d'âge moyen entre les poissons cavernicoles et les poissons de surface dans leur milieu naturel, hormis quelques poissons très vieux dans la grotte de Tinaja (âge > 6 ans). Aucun poisson de surface de cet âge-là n'a été trouvé dans les rivières échantillonnées. La mutation pourrait aussi être sélectionnée à cause de son effet sur les taux de cortisol (voir l'article 1), ou à cause d'un effet sur un phénotype que nous n'avons pas encore découvert.

L'hypothèse d'une mutation neutre dont la fréquence aurait augmenté dans les populations cavernicoles de El Abra par la dérive génétique n'est pas non plus à rejeter. Cette hypothèse est confortée par le fait que dans la plupart des grottes, la mutation n'est pas fixée, alors que les populations sont à priori petites.

Le projet de thèse comprenait aussi la génération du poisson de surface porteur de la mutation P106L. Nous avons prévu de le générer simultanément par deux voies, l'une utilisant la technologie CRISPR-Cas9 (par Jorge Torres-Paz), et l'autre par backcross (par moi-même). Finalement la méthode utilisant CRISPR-Cas9 n'a pas porté ses fruits, mais nous avons pu générer deux lignées de poisson knockout pour la MAO.

Le début du phénotypage nous a permis de constater une taille du corps réduite, un système sérotoninergique gravement impacté et une mort au cours du développement chez les poissons homozygotes KO. La caractérisation du poisson KO se poursuivra dans le futur avec Alessandro Alunni, avec notamment l'étude du développement du système sérotoninergique à des stades précoces.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse, Sylvie, pour m'avoir proposé un sujet pluridisciplinaire, m'avoir encadrée, conseillée, et avoir relu et corrigé ce manuscrit. J'ai énormément apprécié ta disponibilité, tes grandes qualités humaines d'écoute et de compréhension, ainsi que la grande liberté d'action et ta confiance que tu m'as données tout du long de ce projet. Un grand merci aussi pour m'avoir permise de partir deux fois sur le terrain, dans les grottes au Mexique. Ces voyages resteront inoubliables.

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : Pierre Capy, Laure Bally-Cuif, Claire Wyart, Patricia Gaspar, et Patrick Prunet. Merci particulièrement à Patricia Gaspar et Patrick Prunet pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Mes remerciements vont également à Cynthia Froc pour ses conseils en matière de comportement animal, pour m'avoir appris à me servir de ViewPoint (pas une mince affaire...), et pour la relecture de l'article 1, Jacques Callebert pour avoir analysé mes (nombreux) échantillons en HPLC, Jean-Marie Launay pour avoir analysé d'autres de mes (nombreux) échantillons, Joanne Edouard pour le Labship, Didier Casane pour ses conseils en évolution, et Key Yamamoto pour l'identification des clusters dopaminergiques.

Je remercie tout particulièrement Laure Bally-Cuif et Jacques Callebert pour leur évaluation et leurs conseils lors des comités de thèses. C'était un réel plaisir de vous présenter mes résultats et d'échanger avec vous.

Je n'oublie évidemment pas les membres actuels ou passés de la meilleure équipe de l'institut, en toute objectivité. Louise, tout d'abord, pour les nombreuses discussions que l'on a eues ensemble (au lieu de travailler), pour avoir sauvé mes yeux lors de la rédaction de ce manuscrit, et pleeeein d'autres choses. Je suis aussi pleine de gratitude d'avoir encadré la meilleure stagiaire, Naomie, merci pour ton entrain et ta bonne humeur permanents. Maryline, pour tes conseils en immuno, le nutella maison, et tes fou-rires. Jorge, pour le poisson KO (et la course, que j'ai gagnée !). Stéphane et Krystel, toujours là pour le soin de nos poissons. Yannick, pour avoir présenté le poisson cavernicole lors de la fête de la science de 2012, 4 ans avant le début de ma thèse, sans qui je ne serais peut-être pas venue dans cette équipe. Et je n'oublie pas non plus Carole, François, Boudjema, Julien, Lydvina, Maxime, Eugène, Camille, Laurent, Victor, et Pauline.

Merci aussi au corbeau, sans qui la rédaction de ce manuscrit aurait été beaucoup plus difficile. 🐼

J'aimerais aussi remercier l'équipe enseignante de la préparation à l'agrégation SV-STU d'Orsay pour m'avoir accueillie en monitorat pendant trois ans (+rab). Un merci tout particulier à Hélène, pour son accueil chaleureux, et pour avoir absolument tout fait pour que ma première expérience en enseignement se passe au mieux.

Enfin, ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral : ma famille, mes amis, le club Rock, le club JdRM et la Med de Kchan. <3

Références

- Abdel-Latif, H., Hassan, E. S. and von Campenhausen, C. (1990). Sensory performance of blind mexican cave fish after destruction of the canal neuromasts. *Naturwissenschaften* **77**, 237–239.
- Abzalov, R. A., Valeev, A. M., Abzalov, N. I. and Gulyakov, A. A. (2015). Role of 5-HT_{2B} serotonin receptor agonist in the regulation of pumping function of the heart. *Bull. Exp. Biol. Med.* **159**, 302–304.
- Adams, C. F., Liley, N. R. and Gorzalka, B. . (1996). PCPA increase aggression in male firemouth cichlids. *Pharmacology* **53**, 328–330.
- Aghajanian, G. K. and Lakoski, J. M. (1984). Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. *Brain Res.* **305**, 181–185.
- Airhart, M. J., Lee, D. H., Wilson, T. D., Miller, B. E., Miller, M. N. and Skalko, R. G. (2007). Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* **29**, 652–664.
- Airhart, M. J., Lee, D. H., Wilson, T. D., Miller, B. E., Miller, M. N., Skalko, R. G. and Monaco, P. J. (2012). Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* **34**, 152–160.
- Akhondzadeh, S. (2001). The 5-HT hypothesis of schizophrenia. *IDrugs* **4**, 295–300.
- Al-Imari, L. and Gerlai, R. (2008). Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **189**, 216–219.
- Alazizi, A., Liu, M. Y., Williams, F. E., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M. C. (2011). Identification, characterization, and ontogenic study of a catechol O-methyltransferase from zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **102**, 18–23.
- Albinsson, A., Andersson, G., Andersson, K., Vega-Matuszczyk, J. and Larsson, K. (1996). The effects of lesions in the mesencephalic raphe systems on male rat sexual behavior and locomotor activity. *Behav. Brain Res.* **80**, 57–63.
- Aldeco, M., Arslan, B. K. and Edmondson, D. E. (2011). Catalytic and inhibitor binding properties of zebrafish monoamine oxidase (zMAO): Comparisons with human MAO A and MAO B. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **159**, 78–83.
- Alenina, N., Bashammakh, S. and Bader, M. (2006). Specification and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev.* **2**, 5–10.
- Alié, A., Devos, L., Torres-Paz, J., Prunier, L., Boulet, F., Blin, M., Elipot, Y. and Retaux, S. (2018). Developmental evolution of the forebrain in cavefish, from natural variations in neuropeptides to behavior. *Elife* **7**, 1–26.
- Aluru, N. and Vijayan, M. M. (2009). Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* **164**, 142–150.
- Amézquita, A., Lima, A. P., Jehle, R., Castellanos, L., Ramos, Ó., Crawford, A. J., Gasser, H. and Hödl, W. (2009). Calls, colours, shape, and genes: A multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. *Biol. J. Linn. Soc.* **98**, 826–838.
- Ampatzis, K., Kentouri, M. and Dermon, C. R. (2008). Neuronal and glial localization of α 2A-adrenoceptors in the adult zebrafish (*Danio rerio*) brain. *J. Comp. Neurol.* **508**, 72–93.
- Andrade, T. G. C. S., Macedo, C. E. A., Zangrossi, H. and Graeff, F. G. (2004). Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* **153**, 55–60.
- Andrade, R., Huereca, D., Lyons, J. G., Andrade, E. M. and McGregor, K. M. (2015). 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition and the control of serotonergic cell firing. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 1110–1115.
- Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N. and Panula, P. (2006). Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* **498**, 598–610.
- Arnegard, M. E., McIntyre, P. B., Harmon, L. J., Zelditch, M. L., Crampton, W. G. R., Davis, J. K., Sullivan, J. P., Lavoué, S. and Hopkins, C. D. (2010). Sexual signal evolution outpaces ecological divergence during electric fish species radiation. *Am. Nat.* **176**, 335–356.
- Aspiras, A. C., Rohner, N., Martineau, B., Borowsky, R. L. and Tabin, C. J. (2015). Melanocortin 4 receptor mutations contribute to the adaptation of cavefish to nutrient-poor conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 9668–9673.
- Atallah, J., Teixeira, L., Salazar, R., Zaragoza, G. and Kopp, A. (2014). The making of a pest: The evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila suzukii* and related species. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281**,.
- Atukorala, A. D. S., Hammer, C., Dufton, M. and Franz-Odenaal, T. A. (2013). Adaptive evolution of the lower jaw dentition in Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*). *Evodevo* **4**, 1.
- Axelrod, R. and Hamilton, W. (1981). The evolution of cooperation. *Science (80-)*. **211**, 1390–1396.
- Backström, T. and Winberg, S. (2017). Serotonin coordinates responses to social stress-What we can learn from fish. *Front. Neurosci.* **11**, 1–10.
- Backström, T., Schjolden, J., Øverli, Ø., Thörnqvist, P. O. and Winberg, S. (2011a). Stress effects on AVT and CRF systems in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) divergent in stress responsiveness. *Horm. Behav.* **59**, 180–186.
- Backström, T., Pettersson, A., Johansson, V. and Winberg, S. (2011b). CRF and urotensin I effects on aggression and anxiety-like behavior in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **214**, 907–914.
- Baker, P. C. and Quay, W. B. (1969). 5-Hydroxytryptamine metabolism in early embryogenesis, and the development of brain and retinal tissues. A review. *Brain Res.* **12**, 273–295.
- Baraban, J. M. and Aghajanian, G. K. (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* **19**, 355–363.
- Baraban, J. M. and Aghajanian, G. K. (1981). Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: Demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* **204**, 1–11.
- Barbosa, H. P., Lima-Maximino, M. G. and Maximino, C. (2019). Acute fluoxetine differently affects aggressive display in zebrafish phenotypes. *Aggress. Behav.* **45**, 62–69.
- Barcellos, L. J. G., Ritter, F., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., da Silva, L. B., Bedin, A. C., Finco, J. and Cericato, L. (2007). Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* **272**, 774–778.

- Beale, A., Guibal, C., Tamai, T. K., Klotz, L., Cowen, S., Peyric, E., Reynoso, V. H., Yamamoto, Y. and Whitmore, D. (2013). Circadian rhythms in Mexican blind cavefish *Astyanax mexicanus* in the lab and in the field. *Nat. Commun.* **4**,.
- Bell, R., Mitchell, P. J. and Hobson, H. (1996). Effects of the 5-HT_{1A} antagonist (+)-WAY-100135 on murine social and agonistic behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**, 159–167.
- Bellipanni, G., Rink, E. and Bally-Cuif, L. (2002). Cloning of two tryptophan hydroxylase genes expressed in the diencephalon of the developing zebrafish brain. *Gene Expr. Patterns* **2**, 251–256.
- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S. L., Guiard, B. P., Fernandez, S. P., Doly, S., Banas, S. M., Pitychoutis, P. M., Moutkine, I., Muzerelle, A., et al. (2018). Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology* **43**, 1623–1632.
- Bencan, Z., Sledge, D. and Levin, E. D. (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **94**, 75–80.
- Beninger, R. J. (1983). The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res. Rev.* **6**, 173–196.
- Berger, M., Gray, J. A. and Roth, B. L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Annu. Rev. Med.* **60**, 355–366.
- Bergey, C. M., Phillips-Conroy, J. E., Disotell, T. R. and Jolly, C. J. (2016). Dopamine pathway is highly diverged in primate species that differ markedly in social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 6178–6181.
- Berry, M. D., Juorio, A. V. and Paterson, I. A. (1994). The functional role of monoamine oxidases A and B in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **42**, 375–391.
- Bibliowicz, J., Alié, A., Espinasa, L., Yoshizawa, M., Blin, M., Hinaux, H., Legendre, L., Pèrè, S. and Rétaux, S. (2013). Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterráneo cave. *Evodevo* **4**, 2–7.
- Bilandžija, H., Ma, L., Parkhurst, A. and Jeffery, W. R. (2013). A potential benefit of albinism in *Astyanax mexicanus*: Downregulation of the *oca2* gene increases tyrosine and catecholamine levels as an alternative to melanin synthesis. *PLoS One* **8**, 1–14.
- Bilandžija, H., Hollifield, B., Steck, M., Meng, G., Ng, M., Koch, A. D., Gračan, R., Četković, H., Porter, M. L., Renner, K. J., et al. (2020). Phenotypic plasticity as a mechanism of cave colonization and adaptation. *Elife* **9**, 1–27.
- Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Edmondson, D. E. and Mattevi, A. (2002). Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 22–26.
- Björklund, A. and Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* **30**, 194–202.
- Blanchard, D. C. and Blanchard, R. J. (1999). Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**, 981–991.
- Bland, S. T., Hargrave, D., Pepin, J. L., Amat, J., Watkins, L. R. and Maier, S. F. (2003). Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1589–1596.
- Blaser, R. and Gerlai, R. (2006). Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. *Behav. Res. Methods* **38**, 456–469.
- Blaser, R. E. and Peñalosa, Y. M. (2011). Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiol. Behav.* **104**, 831–837.
- Blaser, R. E., Chadwick, L. and McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **208**, 56–62.
- Blier, P. and Bouchard, C. (1994). Modulation of 5-HT release in the guinea-pig brain following long-term administration of antidepressant drugs. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 485–495.
- Blier, P. and De Montigny, C. (1985). Serotonergic But Not Noradrenergic Neurons Long-Term Treatment With Monoamine Oxidase Inhibitors. *Neuroscience* **16**, 949–955.
- Blin, M., Tine, E., Meister, L., Elipot, Y., Bibliowicz, J., Espinasa, L. and Rétaux, S. (2018). Developmental evolution and developmental plasticity of the olfactory epithelium and olfactory skills in Mexican cavefish. *Dev. Biol.* **441**, 242–251.
- Blundell, J. E. and Leshem, M. B. (1975). The effect of 5-hydroxytryptophan on food intake and on the anorexic action of amphetamine and fenfluramine. *J. Pharm. Pharmacol.* **27**, 31–37.
- Boehmier, W., Obrecht-Pflumio, S., Canfield, V., Thisse, C., Thisse, B. and Levenson, R. (2004). Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev. Dyn.* **230**, 481–493.
- Boehmler, W., Carr, T., Thisse, C., Thisse, B., Canfield, V. A. and Levenson, R. (2007). D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes, Brain Behav.* **6**, 155–166.
- Boothman, L., Raley, J., Denk, F., Hirani, E. and Sharp, T. (2006). In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **149**, 861–869.
- Borowsky, R. (2008). Restoring sight in blind cavefish. *Curr. Biol.* **18**, 23–24.
- Bortolato, M. and Shih, J. C. (2011). *Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: Preclinical and clinical evidence*. 1st ed. Elsevier Inc.
- Bortolato, M., Chen, K. and Shih, J. C. (2008). Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 1527–1533.
- Bortolato, M., Chen, K., Godar, S. C., Chen, G., Wu, W., Rebrin, I., Farrell, M. R., Scott, A. L., Wellman, C. L. and Shih, J. C. (2011). Social deficits and perseverative behaviors, but not overt aggression, in MAO-A hypomorphic mice. *Neuropsychopharmacology* **36**, 2674–2688.
- Bosco, A., Bureau, C., Affaticati, P., Gaspar, P., Bally-Cuif, L. and Lillesaar, C. (2013). Development of hypothalamic serotonergic neurons requires Fgf signalling via the ETS-domain transcription factor *Etv5b*. *Dev.* **140**, 372–384.
- Bradford, C. S., Fitzpatrick, M. S. and Schreck, C. B. (1992). Evidence for ultra-short-loop feedback in ACTH-induced interrenal steroidogenesis in coho salmon: Acute self-suppression of cortisol secretion in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**, 292–299.
- Bradic, M., Beerli, P., García-De León, F. J., Esquivel-Bobadilla, S. and Borowsky, R. L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evol. Biol.* **12**,.
- Breder, C. M. (1943). A note on erratic viciousness in *Astyanax mexicanus* (Phillipi). *Copeia* 82–84.

- Bretaud, S., Lee, S. and Guo, S. (2004). Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.* **26**, 857–864.
- Breuner, C. W., Patterson, S. H. and Hahn, T. P. (2008). In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. *Gen. Comp. Endocrinol.* **157**, 288–295.
- Brezun, J. M. and Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* **89**, 999–1002.
- Brezun, J. M. and Daszuta, A. (2000). Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 391–396.
- Brocco, M., Dekeyne, A., Veiga, S., Girardon, S. and Millan, M. J. (2002). Induction of hyperlocomotion in mice exposed to a novel environment by inhibition of serotonin reuptake: A pharmacological characterization of diverse classes of antidepressant agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 667–680.
- Broglio, C., Rodríguez, F., Gómez, A., Arias, J. L. and Salas, C. (2010). Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. *Behav. Brain Res.* **210**, 191–201.
- Brouard, J. T., Schweimer, J. V., Houlton, R., Burnham, K. E., Quérée, P. and Sharp, T. (2015). Pharmacological Evidence for 5-HT₆ Receptor Modulation of 5-HT Neuron Firing in Vivo. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 1241–1247.
- Brown, C. and Laland, K. N. (2003). Social learning in fishes: a review. *Fish fisheries* **4**, 280–288.
- Brown, C., Gardner, C. and Braithwaite, V. A. (2005). Differential stress responses in fish from areas of high- and low-predation pressure. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **175**, 305–312.
- Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. O., Ropers, H. H. and Van Oost, B. A. (1993). Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science (80-)*. **262**, 578–580.
- Brustein, E. and Drapeau, P. (2005). Serotonergic modulation of chloride homeostasis during maturation of the locomotor network in Zebrafish. *J. Neurosci.* **25**, 10607–10616.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R. and Drapeau, P. (2003a). Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol. Paris* **97**, 77–86.
- Brustein, E., Chong, M., Holmqvist, B. and Drapeau, P. (2003b). Serotonin Patterns Locomotor Network Activity in the Developing Zebrafish by Modulating Quiescent Periods. *J. Neurobiol.* **57**, 303–322.
- Buchanan, C. P., Shrier, E. M. and Hill, W. L. (1994). Time-dependent effects of PCPA on social aggression in chicks. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49**, 483–488.
- Bülbring, E. and Crema, A. (1958). Observations concerning the action of 5-Hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **13**, 444–457.
- Burchards, H., Dölle, A. and Parzefall, J. (1985). Aggressive behaviour of an epigeal population of *Astyanax mexicanus* (Characidae, pisces) and some observations of three subterranean populations. *Behav. Processes* **11**, 225–235.
- Burt De Perera, T. (2004). Fish can encode order in their spatial map. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **271**, 2131–2134.
- Bury, N. R., Sturm, A., Le Rouzic, P., Lethimonier, C., Ducouret, B., Guiguen, Y., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Rafestin-Oblin, M. E. and Prunet, P. (2003). Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish. *J. Mol. Endocrinol.* **31**, 141–156.
- Buske, C. and Gerlai, R. (2011). Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* **33**, 698–707.
- Caamaño Tubío, R. I., Pérez-Maceira, J. and Aldegunde, M. (2010). Homeostasis of glucose in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum): The role of serotonin. *J. Exp. Biol.* **213**, 1813–1821.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K. M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., Suci, C., et al. (2010). Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat. Protoc.* **5**, 1786–1799.
- Callier, S., Snapyan, M., Le Crom, S., Prou, D., Vincent, J. D. and Vernier, P. (2003). Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol. Cell* **95**, 489–502.
- Campbell, P., Pasch, B., Pino, J. L., Crino, O. L., Phillips, M. and Phelps, S. M. (2010). Geographic variation in the songs of neotropical singing mice: Testing the relative importance of drift and local adaptation. *Evolution (N. Y.)* **64**, 1955–1972.
- Candy, J. and Collet, C. (2005). Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1727**, 35–44.
- Carlson, B. M. and Gross, J. B. (2018). Characterization and comparison of activity profiles exhibited by the cave and surface morphotypes of the blind Mexican tetra, *Astyanax mexicanus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* **208**, 114–129.
- Carlson, B. M., Klingler, I. B., Meyer, B. J. and Gross, J. B. (2018). Genetic analysis reveals candidate genes for activity QTL in the blind Mexican tetra, *Astyanax mexicanus*. *PeerJ* **2018**,.
- Carpenter, R. E., Watt, M. J., Forster, G. L., Øverli, Ø., Bockholt, C., Renner, K. J. and Summers, C. H. (2007). Corticotropin releasing factor induces anxiogenic locomotion in trout and alters serotonergic and dopaminergic activity. *Horm. Behav.* **52**, 600–611.
- Carrillo, M., Ricci, L. A., Coppersmith, G. A. and Melloni, R. H. (2009). The effect of increased serotonergic neurotransmission on aggression: A critical meta-analytical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl.)* **205**, 349–368.
- Carter, G. G. and Wilkinson, G. S. (2015). Social benefits of non-kin food sharing by female vampire bats. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **282**,.
- Carter, M. E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., Deisseroth, K. and De Lecea, L. (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat. Neurosci.* **13**, 1526–1535.
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J. C., et al. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science (80-)*. **268**, 1763–1766.
- Cazalets, J. R., Gardette, M. and Hilaire, G. (2000). Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *J. Neurophysiol.* **83**, 2468–2470.
- Cepeda, C., Murphy, K. P. S., Parent, M. and Levine, M. S. (2018). The Role of Dopamine in Huntington's Disease Striatal DA Innervation in the HD Postmortem Brain. 1–15.
- Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C. M., de Kloet, R. E. and Richardson, M. K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behav. Brain Res.* **214**, 332–342.

- Chen, K., Wu, H. F., Grimsby, J. and Shih, J. C. (1994). Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol. Pharmacol.* **46**, 1226–1233.
- Chen, K., Holschneider, D. P., Wu, W., Rebrini, I. and Shih, J. C. (2004). A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *J. Biol. Chem.* **279**, 39645–39652.
- Chen, X., Perry, S. F., Aris-Brosou, S., Selva, C. and Moon, T. W. (2007). Characterization and functional divergence of the α 1-adrenoceptor gene family: Insights from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol. Genomics* **32**, 142–153.
- Chin, J. S. R., Gassant, C. E., Amaral, P. M., Lloyd, E., Stahl, B. A., Jaggard, J. B., Keene, A. C. and Duboue, E. R. (2018). Convergence on reduced stress behavior in the Mexican blind cavefish. *Dev. Biol.* **441**, 319–327.
- Christopher P Ford (2014). The Role of D2-Autoreceptors in Regulating Dopamine Neuron Activity and Transmission. *Neuroscience* **282**, 13–22.
- Clements, S., Moore, F. L. and Schreck, C. B. (2003). Evidence that acute serotonergic activation potentiates the locomotor-stimulating effects of corticotropin-releasing hormone in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Horm. Behav.* **43**, 214–221.
- Clotfelter, E. D., O'Hare, E. P., McNitt, M. M., Carpenter, R. E. and Summers, C. H. (2007). Serotonin decreases aggression via 5-HT1A receptors in the fighting fish *Betta splendens*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **87**, 222–231.
- Cohen, R. M., Campbell, I. C., Dau'phin, M., Tallman, J. F. and Murphy, D. L. (1982). Changes in α - and β -receptor densities in rat brain as a result of treatment with monoamine oxidase inhibiting antidepressants. *Neuropharmacology* **21**, 293–298.
- Cohen, G., Farooqui, R. and Kesler, N. (1997). Parkinson disease: A new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4890–4894.
- Colas, J. F., Launay, J. M., Vonesch, J. L., Hickel, P. and Maroteaux, L. (1999). Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **87**, 77–91.
- Collins, F. A., Murphy, D. L., Reiss, A. L., Sims, K. B., Lewis, J. G., Freund, L., Karoum, F., Zhu, D., Maumenee, I. H. and Antonarakis, S. E. (1992). Clinical, biochemical, and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes. *Am. J. Med. Genet.* **42**, 127–134.
- Colombe, L., Fostier, A., Bury, N., Pakdel, F. and Guiguen, Y. (2000). A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Cloning and characterization of its steroid binding domain. *Steroids* **65**, 319–328.
- Commissiong, J. W. (1985). Monoamine metabolites: their relationship and lack of relationship to monoaminergic neuronal activity. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1127–1131.
- Connors, K. A., Valenti, T. W., Lawless, K., Sackerman, J., Onaivi, E. S., Brooks, B. W. and Gould, G. G. (2014). Similar anxiolytic effects of agonists targeting serotonin 5-HT1A or cannabinoid CB receptors on zebrafish behavior in novel environments. *Aquat. Toxicol.* **151**, 105–113.
- Cook, E. H. and Leventhal, B. L. (1996). The serotonin system in autism. *Curr. Opin. Pediatr.* **8**, 348–354.
- Costall, B., Elizabeth Kelly, M., Naylor, R. J. and Onaivi, E. S. (1989). The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **33**, 197–203.
- Côté, F., Thévenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M. A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., et al. (2003). Disruption of the non neuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13525–13530.
- Cotzias, G. C. and Dole, V. P. (1951). Metabolism of amines. II : Mitochondrial localization of monoamine oxidase. *Proc Soc Exp Biol Med* **78**, 157–160.
- Culver, D. C. and Pipan, T. (2009). *The biology of caves and other subterranean habitats*.
- Culver, C. C., Kane, T. C. and Fong, D. . (1995). *Adaptation and Natural Selection in Caves*.
- Dahlbom, S. J., Backström, T., Lundstedt-Enkel, K. and Winberg, S. (2012). Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **228**, 333–338.
- Dahlstöm, A. and Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamine in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* **62**, 1–55.
- Das, C., Thraya, M. and Vijayan, M. M. (2018). Nongenomic cortisol signaling in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **265**, 121–127.
- Dastoor, Z. and Dreyer, J. L. (2001). Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J. Cell Sci.* **114**, 1643–1653.
- Day, R. L., MacDonald, T., Brown, C., Laland, K. N. and Reader, S. M. (2001). Interactions between shoal size and conformity in guppy social foraging. *Anim. Behav.* **62**, 917–925.
- De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E. and Mattevi, A. (2005). Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12684–12689.
- Dean, J. and Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J. Psychiatr.* **27**, 101–111.
- Deckel, A. W. (1996). Behavioral changes in *Anolis carolinensis* following injection with fluoxetine. *Behav. Brain Res.* **78**, 175–182.
- Deckel, A. W. and Fuqua, L. (1998). Effects of serotonergic drugs on lateralized aggression and aggressive displays in *Anolis carolinensis*. *Behav. Brain Res.* **95**, 227–232.
- Delaney, M., Follet, C., Ryan, N., Hanney, N., Lusk-Yablick, J. and Gerlach, G. (2002). Social interaction and distribution of female zebrafish (*Danio rerio*) in a large aquarium. *Biol. Bull.* **203**, 240–241.
- Delville, Y., David, J. T., Taravosh-Lahn, K. and Wommack, J. C. (2003). Stress and the development of agonistic behavior in golden hamsters. *Horm. Behav.* **44**, 263–270.
- Deneris, E. S. and Wyler, S. C. (2013). Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat. Neurosci.* **15**, 519–527.
- Deshwal, S., Di Sante, M., Di Lisa, F. and Kaludercic, N. (2017). Emerging role of monoamine oxidase as a therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **33**, 64–69.
- Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Pierucci, M. and Esposito, E. (2008). Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog. Brain Res.* **172**, 45–71.

- Di Giovanni, G., Esposito, E. and Di Matteo, V. (2010). Role of serotonin in central dopamine dysfunction. *CNS Neurosci. Ther.* **16**, 179–194.
- Di Monte, D. A., DeLanney, L. E., Irwin, I., Royland, J. E., Chan, P., Jakowec, M. W. and Langston, J. W. (1996). Monoamine oxidase-dependent metabolism of dopamine in the striatum and substantia nigra of L-DOPA-treated monkeys. *Brain Res.* **738**, 53–59.
- DiBattista, J. D., Anisman, H., Whitehead, M. and Gilmour, K. M. (2005). The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* **208**, 2707–2718.
- Dinan, T. G. (1996). Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Sci.* **58**, 1683–1694.
- Dos Santos, L., De Andrade, T. G. C. S. and Zangrossi, H. (2005). Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology (Berl.)*. **179**, 733–741.
- Doyon, C., Gilmour, K. M., Trudeau, V. L. and Moon, T. W. (2003). Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are elevated in the preoptic area of socially subordinate rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **133**, 260–271.
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R. and Brustein, E. (2002). Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* **68**, 85–111.
- Duan, H. and Wang, J. (2010). Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **335**, 743–753.
- Duboué, E. R., Keene, A. C. and Borowsky, R. L. (2011). Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Curr. Biol.* **21**, 671–676.
- Dunbar, M. J., Tran, M. A. and Whelan, P. J. (2010). Endogenous extracellular serotonin modulates the spinal locomotor network of the neonatal mouse. *J. Physiol.* **588**, 139–156.
- Echevarria, D. J., Hammack, C. M., Pratt, D. W. and Hosemann, J. D. (2008). A novel behavioral test battery to assess global drug effects using the zebrafish. *Int. J. Comp. Psychol.* **21**, 19–34.
- Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A. M., Dewachter, L., Fadel, E., Dartevelle, P., Humbert, M., Simonneau, G., Hanoun, N., Saurini, F., et al. (2006). Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: Critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* **113**, 1857–1864.
- Edwards, D. H. and Kravitz, E. A. (1997). Serotonin, social status and aggression. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 812–819.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., et al. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* **205**, 38–44.
- El-Merahbi, R., Löffler, M., Mayer, A. and Sumara, G. (2015). The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Lett.* **589**, 1728–1734.
- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J. and Rétaux, S. (2013). Evolutionary shift from fighting to foraging in blind cavefish through changes in the serotonin network. *Curr. Biol.* **23**, 1–10.
- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., Launay, J. M., Blin, M. and Rétaux, S. (2014a). A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nat. Commun.* **5**, 3647.
- Elipot, Y., Legendre, L., Père, S., Sohm, F. and Rétaux, S. (2014b). *Astyanax* transgenesis and husbandry: How cavefish enters the laboratory. *Zebrafish* **11**, 291–299.
- Elliott, W. R. (2018). The *Astyanax* caves of Mexico. Cavefishes of Tamaulipas, San Luis Potosi, and Guerrero. *Assoc. Mex. cave Stud. Bulletin* **2**.
- Emerson, A. J., Kappenman, D. P., Ronan, P. J., Renner, K. J. and Summers, C. H. (2000). Stress induces rapid changes in serotonergic activity: Restraint and exertion. *Behav. Brain Res.* **111**, 83–92.
- Erckens, W. and Martin, W. (1982). Exogenous and Endogenous Control of Swimming Activity in *Astyanax Mexicanus* (Characidae, Pisces) By Direct Light Response and By A Circadian Oscillator: I. Analyses of the Time-Control Systems of An Epigeic River Population. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C.J. Biosci.* **37**, 1253–1265.
- Ercolini, A., Berti, R., Cianfanelli, A. and Ercolini, A. (1981). Aggressive behaviour in *uegitglanis zammaranoi gianferrari* (Clariidae siluriformes), anophthalmic phreatic fish from somalia. *Monit. Zool. Ital. Suppl.* **14**, 39–56.
- Espinasa, L., Yamamoto, Y. and Jeffery, W. R. (2005). Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav. Processes* **70**, 144–148.
- Espinasa, L., Bonaroti, N., Wong, J., Pottin, K., Queinnec, E. and Rétaux, S. (2017). Contrasting feeding habits of post-larval and adult *Astyanax* cavefish. *Subterr. Biol.* **21**, 1–17.
- Evrard, A., Malagie, I., Laporte, A. M., Boni, C., Hanoun, N., Trillat, A. C., Seif, I., De Maeyer, E., Gardier, A., Hamon, M., et al. (2002). Altered regulation of the 5-HT system in the brain of MAO-A knock-out mice. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 841–851.
- Fachinelli, C., Sargo, S., Bataller, R. and Rodríguez Echandía, E. L. (1989). Effect of 5-HTP and ketanserin on the aggressive reaction induced by food competition in dominant and submissive pigeons (*Columba livia*). *Behav. Brain Res.* **35**, 265–270.
- Faught, E. and Vijayan, M. M. (2016). Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* **199**, 136–145.
- Faustino, A. I., Tacão-Monteiro, A. and Oliveira, R. F. (2017). Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Sci. Rep.* **7**, 1–10.
- Ferris, C. F., Melloni, R. H., Koppel, G., Perry, K. W., Fuller, R. W. and Delville, Y. (1997). Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters. *J. Neurosci.* **17**, 4331–4340.
- Feulner, P. G. D., Plath, M., Engelmann, J., Kirschbaum, F. and Tiedemann, R. (2009). Electrifying love: Electric fish use species-specific discharge for mate recognition. *Biol. Lett.* **5**, 225–228.
- Filby, A. L., Paull, G. C., Hickmore, T. F. A. and Tyler, C. R. (2010). Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* **11**, 498.
- Fingerman, S. W. (1976). Circadian rhythms of brain 5-hydroxytryptamine and swimming activity in the teleost, *Fundulus grandis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* **54**, 49–53.
- Fontana, D. J. and Commissaris, R. L. (1989). Effects of cocaine on conflict behavior in the rat. *Life Sci.* **45**, 819–827.
- Fuchs, E. and Flügge, G. (2004). Cellular consequences of stress and depression. *Dialogues Clin. Neurosci.* **6**, 171–183.

- Fuller, R. W. and Wong, D. T. (1990). Serotonin Uptake and Serotonin Uptake Inhibition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **600**, 68–80.
- Fumey, J., Hinaux, H., Noirod, C., Thermes, C., Rétaux, S. and Casane, D. (2018). Evidence for late Pleistocene origin of *Astyanax mexicanus* cavefish. *BMC Evol. Biol.* **18**, 1–19.
- Gabriel, J. P., Mahmood, R., Kyriakatos, A., Söll, I., Hauptmann, G., Calabrese, R. L. and El Manira, A. (2009). Serotonergic modulation of locomotion in zebrafish - Endogenous release and synaptic mechanisms. *J. Neurosci.* **29**, 10387–10395.
- Gallant, J. R., Arnegard, M. E., Sullivan, J. P., Carlson, B. A. and Hopkins, C. D. (2011). Signal variation and its morphological correlates in *Paramormyrops kingsleyae* provide insight into the evolution of electrogenic signal diversity in mormyrid electric fish. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **197**, 799–817.
- Gallo, N. D. and Jeffery, W. R. (2012). Evolution of space dependent growth in the teleost *Astyanax mexicanus*. *PLoS One* **7**.
- Gaspar, P. and Lillesaar, C. (2012). Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**, 2382–2394.
- Gaudry, Q. (2018). Serotonergic modulation of olfaction in rodents and insects. *Yale J. Biol. Med.* **91**, 23–32.
- Gerlai, R., Lee, V. and Blaser, R. (2006). Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **85**, 752–761.
- Gerlai, R., Fernandes, Y. and Pereira, T. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. *Behav. Brain Res.* **201**, 318–324.
- Gershon, M. D. (2000). 5-HT (serotonin) physiology and related drugs. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **16**, 113–120.
- Gershon, M. D. (2013). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **20**, 14–21.
- Gesto, M., Soengas, J. L. and Míguez, J. M. (2008). Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, β -naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. *Aquat. Toxicol.* **86**, 341–351.
- Gesto, M., López-Patiño, M. A., Hernández, J., Soengas, J. L. and Míguez, J. M. (2013). The response of brain serotonergic and dopaminergic systems to an acute stressor in rainbow trout: A time course study. *J. Exp. Biol.* **216**, 4435–4442.
- Gesto, M., Otero-Rodiño, C., López-Patiño, M. A., Míguez, J. M., Soengas, J. L. and Conde-Sieira, M. (2014). Is plasma cortisol response to stress in rainbow trout regulated by catecholamine-induced hyperglycemia? *Gen. Comp. Endocrinol.* **205**, 207–217.
- Gesto, M., López-Patiño, M. A., Hernández, J., Soengas, J. L. and Míguez, J. M. (2015). Gradation of the Stress Response in Rainbow Trout Exposed to Stressors of Different Severity: The Role of Brain Serotonergic and Dopaminergic Systems. *J. Neuroendocrinol.* **27**, 131–141.
- Gnegy, M. (2012). Chapter 14-Catecholamines. In *Basic Neurochemistry*, pp. 283–299.
- Godar, S. C., Bortolato, M., Frau, R., Dousti, M., Chen, K. and Shih, J. C. (2011). Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* **14**, 1195–1207.
- Godoy, R., Noble, S., Yoon, K., Anisman, H. and Ekker, M. (2015). Chemogenetic ablation of dopaminergic neurons leads to transient locomotor impairments in zebrafish larvae. *J. Neurochem.* **135**, 249–260.
- Goudie, A. J., Thornton, E. W. and Wheeler, T. J. (1976). Effects of Lilly 110140, a specific inhibitor of 5-hydroxytryptamine uptake, on food intake and on 5-hydroxytryptophan-induced anorexia. Evidence for serotonergic inhibition of feeding. *J. Pharm. Pharmacol.* **28**, 318–320.
- Graeff, F. G., Viana, M. B. and Mora, P. O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 791–799.
- Grahame-Smith, D. G. (1971). Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. *J. Neurochem.* **18**, 1053–1066.
- Greenwood, A. K., Butler, P. C., White, R. B., Demarco, U., Pearce, D. and Fernald, R. D. (2003). Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: Distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology* **144**, 4226–4236.
- Gregory, T. R. and Wood, C. M. (1999). The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 286–295.
- Grimsby, J., Chen, K., Wang, L. J., Lan, N. C. and Shih, J. C. (1991). Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3637–3641.
- Grimsby, J., Toth, M., Chen, K., Kumazawa, T., Klaidman, L., Adams, J. D., Karoum, F., Gal, J. and Shih, J. C. (1997). Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nat. Genet.* **17**, 206–210.
- Gross, J. B., Borowsky, R. and Tabin, C. J. (2009). A novel role for Mc1r in the parallel evolution of depigmentation in independent populations of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS Genet.* **5**.
- Gross, E. R., Gershon, M. D., Margolis, K. G., Gertsberg, Z. V. and Cowles, R. A. (2012). Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. *Gastroenterology* **143**, 408–417.e2.
- Gross, J. B., Krutzler, A. J. and Carlson, B. M. (2014). Complex craniofacial changes in blind cave-dwelling fish are mediated by genetically symmetric and asymmetric loci. *Genetics* **196**, 1303–1319.
- Haddjeri, N., De Montigny, C., Curet, O. and Blier, P. (1998). Effect of the reversible monoamine oxidase A-inhibitor biefloxatone on the rat 5-hydroxytryptamine neurotransmission. *Eur. J. Pharmacol.* **343**, 179–192.
- Haj-Dahmane, S. and Shen, R.-Y. (2011). Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* **61**, 414–420.
- Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. *J. Theor. Biol.* **7**, 1–52.
- Harris, J. and Bird, D. J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **77**, 163–176.
- Hassan, E. S. (1985). Mathematical analysis of the stimulus for the lateral line organ. *Biol. Cybern.* **52**, 23–36.
- Hawley, L. C., Cole, S. W., Capitano, J. P., Norman, G. J. and Cacioppo, J. T. (2012). Effects of social isolation on glucocorticoid regulation in social mammals. *Horm. Behav.* **62**, 314–323.
- Heisler, L. K., Jobst, E. E., Sutton, G. M., Zhou, L., Borok, E., Thornton-Jones, Z., Liu, H. Y., Zigman, J. M., Balthasar, N., Kishi, T., et al. (2006). Serotonin Reciprocally Regulates Melanocortin Neurons to Modulate Food Intake. *Neuron* **51**, 239–249.
- Herculano, A. M. and Maximino, C. (2014). Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **55**, 50–66.
- Herczeg, G., Gonda, A. and Merilä, J. (2009). The social cost of shoaling covaries with predation risk in nine-spined stickleback, *Pungitius*

- pungitius, populations. *Anim. Behav.* **77**, 575–580.
- Herman, J. P. and Cullinan, W. E.** (1997). Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* **20**, 78–84.
- Hernádi, L., Hiripi, L., Gyori, J., Szabó, H. and Vehovszky, Á.** (2008). The terrestrial snail, *Helix pomatia*, adapts to environmental conditions by the modulation of central arousal. *Acta Biol. Hung.* **59**, 47–53.
- Hernández-Vázquez, F., Garduño, J. and Hernández-López, S.** (2019). GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Rev. Neurosci.* **30**, 289–303.
- Herskin, J. and Steffensen, J. F.** (1998). Energy savings in sea bass swimming in a school: measurements of tail beat frequency and oxygen consumption at different swimming speeds. *J. Fish Biol.* **53**, 366–376.
- Hidalgo, R. B. and Davidson, J. R. T.** (2000). Selective serotonin reuptake inhibitors in post-traumatic stress disorder. *J. Psychopharmacol.* **14**, 70–76.
- Higuchi, Y., Soga, T. and Parhar, I. S.** (2019). Social Defeat Stress Decreases mRNA for Monoamine Oxidase A and Increases 5-HT Turnover in the Brain of Male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Front. Pharmacol.* **9**, 1–9.
- Hillard, C. J., Beatka, M. and Sarvaideo, J.** (2017). Endocannabinoid signaling and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Compr. Physiol.* **7**, 1–15.
- Hinaux, H., Blin, M., Fumey, J., Legendre, L., Heuzé, A., Casane, D. and Rétaux, S.** (2015). Lens defects in *Astyanax mexicanus* Cavefish: Evolution of crystallins and a role for alphaA-crystallin. *Dev. Neurobiol.* **75**, 505–521.
- Hinaux, H., Devos, L., Blin, M., Elipot, Y., Bibliowicz, J., Alié, A. and Rétaux, S.** (2016). Sensory evolution in blind cavefish is driven by early embryonic events during gastrulation and neurulation. *Dev.* **143**, 4521–4532.
- Hoare, D. J., Couzin, I. D., Godin, J. G. J. and Krause, J.** (2004). Context-dependent group size choice in fish. *Anim. Behav.* **67**, 155–164.
- Höglund, E., Kolm, N. and Winberg, S.** (2001). Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is counteracted by L-DOPA. *Physiol. Behav.* **74**, 381–389.
- Höglund, E., Balm, P. H. M. and Winberg, S.** (2002). Stimulatory and inhibitory effects of 5-HT_{1A} receptors on adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Neurosci. Lett.* **324**, 193–196.
- Höglund, E., Korzan, W. J., Watt, M. J., Forster, G. L., Summers, T. R., Johannessen, H. F., Renner, K. J. and Summers, C. H.** (2005). Effects of L-DOPA on aggressive behavior and central monoaminergic activity in the lizard *Anolis carolinensis*, using a new method for drug delivery. *Behav. Brain Res.* **156**, 53–64.
- Hökfelt, T., Ljungdahl, Å., Fuxe, K. and Johansson, O.** (1974). Dopamine nerve terminals in the rat limbic cortex: Aspects of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Science (80-)*. **184**, 177–179.
- Horzmann, K. A. and Freeman, J. L.** (2016). *Zebrafish get connected: Investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity.*
- Huang, J., Zhong, Z., Wang, M., Chen, X., Tan, Y., Zhang, S., He, W., He, X., Huang, G., Lu, H., et al.** (2015). Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior. *J. Neurosci.* **35**, 2572–2587.
- Huppopp, K. and Wilkens, H.** (1991). Bigger eggs in subterranean *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces): Their significance and genetics. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **29**, 280–288.
- Hüppopp, K.** (1986). Oxygen consumption of *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces): a comparison of epigeal and hypogean populations. *Environ. Biol. Fishes* **17**, 299.
- Hüppopp, K.** (1987). Food-finding ability in cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Int. J. Speleol.* **16**, 59–66.
- Hüppopp, K.** (2000). How do cave animals cope with the food scarcity in caves? In *Ecosystems of the World 30: Subterranean Ecosystems*, pp. 159–188.
- Imai, H., Steindler, D. A. and Kitai, S. T.** (1986). The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **243**, 363–380.
- Irons, T. D., Kelly, P. E., Hunter, D. L., MacPhail, R. C. and Padilla, S.** (2013). Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **103**, 792–813.
- Irwin, D. E., Thimman, M. P. and Irwin, J. H.** (2008). Call divergence is correlated with geographic and genetic distance in greenish warblers (*Phylloscopus trochiloides*): A strong role for stochasticity in signal evolution? *J. Evol. Biol.* **21**, 435–448.
- Jaggard, J., Robinson, B. G., Stahl, B. A., Oh, I., Masek, P., Yoshizawa, M. and Keene, A. C.** (2017). The lateral line confers evolutionarily derived sleep loss in the Mexican cavefish. *J. Exp. Biol.* **220**, 284–293.
- Jaggard, J. B., Stahl, B. A., Lloyd, E., Prober, D. A., Duboue, E. R. and Keene, A. C.** (2018). Hypocretin underlies the evolution of sleep loss in the Mexican cavefish. *Elife* **7**, 1–22.
- Jankowska, E., Jukes, M. G. M., Lund, S. and Lundberg, A.** (1967). The Effect of DOPA on the Spinal Cord 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol. Scand.* **70**, 369–388.
- Jay, M., De Faveri, F. and McDermid, J. R.** (2015). Firing dynamics and modulatory actions of supraspinal dopaminergic neurons during zebrafish locomotor behavior. *Curr. Biol.* **25**, 435–444.
- Jeffery, W. R.** (2009). Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 25–47.
- Jeffrey, J. D., Esbaugh, A. J., Vijayan, M. M. and Gilmour, K. M.** (2012). Modulation of hypothalamic-pituitary-interrenal axis function by social status in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **176**, 201–210.
- Jesuthasan, S.** (2012). Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev. Neurobiol.* **72**, 395–403.
- Johnson, A. and Hamilton, T. J.** (2017). Modafinil decreases anxiety-like behaviour in zebrafish. *PeerJ* **2017**, 1–15.
- Jordan, L. M., Liu, J., Hedlund, P. B., Akay, T. and Pearson, K. G.** (2008). Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res. Rev.* **57**, 183–191.
- Jouvet, M.** (1999). Sleep and serotonin: An unfinished story. *Neuropsychopharmacology* **21**, 245–275.
- Kacprzak, V., Patel, N. A., Riley, E., Yu, L., Yeh, J. R. J. and Zhdanova, I. V.** (2017). Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **157**, 1–8.
- Kahlig, K. M. and Galli, A.** (2003). Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine,

- amphetamine, and cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* **479**, 153–158.
- Kallai, J., Makany, T., Karadi, K. and Jacobs, W. J.** (2005). Spatial orientation strategies in Morris-type virtual water task for humans. *Behav. Brain Res.* **159**, 187–196.
- Kallai, J., Makany, T., Csatho, A., Karadi, K., Horvath, D., Kovacs-Labadi, B., Jarai, R., Nadel, L. and Jacobs, J. W.** (2007). Cognitive and affective aspects of thigmotaxis strategy in humans. *Behav. Neurosci.* **121**, 21–30.
- Kania, B. F., Gralak, M. A. and Wielgosz, M.** (2012). Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure Diminishes Aggressive Behaviour of Male Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). *J. Behav. Brain Sci.* **02**, 185–190.
- Karageorgi, M., Bräcker, L. B., Lebreton, S., Minervino, C., Cavey, M., Siju, K. P., Grunwald Kadow, I. C., Gompel, N. and Prud'homme, B.** (2017). Evolution of Multiple Sensory Systems Drives Novel Egg-Laying Behavior in the Fruit Pest *Drosophila suzukii*. *Curr. Biol.* **27**, 847–853.
- Kaslin, J. and Panula, P.** (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* **440**, 342–377.
- Keenleyside M.H.A.** (1955). Some aspects of the schooling behaviour of fish. *Behaviour* **8**, 183–248.
- Khan, N. A. and Deschaux, P.** (1997). Role of serotonin in fish immunomodulation. *J. Exp. Biol.* **200**, 1833–1838.
- Khan, I. A. and Joy, K. P.** (1988). Seasonal and daily variations in hypothalamic monoamine levels and monoamine oxidase activity in the teleost *channa punctatus* (bloch). *Chronobiol. Int.* **5**, 311–316.
- Khozai, L. I. and Otellin, V. A.** (2006). Formation of the neocortex in mice developing in conditions of prenatal serotonin deficiency. *Neurosci. Behav. Physiol.* **36**, 513–517.
- Kiehn, O., Sillar, K. T., Kjaerulff, O. and McDearmid, J. R.** (1999). Effects of noradrenaline on locomotor rhythm-generating networks in the isolated neonatal rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* **82**, 741–746.
- Kielerich, P., Servili, A., Péron, S., Valotaire, C., Goardon, L., Leguen, I. and Prunet, P.** (2018). Regulation of the corticosteroid signalling system in rainbow trout HPI axis during confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* **258**, 184–193.
- Kim, J. J., Shih, J. C., Chen, K., Chen, L., Bao, S., Maren, S., Anagnostaras, S. G., Fanselow, M. S., De Maeyer, E., Seif, I., et al.** (1997). Selective enhancement of emotional, but not motor, learning in monoamine oxidase A-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5929–5933.
- Kitani, K., Minami, C., Isobe, K. ichi, Maehara, K., Kanai, S., Ivy, G. O. and Carrillo, M. C.** (2002). Why (-)deprenyl prolongs survivals of experimental animals: Increase of anti-oxidant enzymes in brain and other body tissues as well as mobilization of various humoral factors may lead to systemic anti-aging effects. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 1087–1100.
- Kiyasova, V. and Gaspar, P.** (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 1553–1562.
- Klaassen, H., Wang, Y., Adamski, K., Rohner, N. and Kowalko, J. E.** (2018). CRISPR mutagenesis confirms the role of *oca2* in melanin pigmentation in *Astyanax mexicanus*. *Dev. Biol.* **441**, 313–318.
- Kleiman, D. G.** (1985). Paternal Care in New World Primates. *Am. Zool.* **25**, 857–859.
- Kocher, T. D.** (2004). Adaptive evolution and explosive speciation: The cichlid fish model. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 288–298.
- Köhler, C. and Steinbusch, H.** (1982). Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience* **7**,.
- Konradi, C., Svoma, E., Jellinger, K., Riederer, P., Denney, R. and Thibault, J.** (1988). Topographic immunocytochemical mapping of monoamine oxidase-A, monoamine oxidase-B and tyrosine hydroxylase in human post mortem brain stem. *Neuroscience* **26**, 791–802.
- Koshimizu, T. aki, Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H. and Tanoue, A.** (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: From molecules to physiological systems. *Physiol. Rev.* **92**, 1813–1864.
- Koulu, M., Scheinin, M., Kaartinen, A., Kallio, J., Pyykko, K., Vuorinen, J. and Zimmer, R.** (1989). Inhibition of monoamine oxidase by moclobemide: effects on monoamine metabolism and secretion of anterior pituitary hormones and cortisol in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **27**, 243–255.
- Kowalko, J.** (2020). Utilizing the blind cavefish *Astyanax mexicanus* to understand the genetic basis of behavioral evolution. *J. Exp. Biol.* **223**,.
- Kowalko, J. E., Rohner, N., Linden, T. A., Rompani, S. B., Warren, W. C., Borowsky, R., Tabin, C. J., Jeffery, W. R. and Yoshizawa, M.** (2013a). Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16933–16938.
- Kowalko, J. E., Rohner, N., Rompani, S. B., Peterson, B. K., Linden, T. A., Yoshizawa, M., Kay, E. H., Weber, J., Hoekstra, H. E., Jeffery, W. R., et al.** (2013b). Loss of schooling behavior in cavefish through sight-dependent and sight-independent mechanisms. *Curr. Biol.* **23**, 1874–1883.
- Kowalko, J. E., Ma, L. and Jeffery, W. R.** (2016). Genome editing in *astyanax mexicanus* using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *J. Vis. Exp.* **2016**, 1–11.
- Krause, J. and Ruxton, G.** (2002). *Living in Groups*.
- Kusek, M., Sowa, J., Kamińska, K., Gołembiowska, K., Tokarski, K. and Hess, G.** (2015). 5-HT7 receptor modulates GABAergic transmission in the rat dorsal raphe nucleus and controls cortical release of serotonin. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–9.
- Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Roseberg, D. B., Maximino, C., Lima, M. G., Abreu, M. S., Giacomini, A. C., Barcellos, L. J. G., et al.** (2017). Comparative analyses of zebrafish anxiety-like behavior using conflict-based novelty tests. *Zebrafish* **14**, 197–208.
- Lambert, A. M.** (2016). Dopaminergic control of locomotor patterning during development: A tail for the ages. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 1–4.
- Lambert, A. M., Bonkowsky, J. L. and Masino, M. A.** (2012). The conserved dopaminergic diencephalospinal tract mediates vertebrate locomotor development in zebrafish larvae. *J. Neurosci.* **32**, 13488–13500.
- Lamensdorf, I. and Finberg, J. P. M.** (1997). Reduced striatal tyrosine hydroxylase activity is not accompanied by change in

- responsiveness of dopaminergic receptors following chronic treatment with deprenyl. *Neuropharmacology* **36**, 1455–1461.
- Landeau, L. and Terborgh, J.** (1986). Oddity and the “confusion effect” in predation. *Anim. Behav.* **34**, 1372–1380.
- Lanfume, L., Mongeau, R., Cohen-Salmon, C. and Hamon, M.** (2008). Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **32**, 1174–1184.
- Larson, E. T. and Summers, C. H.** (2001). Serotonin reverses dominant social status. *Behav. Brain Res.* **121**, 95–102.
- Latham, C. J. and Blundell, J. E.** (1979). Evidence for the effect of tryptophan on the pattern of food consumption in free feeding and food deprived rats. *Life Sci.* **24**, 1971–1978.
- Lauder, J. M.** (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* **16**, 233–240.
- Lauder, J. M., Liu, J. and Grayson, D. R.** (2000). In utero exposure to serotonergic drugs alters neonatal expression of 5-HT(1A) receptor transcripts: A quantitative RT-PCR study. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 171–176.
- Lee, A. G., Cool, D. R., Grunwald, W. C., Neal, D. E., Buckmaster, C. L., Cheng, M. Y., Hyde, S. A., Lyons, D. M. and Parker, K. J.** (2011). A novel form of oxytocin in new world monkeys. *Biol. Lett.* **7**, 584–587.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilloley, M., Hery, F., Grise, P., Raynaud, G., Verhofstad, A. A. J., Wolf, L. M. and Vaudry, H.** (1992). Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype. *Neuroscience* **47**, 999–1007.
- Lesch, K. P. and Waider, J.** (2012). Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* **76**, 175–191.
- Lethimonier, C., Flouriot, G., Valotaire, Y., Kah, O. and Ducouret, B.** (2000). Transcriptional Interference Between Glucocorticoid Receptor and Estradiol Receptor Mediates the Inhibitory Effect of Cortisol on Fish Vitellogenesis¹. *Biol. Reprod.* **62**, 1763–1771.
- Leutenegger, W.** (1980). Monogamy in callitrichids: A consequence of phyletic dwarfism? *Int. J. Primatol.* **1**, 95–98.
- Levin, E. D., Bencan, Z. and Cerutti, D. T.** (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol. Behav.* **90**, 54–58.
- Levitt, P. and Moore, R. Y.** (1979). Origin and organization of brainstem catecholamine innervation in the rat. *J. Comp. Neurol.* **186**, 505–528.
- Levitt, P., Pintar, J. E. and Breakefield, X. O.** (1982). Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 6385–6389.
- Levitt, P., Harvey, J. A., Friedman, E., Simansky, K. and Murphy, H. E.** (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.* **20**, 269–274.
- Li, Z., Chalazonitis, A., Huang, Y. Y., Mann, J. J., Margolis, K. G., Yang, Q. M., Kim, D. O., Côté, F., Mallet, J. and Gershon, M. D.** (2011). Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **31**, 8998–9009.
- Lillesaar, C.** (2011). The serotonergic system in fish. *J. Chem. Neuroanat.* **41**, 294–308.
- Lillesaar, C., Tannhäuser, B., Stigloher, C., Kremmer, E. and Bally-Cuif, L.** (2007). The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Dev. Dyn.* **236**, 1072–1084.
- Lillesaar, C., Stigloher, C., Tannhäuser, B., Wullmann, M. F. and Bally-Cuif, L.** (2009). Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult Zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize Raphe-specific pet1 expression. *J. Comp. Neurol.* **512**, 158–182.
- Lim, J. E., Porteus, C. S. and Bernier, N. J.** (2013). Serotonin directly stimulates cortisol secretion from the interrenals in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **192**, 246–255.
- Lin, X., Volkoff, H., Narnaware, Y., Bernier, N. J., Peyon, P. and Peter, R. E.** (2000). Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **126**, 415–434.
- Liu, R., Jolas, T. and Aghajanian, G.** (2000). Serotonin 5-HT₂ receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* **873**, 34–45.
- Lopez-Mendoza, D., Aguilar-Bravo, H. and Swanson, H. H.** (1998). Combined effects of gepirone and (+) WAY 100135 on territorial aggression in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **61**, 1–8.
- López-Patiño, M. A., Yu, L., Cabral, H. and Zhdanova, I. V.** (2008). Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiol. Behav.* **93**, 160–171.
- Loveland, J. L., Uy, N., Maruska, K. P., Carpenter, R. E. and Fernald, R. D.** (2014). Social status differences regulate the serotonergic system of a cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *J. Exp. Biol.* **217**, 2680–2690.
- Lowry, C. A.** (2002). Functional subsets of serotonergic neurones: Implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 911–923.
- Lucas, G. and Debonnel, G.** (2002). 5-HT₄ receptors exert a frequency-related facilitatory control on dorsal raphe nucleus 5-HT neuronal activity. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 817–822.
- Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J.** (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2449–2454.
- Lynn, S. E., Egar, J. M., Walker, B. G., Sperry, T. S. and Ramenofsky, M.** (2007). Fish on Prozac: A simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Am. J. Physiol. - Adv. Physiol. Educ.* **31**, 358–363.
- Ma, P. K. M.** (1994). Catecholaminergic systems in the zebrafish. II. Projection pathways and pattern of termination of the locus coeruleus. *J. Comp. Neurol.* **344**, 256–269.
- Ma, P. K. M.** (1997). Catecholaminergic systems in the zebrafish. III. Organization and projection pattern of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. *J. Comp. Neurol.* **381**, 411–427.
- Ma, J., Yoshimura, M., Yamashita, E., Nakagawa, A., Ito, A. and Tsukihara, T.** (2004). Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J. Mol. Biol.* **338**, 103–114.
- Ma, L., Jeffery, W. R., Essner, J. J. and Kowalko, J. E.** (2015). Genome editing using TALENs in blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PLoS One* **10**, 1–17.

- Madison, B. N., Tavakoli, S., Kramer, S. and Bernier, N. J.** (2015). Chronic cortisol and the regulation of food intake and the endocrine growth axis in rainbow trout. *J. Endocrinol.* **226**, 103–119.
- Magurran, A. E. and Pitcher, T. J.** (1983). Foraging, timidity and shoal size in minnows and goldfish. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **12**, 147–152.
- Mathiyalagan, A., Reddy, P. K. and Lam, T. J.** (1996). Effects of cortisol on growth and development in tilapia larvae, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 453–458.
- Matos, F. F., Korpinen, C. and Yocca, F. D.** (1996). 5-HT(1A) receptor agonist effects of BMY-14802 on serotonin release in dorsal raphe and hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **317**, 49–54.
- Matter, J. M., Ronan, P. J. and Summers, C. H.** (1998). Central Monoamines in Free-Ranging Lizards: Differences Associated with Social Roles and Territoriality. *Brain. Behav. Evol.* **51**, 23–32.
- Maule, A. G., Tripp, R. A., Kaattari, S. L. and Schreck, C. B.** (1989). Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.* **120**, 135–142.
- Maurel, A., Hernandez, C., Kunduzova, O., Bompert, G., Cambon, C., Parini, A. and Francés, B.** (2003). Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **284**, 1460–1467.
- Mawe, G. M. and Hoffman, J. M.** (2013). Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 473–486.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S. and Gouveia, A.** (2010). Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behav. Brain Res.* **214**, 157–171.
- Maximino, C., Benzecry, R., Matos Oliveira, K. R., De Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A. M., Broock Rosemberg, D., De Oliveira, D. L. and Blaser, R.** (2012). A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. *Behaviour* **149**, 1099–1123.
- Maximino, C., Puty, B., Matos Oliveira, K. R. and Herculano, A. M.** (2013a). Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. *Genes, Brain Behav.* **12**, 576–582.
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araújo, J., Lima, M. G., De Jesus Oliveira Batista, E., Renata De Matos Oliveira, K., Crespo-Lopez, M. E. and Herculano, A. M.** (2013b). Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology* **71**, 83–97.
- Maximino, C., Da Silva, A. W. B., Araujo, J., Lima, M. G., Miranda, V., Puty, B., Benzecry, R., Picancq-Diniz, D. L. W., Gouveia, A., Oliveira, K. R. M., et al.** (2014a). Fingerprinting of psychoactive drugs in zebrafish anxiety-like behaviors. *PLoS One* **9**, 1–8.
- Maximino, C., Lima, M. G., Costa, C. C., Guedes, I. M. L. and Herculano, A. M.** (2014b). Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **124**, 425–433.
- McCauley, D. W., Hixon, E. and Jeffery, W. R.** (2004). Evolution of pigment cell regression in the cavefish *Astyanax*: A late step in melanogenesis. *Evol. Dev.* **6**, 209–218.
- McEwen, B. S. and Wingfield, J. C.** (2010). What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm. Behav.* **57**, 105–111.
- McGaugh, S. E., Gross, J. B., Aken, B., Blin, M., Borowsky, R., Chalopin, D., Hinaux, H., Jeffery, W. R., Keene, A., Ma, L., et al.** (2014). The cavefish genome reveals candidate genes for eye loss. *Nat. Commun.* **5**.
- McLean, D. L. and Fetcho, J. R.** (2004). Ontogeny and innervation patterns of dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic neurons in larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* **480**, 38–56.
- Medeiros, L. R. and McDonald, M. D.** (2013). Cortisol-mediated downregulation of the serotonin 1A receptor subtype in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **164**, 612–621.
- Medeiros, L. R., Mager, E. M., Grosell, M. and McDonald, M. D.** (2010). The serotonin subtype 1A receptor regulates cortisol secretion in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **168**, 377–387.
- Metz, J. R., Huising, M. O., Meek, J., Taverne-Thiele, A. J., Bonga, S. E. W. and Flik, G.** (2004). Localization, expression and control of adrenocorticotrophic hormone in the nucleus preopticus and pituitary gland of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Endocrinol.* **182**, 23–31.
- Mialet-Perez, J., Santin, Y. and Parini, A.** (2018). Monoamine oxidase-A, serotonin and norepinephrine: synergistic players in cardiac physiology and pathology. *J. Neural Transm.* **125**, 1627–1634.
- Micale, V. and Drago, F.** (2018). Endocannabinoid system, stress and HPA axis. *Eur. J. Pharmacol.* **834**, 230–239.
- Miklya, I.** (2016). The significance of selegiline/(-)-deprenyl after 50 years in research and therapy (1965–2015). *Mol. Psychiatry* **21**, 1499–1503.
- Miller, N. and Gerlai, R.** (2007). Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **184**, 157–166.
- Miller, N. Y. and Gerlai, R.** (2011). Shoaling in zebrafish: What we don't know. *Rev. Neurosci.* **22**, 17–25.
- Mitchell, R., Russell, W. and Elliott, W.** (1977). Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution, and evolution. *Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ* **12**, 1–89.
- Moiseiwitsch, J. R. D.** (2000). The role of serotonin and during craniofacial development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **11**, 230–239.
- Moiseiwitsch, J. R. D., Raymond, J. R., Tamir, H. and Lauder, J. M.** (1998). Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Arch. Oral Biol.* **43**, 789–800.
- Moltesen, M., Laursen, D. C., Thörnqvist, P. O., Andersson, M. Å., Winberg, S. and Höglund, E.** (2016). Effects of acute and chronic stress on telencephalic neurochemistry and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* **219**, 3907–3914.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. and Moon, T. W.** (1999). Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* **9**, 211–268.
- Mongeau, R., Montigny, C. De and Blier, P.** (1994). Electrophysiologic evidence for desensitization of α 2-adrenoceptors on serotonin terminals following long-term treatment with drugs increasing norepinephrine synaptic concentration. *Neuropsychopharmacology* **10**, 41–51.
- Montgomery, J. C. and Macdonald, J. A.** (1987). Sensory tuning of lateral line receptors in Antarctic fish to the movements of planktonic prey. *Science (80-)*. **235**, 195–196.

- Moran, D., Softley, R. and Warrant, E. J.** (2014). Eyeless mexican cavefish save energy by eliminating the circadian rhythm in metabolism. *PLoS One* **9**.
- Moriarty, D. D.** (1995). Anxiogenic effects of a β -carboline on tonic immobility and open field behavior in chickens (*Gallus gallus*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **51**, 795–798.
- Murray, N. M., Buchanan, G. F. and Richerson, G. B.** (2015). Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia. *Sleep* **38**, 1985–1993.
- Nakagawa, H., Matsumura, T., Suzuki, K., Ninomiya, C. and Ishiwata, T.** (2016). Changes of brain monoamine levels and physiological indexes during heat acclimation in rats. *J. Therm. Biol.* **58**, 15–22.
- Nakajima, H., Amano, W., Fujita, A., Fukuhara, A., Azuma, Y. T., Hata, F., Inui, T. and Takeuchi, T.** (2007). The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death. *J. Biol. Chem.* **282**, 26562–26574.
- Neal, K. B., Parry, L. J. and Bornstein, J. C.** (2009). Strain-specific genetics, anatomy and function of enteric neural serotonergic pathways in inbred mice. *J. Physiol.* **587**, 567–586.
- Nebigil, C. G. and Maroteaux, L.** (2001). A novel role for serotonin in heart. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 329–335.
- Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9508–9513.
- Nelson, R. J. and Trainor, B. C.** (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 536–546.
- Nichols, D. E. and Nichols, C. D.** (2008). Serotonin receptors. *Chem. Rev.* **108**, 1614–1641.
- Nicole, B. and Randy, B.** (2013). A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 48–63.
- Nicotra, A. and Senatori, O.** (1989). Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus Carpio*) and rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* **92**, 401–404.
- Nishikawa, T. and Scatton, B.** (1985). Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Raphé nuclei as the neuroanatomical site of the GABAergic inhibition of cerebral serotonergic neurons. *Brain Res.* **331**, 91–103.
- Nomikos, G. G., Arborelius, L. and Svensson, T. H.** (1992). The novel 5-HT_{1A} receptor antagonist (S)-UH-301 prevents (R)-8-OH-DPAT-induced decrease in interstitial concentrations of serotonin in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **216**, 373–378.
- Norton, W. H. J. and Gutiérrez, H. C.** (2019). The three-spined stickleback as a model for behavioural neuroscience. *PLoS One* **14**, 1–18.
- Norton, W. H. J., Folchert, A. and Bally-Cuif, L.** (2008). Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* **511**, 521–542.
- Numazawa, R., Yoshioka, M., Matsumoto, M., Togashi, H., Kemmotsu, O. and Saito, H.** (1995). Pharmacological characterization of α 2-adrenoceptor regulated serotonin release in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **192**, 161–164.
- O'Connor, E. A., Pottinger, T. G. and Sneddon, L. U.** (2011). The effects of acute and chronic hypoxia on cortisol, glucose and lactate concentrations in different populations of three-spined stickleback. *Fish Physiol. Biochem.* **37**, 461–469.
- O'Quin, K. E., Yoshizawa, M., Doshi, P. and Jeffery, W. R.** (2013). Quantitative Genetic Analysis of Retinal Degeneration in the Blind Cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS One* **8**.
- Oikonomou, G., Altermatt, M., Zhang, R. wei, Coughlin, G. M., Montz, C., Gradinaru, V. and Prober, D. A.** (2019). The serotonergic raphe promote sleep in zebrafish and mice. *Neuron* **103**, 686–701.e8.
- Olivier, B.** (2004). Serotonin and aggression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1036**, 382–392.
- Olivier, B., Chan, J., Snoeren, E., Olivier, J., Veening, J., Vinkers, C., Waldinger, M. and Oosting, R.** (2011). Differences in sexual behaviour in male and female rodents: role of serotonin. *Biol. Basis of Sex Differ. Psychopharmacol.* **8**, 15–36.
- Ori, M., De Lucchini, S., Marras, G. and Nardi, I.** (2013). Unraveling new roles for serotonin receptor 2B in development: Key findings from *Xenopus*. *Int. J. Dev. Biol.* **57**, 707–714.
- Ou, X. M., Storrang, J. M., Kushwaha, N. and Albert, P. R.** (2001). Heterodimerization of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors at a Novel Negative Response Element of the 5-HT_{1A} Receptor Gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 14299–14307.
- Øverli, Ø., Harris, C. A. and Winberg, S.** (1999). Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain. Behav. Evol.* **54**, 263–275.
- Øverli, Ø., Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Øverli, E. and Winberg, S.** (2001). Brain monoaminergic activity in rainbow trout selected for high and low stress responsiveness. *Brain. Behav. Evol.* **57**, 214–224.
- Owesson, C. Å., Hopwood, S. E., Callado, L. F., Seif, I., McLaughlin, D. P. and Stamford, J. A.** (2002). Altered presynaptic function in monoaminergic neurons of monoamine oxidase-A knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1516–1522.
- Palfreyman, M. G., Mir, A. K., Kubina, M., Middlemiss, D. N., Richards, M., Tricklebank, M. D. and Fozard, J. R.** (1986). Monoamine receptor sensitivity changes following chronic administration of MDL 72394, a site-directed inhibitor of monoamine oxidase. *Eur. J. Pharmacol.* **130**, 73–89.
- Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., Kolehmainen, J., Torkko, V., Tiittula, A., Moshnyakov, M. and Podlasz, P.** (2006). Modulatory neurotransmitter systems and behavior: Towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish* **3**, 235–247.
- Panula, P., Chen, Y. C., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M. and Sallinen, V.** (2010). The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* **40**, 46–57.
- Paredes-Zúñiga, S., Trost, N., De la Paz, J. F., Alcayaga, J. and Allende, M. L.** (2019). Behavioral effects of triadimefon in zebrafish are associated with alterations of the dopaminergic and serotonergic pathways. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **92**, 118–126.
- Parreiras-E-Silva, L. T., Vargas-Pinilla, P., Duarte, D. A., Longo, D., Espinoza Pardo, G. V., Finkler, A. D., Paixão-Côrtes, V. R., Paré, P., Rovarís, D. L., Oliveira, E. B., et al.** (2017). Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 9044–9049.
- Partridge, B. L. and Pitcher, T. J.** (1980). The sensory basis of fish schools: Relative roles of lateral line and vision. *J. Comp. Physiol.* **135**, 315–325.
- Parzefall, J.** (1974). Rückbildung aggressiver Verhaltensweisen bei einer Höhlenform von *Poecilia sphenops* (Pisces, Poeciliidae). *Z. Für*

- Tierpsychol.* **35**, 66–84.
- Parzefall, J.** (1976). Die Rolle der chemischen Information im Verhalten des Grottenolms *Proteus anguineus* Laur. (Proteidae, Urodela). *Z. Für Tierpsychol.* **42**,.
- Parzefall, J. and Hausberg, C.** (2001). Ontogeny of the aggressive behaviour in epigeal and hypogean populations of *Astyanax fasciatus* (Characidae, Teleostei) and their hybrids. *Mémoires de biospéologie* **28**, 157–161.
- Patton, P., Windsor, S. and Coombs, S.** (2010). Active wall following by Mexican blind cavefish (*Astyanax mexicanus*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **196**, 853–867.
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J. P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevšek, M., Fink, H., Rupnik, M., et al.** (2009). Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β -cells by protein serotonylation. *PLoS Biol.* **7**, 1–10.
- Pavlov, D. S. and Kasumyan, A. O.** (2000). Patterns and mechanisms of schooling behaviour in fish: A review. *J. Ichthyol.* **40**, 163–231.
- Pearlstein, E.** (2013). Role of descending aminergic pathways in the development of locomotion. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 4332–4340.
- Pejaver, V., Urresti, J., Lugo-Martinez, J., Pagel, K. A., Lin, G. N., Nam, H.-J., Mort, M., Cooper, D. N., Sebat, J., Iakoucheva, L. M., et al.** (2017). MutPred2: inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants. *bioRxiv* 1–28.
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Romero-López-Alberca, C., González-Saiz, F., Mico, J. A. and Berrocoso, E.** (2019). Monoaminergic system and depression. *Cell Tissue Res.* **377**, 107–113.
- Perez-Casal, J. and Potter, A. A.** (2016). Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and parasitic diseases. *Vaccine* **34**, 1012–1017.
- Pérez-Maceira, J. J., Otero-Rodiño, C., Mancebo, M. J., Soengas, J. L. and Aldegunde, M.** (2016). Food intake inhibition in rainbow trout induced by activation of serotonin 5-HT_{2C} receptors is associated with increases in POMC, CART and CRF mRNA abundance in hypothalamus. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **186**, 313–321.
- Pérez, M. R., Pellegrini, E., Cano-Nicolau, J., Gueguen, M. M., Menouer-Le Guillou, D., Merot, Y., Vaillant, C., Somoza, G. M. and Kah, O.** (2013). Relationships between radial glial progenitors and 5-HT neurons in the paraventricular organ of adult zebrafish - potential effects of serotonin on adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **38**, 3292–3301.
- Perreault, H. A. N., Semsar, K. and Godwin, J.** (2003). Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiol. Behav.* **79**, 719–724.
- Perrier, J. F. and Cotel, F.** (2015). Serotonergic modulation of spinal motor control. *Curr. Opin. Neurobiol.* **33**, 1–7.
- Petrov, T., Krukoff, T. L. and Jhamandas, J. H.** (1992). The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: A combined double retrograde and immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* **318**, 18–26.
- Petrov, T., Krukoff, T. L. and Jhamandas, J. H.** (1994). Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell Tissue Res.* **277**, 289–295.
- Pickering, A. D. and Pottinger, T. G.** (1987). Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. *J. Fish Biol.* **30**, 363–374.
- Pickering, A. D. and Pottinger, T. G.** (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* **7**, 253–258.
- Picq, S., Alda, F., Krahe, R. and Bermingham, E.** (2014). Miocene and Pliocene colonization of the Central American Isthmus by the weakly electric fish *Brachyhyppopomus occidentalis* (Hypopomidae, Gymnotiformes). *J. Biogeogr.* **41**, 1520–1532.
- Picq, S., Alda, F., Bermingham, E. and Krahe, R.** (2016). Drift-driven evolution of electric signals in a Neotropical knifefish. *Evolution* **70**, 2134–2144.
- Pierre, C., Pradère, N., Froc, C., Ornelas-García, P., Callebert, J. and Rétaux, S.** (2020). A mutation in monoamine oxidase (MAO) affects the evolution of stress behavior in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J. Exp. Biol.* **Submitted**.
- Pitcher, T. and Parrish, J.** (1993). Function of shoaling behaviour in teleosts. In *Behaviour of teleost fishes*, pp. 363–439.
- Pitcher, T. J., Magurran, A. E. and Winfield, I. J.** (1982). Fish in larger shoals find food faster. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **10**, 149–151.
- Piton, A., Poquet, H., Redin, C., Masurel, A., Lauer, J., Muller, J., Thevenon, J., Herenger, Y., Chancenotte, S., Bonnet, M., et al.** (2014). 20 ans après: A second mutation in MAOA identified by targeted high-throughput sequencing in a family with altered behavior and cognition. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**, 776–783.
- Policarpo, M., Fumey, J., Lafargeas, P. and Naquin, D.** (2020). Contrasted gene decay in subterranean vertebrates : insights from cavefishes and fossorial mammals. *bioRxiv* 978213.
- Popova, N. K.** (2006). From genes to aggressive behavior: The role of serotonergic system. *BioEssays* **28**, 495–503.
- Popova, N. K., Voitenko, N. N., Kulikov, A. V. and Avgustinovich, D. F.** (1991). Evidence for the involvement of central serotonin in mechanism of domestication of silver foxes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **40**, 751–756.
- Popova, N. K., Gilinsky, M. A., Amstislavskaya, T. G., Morosova, E. A., Seif, I. and De Maeyer, E.** (2001). Regional serotonin metabolism in the brain of transgenic mice lacking monoamine oxidase A. *J. Neurosci. Res.* **66**, 423–427.
- Popova, N. K., Maslova, L. N., Morosova, E. A., Bulygina, V. V. and Seif, I.** (2006). MAO A knockout attenuates adrenocortical response to various kinds of stress. *Psychoneuroendocrinology* **31**, 179–186.
- Prasad, P., Ogawa, S. and Parhar, I. S.** (2015). Role of serotonin in fish reproduction. *Front. Neurosci.* **9**, 1–9.
- Pronina, T., Ugrumov, M. V., Adamskaya, E., Kuznetsova, T., Shishkina, I., Babichev, V., Calas, A., Tramu, G., Maily, P. and Makarenko, I.** (2003). Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurones in rat fetuses. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 549–558.
- Protas, M. E., Hersey, C., Kochanek, D., Zhou, Y., Wilkens, H., Jeffery, W. R., Zon, L. I., Borowsky, R. and Tabin, C. J.** (2006). Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat. Genet.* **38**, 107–111.
- Protas, M., Conrad, M., Gross, J. B., Tabin, C. and Borowsky, R.** (2007). Regressive Evolution in the Mexican Cave Tetra, *Astyanax mexicanus*. *Curr. Biol.* **17**, 452–454.
- Prunet, P., Sturm, A. and Milla, S.** (2006). Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts. *Gen. Comp. Endocrinol.* **147**, 17–23.
- Quadros, V. A., Costa, F. V., Canzian, J., Nogueira, C. W. and Rosemberg, D. B.** (2018). Modulatory role of conspecific alarm substance

- on aggression and brain monoamine oxidase activity in two zebrafish populations. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **86**, 322–330.
- Raiteri, M., Maura, G., Folghera, S., Cavazzani, P., Andrioli, G. C., Schlicker, E., Schalmus, R. and Göthert, M. (1990). Modulation of 5-hydroxytryptamine release by presynaptic inhibitory α 2-adrenoceptors in the human cerebral cortex. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **342**, 508–512.
- Ramasamy, S., Ometto, L., Crava, C. M., Revadi, S., Kaur, R., Horner, D. S., Pisani, D., Dekker, T., Anfora, G. and Rota-Stabelli, O. (2016). The evolution of olfactory gene families in Drosophila and the genomic basis of chemical-ecological adaptation in *Drosophila suzukii*. *Genome Biol. Evol.* **8**, 2297–2311.
- Ramsay, J. M., Feist, G. W., Varga, Z. M., Westerfield, M., Kent, M. L. and Schreck, C. B. (2006). Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* **258**, 565–574.
- Rebrin, I., Geha, R. M., Chen, K. and Shih, J. C. (2001). Effects of Carboxyl-terminal Truncations on the Activity and Solubility of Human Monoamine Oxidase B. *J. Biol. Chem.* **276**, 29499–29506.
- Rehnberg, B. G. and Smith, R. J. F. (1988). The influence of alarm substance and shoal size on the behaviour of zebra danios, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *J. Fish Biol.* **33**, 155–163.
- Reid, S. G., Bernier, N. J. and Perry, S. F. (1998). The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **120**, 1–27.
- Reisoli, E., De Lucchini, S., Nardi, I. and Ori, M. (2010). Serotonin 2B receptor signaling is required for craniofacial morphogenesis and jaw joint formation in *Xenopus*. *Development* **137**, 2927–2937.
- Reist, C., Nakamura, K., Sagart, E., Sokolski, K. N. and Fujimoto, K. A. (2003). Impulsive aggressive behavior: Open-label treatment with citalopram. *J. Clin. Psychiatry* **64**, 81–84.
- Ren, G., Li, S., Zhong, H. and Lin, S. (2013). Zebrafish tyrosine hydroxylase 2 gene encodes tryptophan hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **288**, 22451–22459.
- Rétaux, S., Alié, A., Blin, M., Devos, L., Elipot, Y. and Hinaux, H. (2016). Neural development and evolution in *Astyanax mexicanus*: comparing cavefish and surface fish brains. In *The Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*, pp. 223–240.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, É., Langlois, X., El Mestikawy, S., Hamon, M. and Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* **417**, 181–194.
- Riddle, M. R., Boesmans, W., Caballero, O., Kazwiny, Y. and Tabin, C. J. (2018a). Morphogenesis and motility of the *Astyanax mexicanus* gastrointestinal tract. *Dev. Biol.* **441**, 285–296.
- Riddle, M. R., Aspiras, A. C., Gaudenz, K., Peuss, R., Sung, J. Y., Martineau, B., Peavey, M., Box, A. C., Tabin, J. A., McGaugh, S., et al. (2018b). Insulin resistance in cavefish as an adaptation to a nutrient-limited environment. *Nature* **555**, 647–651.
- Riedel, G. (1998). Long-term habituation to spatial novelty in blind cave fish (*Astyanax hubbsi*): Role of the telencephalon and its subregions. *Learn. Mem.* **4**, 451–461.
- Rink, E. and Guo, S. (2004). The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience* **127**, 147–154.
- Rink, E. and Wullimann, M. F. (2002). Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: An immunohistochemical study. *Dev. Brain Res.* **137**, 89–100.
- Rodríguez, F., Duran, E., Vargas, J. P., Torres, B. and Salas, C. (1994). Performance of goldfish trained in allocentric and egocentric maze procedures suggests the presence of a cognitive mapping system in fishes. *Anim. Learn. Behav.* **22**, 409–420.
- Rodríguez, F., López, J. C., Vargas, J. P., Gómez, Y., Broglio, C. and Salas, C. (2002). Conservation of Spatial Memory Function in the Pallial Forebrain of Reptiles and Ray-Finned Fishes. *J. Neurosci.* **22**, 2894–2903.
- Rodríguez, R. M., Chu, R., Caron, M. G. and Wetsel, W. C. (2004). Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice. *Behav. Brain Res.* **148**, 185–198.
- Rotllant, J., Ruane, N. M., Dinis, M. T., Canario, A. V. M. and Power, D. M. (2006). Intra-adrenal interactions in fish: Catecholamine stimulated cortisol release in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **143**, 375–381.
- Ruuskanen, J. O., Laurila, J., Xhaard, H., Rantanen, V. V., Vuoriluoto, K., Wurster, S., Marjamäki, A., Vainio, M., Johnson, M. S. and Scheinin, M. (2005). Conserved structural, pharmacological and functional properties among the three human and five zebrafish α 2-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 165–177.
- Saito, K. and Watanabe, S. (2006). Deficits in acquisition of spatial learning after dorsomedial telencephalon lesions in goldfish. *Behav. Brain Res.* **172**, 187–194.
- Salas-Ramirez, K. Y., Frankfurt, M., Alexander, A., Luine, V. N. and Friedman, E. (2010). Prenatal cocaine exposure increases anxiety, impairs cognitive function and increases dendritic spine density in adult rats: influence of sex. *Neuroscience* **169**, 1287–1295.
- Saligaut, C., Bailhache, T., Salbert, G., Breton, B. and Jegou, P. (1990). Dynamic characteristics of serotonin and dopamine metabolism in the rainbow trout brain: a regional study using liquid chromatography with electrochemical detection. *Fish Physiol. Biochem.* **8**, 199–205.
- Salin, K., Voituren, Y., Mourin, J. and Hervant, F. (2010). Cave colonization without fasting capacities: An example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **156**, 451–457.
- Sallinen, V., Sundvik, M., Reenilä, I., Peitsaro, N., Khrustalyov, D., Anichtchik, O., Toleikyte, G., Kaslin, J. and Panula, P. (2009). Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *J. Neurochem.* **109**, 403–415.
- Sánchez-Gracia, A., Vieira, F. G. and Rozas, J. (2009). Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity (Edinb.)* **103**, 208–216.
- Sánchez, C. (1997). Interaction studies of 5-HT(1A) receptor antagonists and selective 5-HT reuptake inhibitors in isolated aggressive mice. *Eur. J. Pharmacol.* **334**, 127–132.
- Sangiao-Alvarellos, S., Lapido, M., Miguez, J. M. and Soengas, J. L. (2004). Effects of central administration of arginine vasotocin on monoaminergic neurotransmitters and energy metabolism of rainbow trout brain. *J. Fish Biol.* **64**, 1313–1329.
- Saphier, D., Farrar, G. E. and Welch, J. E. (1995). Differential inhibition of stress-induced adrenocortical responses by 5-HT1A agonists

- and by 5-HT₂ and 5-HT₃ antagonists. *Psychoneuroendocrinology* **20**, 239–257.
- Scammell, T. E., Arrigoni, E. and Lipton, J. O. (2017). Neural circuitry of wakefulness and sleep. *Neuron* **93**, 747–765.
- Scerbina, T., Chatterjee, D. and Gerlai, R. (2012). Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: A strain comparison study. *Amino Acids* **43**, 2059–2072.
- Schemmel, C. (1967). Vergleichende Untersuchungen an den Hautsinnesorganen ober- und unterirdisch lebender Astyanax-Formen. *Z. Morph. Tiere* **61**, 255–316.
- Schemmel, C. (1980). Studies on the genetics of feeding behaviour in the cave fish *Astyanax mexicanus* f. *anoptichthys*. *Z. Tierpsychol* **53**, 9–22.
- Schjolden, J., Pulman, K. G. T., Pottinger, T. G., Tottmar, O. and Winberg, S. (2006). Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. *Physiol. Behav.* **87**, 938–947.
- Schnörr, S. J., Steenbergen, P. J., Richardson, M. K. and Champagne, D. L. (2012). Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav. Brain Res.* **228**, 367–374.
- Schreck, C. B. (2000). Accumulation and long-term effects of stress in fish. In *The biology of animal stress*, pp. 147–158.
- Schweitzer, J., Löhr, H., Filippi, A. and Driever, W. (2012). Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev. Neurobiol.* **72**, 256–268.
- Scott, A. L., Bortolato, M., Chen, K. and Shih, J. C. (2008). Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. *Neuroreport* **19**, 739–743.
- Sena, L. M., Bueno, C., Pobbe, R. L. H., Andrade, T. G. C. S., Zangrossi, H. and Viana, M. B. (2003). The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav. Brain Res.* **142**, 125–133.
- Senatori, O., Nicotra, A. and Scopelliti, R. (1990). Monoamine oxidase activity in embryos of pike (*Esox lucius*). *Comp. Biochem. Physiol.* **96**, 87–90.
- Setini, A., Pierucci, F., Senatori, O. and Nicotra, A. (2005). Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **140**, 153–161.
- Shajib, M. S. and Khan, W. I. (2015). The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol.* **213**, 561–574.
- Shams, S., Seguin, D., Faccioli, A., Chatterjee, D. and Gerlai, R. (2017). Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. *Behav. Neurosci.* **131**, 492–504.
- Sharma, S., Coombs, S., Patton, P. and De Perera, T. B. (2009). The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **195**, 225–240.
- Sharp, T., Bramwell, S. R. and Grahame-Smith, D. G. (1989). 5-HT₁ agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 283–290.
- Sharples, S. A., Koblinger, K., Humphreys, J. M. and Whelan, P. J. (2014). Dopamine: A parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Front. Neural Circuits* **8**, 1–16.
- Shemer, A. V., Azmitia, E. C. and Whitaker-Azmitia, P. M. (1991). Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. *Dev. Brain Res.* **59**, 59–63.
- Shih, J. C. (2018). Monoamine oxidase isoenzymes: genes, functions and targets for behavior and cancer therapy. *J. Neural Transm.* **125**, 1553–1566.
- Shih, J., Lan, N., Bach, A., Burke, D., Bembenek, A. M., Kwan, A. W., Abell, A. C. and Seeburg, P. (1988). Molecular basis of mao A and B: cDNA cloning of human liver MAO A and B. *Pharmacol. Res. Commun.* **20**, 7.
- Shih, J. C., Chen, K. and Ridd, M. J. (1999). MONOAMINE OXIDASE: From Genes to Behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 197–217.
- Shimomura, Y. (2019). Reduction of Tryptophan Hydroxylase Expression in the Brain of Medaka Fish After Repeated Heat Stress. *Zoolog. Sci.* **36**, 223.
- Šimić, G., Leko, M. B., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., Silva, R. De, Di Giovanni, G., et al. (2018). Monoaminergic Neuropathology in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **151**, 101–138.
- Simon, P., Dupuis, R. and Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav. Brain Res.* **61**, 59–64.
- Simon, V., Elleboode, R., Mahé, K., Legendre, L., Ornelas-Garcia, P., Espinasa, L. and Rétaux, S. (2017). Comparing growth in surface and cave morphs of the species *Astyanax mexicanus*: Insights from scales. *Evodevo* **8**, 1–13.
- Simon, V., Hyacinthe, C. and Rétaux, S. (2019). Breeding behavior in the blind Mexican cavefish and its river-dwelling conspecific. *PLoS One* **14**, 1–16.
- Slovan, K., Metcalfe, N. B., Taylor, A. C. and Gilmour, K. M. (2000). Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. *Physiol. Biochem. Zool.* **74**, 383–389.
- Sodhi, M. S. K. and Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. *Int. Rev. Neurobiol.* **59**, 111–174.
- Sohn, J. W., Xu, Y., Jones, J. E., Wickman, K., Williams, K. W. and Elmquist, J. K. (2011). Serotonin 2C receptor activates a distinct population of arcuate pro-opiomelanocortin neurons via TRPC channels. *Neuron* **71**, 488–497.
- Son, S. Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E. and Tsukihara, T. (2008). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5739–5744.
- Souza, B. R. and Tropepe, V. (2011). The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: A tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. *Rev. Neurosci.* **22**, 107–119.
- Sovrano, V. A., Potrich, D., Foà, A. and Bertolucci, C. (2018). Extra-Visual Systems in the Spatial Reorientation of Cavefish. *Sci. Rep.* **8**, 1–9.
- Speedie, N. and Gerlai, R. (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **188**, 168–177.
- Sperry, T. S., Thompson, C. K. and Wingfield, J. C. (2003). Effects of acute treatment with 8-OH-DPAT and fluoxetine on aggressive behaviour in male song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *J. Neuroendocrinol.* **15**, 150–160.

- Stachowiak, M. K., Stricker, E. M., Jacoby, J. H. and Zigmund, M. J. (1986). Increased tryptophan hydroxylase activity in serotonergic nerve terminals spared by 5,7-dihydroxytryptamine. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1241–1248.
- Staes, N., Sherwood, C. C., Freeman, H., Brosnan, S. F., Schapiro, S. J., Hopkins, W. D. and Bradley, B. J. (2019). Serotonin receptor 1a variation is associated with anxiety and agonistic behavior in chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **36**, 1418–1429.
- Stahl, B. A., Jaggard, J. B., Chin, J. S. R., Kowalko, J. E., Keene, A. C. and Duboué, E. R. (2019). Manipulation of gene function in Mexican cavefish. *J. Vis. Exp.* **2019**, 1–12.
- Starke, K., Gothert, M. and Kilbinger, H. (1989). Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* **69**, 864–989.
- Stefano, G. and Catapane, E. (1977). The effects on of temperature acclimation on monoamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **203**, 449–456.
- Stenfors, C. and Ross, S. B. (2004). Changes in extracellular 5-HIAA concentrations as measured by in vivo microdialysis technique in relation to changes in 5-HT release. *Psychopharmacology (Berl)*. **172**, 119–128.
- Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Utterback, E., Gilder, T., Kyzar, E., Newman, A., et al. (2011). Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **35**, 1421–1431.
- Stockdale, W. T., Lemieux, M. E., Killen, A. C., Zhao, J., Hu, Z., Riepsaame, J., Hamilton, N., Kudoh, T., Riley, P. R., van Aerle, R., et al. (2018). Heart Regeneration in the Mexican Cavefish. *Cell Rep.* **25**, 1997-2007.e7.
- Stoddard, P. K. (1999). Predation enhances complexity in the evolution of electric fish signals. *Nature* **400**, 254–256.
- Stouthart, A. J. H. X., Lucassen, E. C. H. E. T., Van Strien, F. J. C., Balm, P. H. M., Lock, R. A. C. and Wendelaar Bonga, S. E. (1998). Stress responsiveness of the pituitary-interrenal axis during early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Endocrinol.* **157**, 127–137.
- Stoyek, M. R., Jonz, M. G., Smith, F. M. and Croll, R. P. (2017). Distribution and chronotropic effects of serotonin in the zebrafish heart. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **206**, 43–50.
- Strickler, A. G. and Soares, D. (2011). Comparative genetics of the central nervous system in epigeal and hypogeal *Astyanax mexicanus*. *Genetica* **139**, 383–391.
- Stunes, A. K., Reseland, J. E., Hauso, O., Kidd, M., Tømmerås, K., Waldum, H. L., Syversen, U. and Gustafsson, B. I. (2011). Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes, Obes. Metab.* **13**, 551–558.
- Sullivan, J. P., Lavoué, S. and Hopkins, C. D. (2000). Molecular systematics of the African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and a model for the evolution of their electric organs. *J. Exp. Biol.* **203**, 665–683.
- Sumara, G., Sumara, O., Kim, J. K. and Karsenty, G. (2012). Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metab.* **16**, 588–600.
- Summers, C. H. and Winberg, S. (2006). Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *J. Exp. Biol.* **209**, 4581–4589.
- Summers, C. H., Korzan, W. J., Lukkes, J. L., Watt, M. J., Forster, G. L., Øverli, Ø., Höglund, E., Larson, E. T., Ronan, P. J., Matter, J. M., et al. (2005). Does serotonin influence aggression? Comparing regional activity before and during social interaction. *Physiol. Biochem. Zool.* **78**, 679–694.
- Swanson, L. W. and Hartman, B. K. (1975). The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-B-hydroxylase as a marker. *J. Comp. Neurol.* **163**, 467–505.
- Takahashi, A., Quadros, I. M., De Almeida, R. M. M. and Miczek, K. A. (2011). Brain serotonin receptors and transporters: Initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology (Berl)*. **213**, 183–212.
- Tanaka, M., Sato, A., Kasai, S., Hagino, Y., Kotajima-Murakami, H., Kashii, H., Takamatsu, Y., Nishito, Y., Inagaki, M., Mizuguchi, M., et al. (2018a). Brain hyperserotonemia causes autism-relevant social deficits in mice. *Mol. Autism* **9**, 1–14.
- Tanaka, Y., Fujiwara, M., Shindo, A., Yin, G., Kitazawa, T. and Teraoka, H. (2018b). Aroclor 1254 and BDE-47 inhibit dopaminergic function manifesting as changes in locomotion behaviors in zebrafish embryos. *Chemosphere* **193**, 1207–1215.
- Tao, R. and Hjorth, S. (1992). α 2-Adrenoceptor modulation of rat ventral hippocampal 5-hydroxytryptamine release in vivo. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **345**, 137–143.
- Tea, J., Alderman, S. L. and Gilmour, K. M. (2019). Social stress increases plasma cortisol and reduces forebrain cell proliferation in subordinate male zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* **222**, 1–10.
- Teles, M. C., Dahlbom, S. J., Winberg, S. and Oliveira, R. F. (2013). Social modulation of brain monoamine levels in zebrafish. *Behav. Brain Res.* **253**, 17–24.
- Teraoka, H., Russell, C., Regan, J., Chandrasekhar, A., Concha, M. L. and Yokoyama, R. (2009). Hedgehog and Fgf Signaling Pathways Regulate the Development of tphR-Expressing Serotonergic Raphe Neurons in Zebrafish Embryos. *J. Neurobiol.* **60**, 275–288.
- Teyke, T. (1985). Collision with and avoidance of obstacles by blind cave fish *Anoptichthys jordani* (Characidae). *J. Comp. Physiol.* **157**, 837–843.
- Teyke, T. (1989). Learning and remembering the environment in the blind cave fish *Anoptichthys jordani*. *J. Comp. Physiol. A* **164**, 655–662.
- Teyke, T. (1990). Morphological differences in neuromasts of the blind cave fish *Astyanax hubbsi* and the sighted river fish. *Brain. Behav. Evol.* **35**, 23–30.
- Themann, C., Alvarez Fischer, D., Groß, S., Westermann, R., Weihe, E., Kuschinsky, K., Schäfer, M. and Ferger, B. (2002). Effect of repeated treatment with high doses of selegiline on behaviour, striatal dopaminergic transmission and tyrosine hydroxylase mRNA levels. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **365**, 22–28.
- Theodoridi, A., Tsalafouta, A. and Pavlidis, M. (2017). Acute exposure to fluoxetine alters aggressive behavior of zebrafish and expression of genes involved in serotonergic system regulation. *Front. Neurosci.* **11**, 1–9.
- Thirumalai, V. and Cline, H. T. (2008). Endogenous dopamine suppresses initiation of swimming in prefeeding zebrafish larvae. *J. Neurophysiol.* **100**, 1635–1648.
- Torres-Paz, J., Hyacinthe, C., Pierre, C. and Rétaux, S. (2018). Towards an integrated approach to understand Mexican cavefish

evolution. *Biol. Lett.* **14**.

- Torres-Paz, J., Leclercq, J. and Rétaux, S.** (2019). Maternally-regulated gastrulation as a source of variation contributing to cavefish forebrain evolution. *Elife* **8**, 1–28.
- Tort, L.** (2011). Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1366–1375.
- Tran, S., Nowicki, M., Muraleetharan, A. and Gerlai, R.** (2015). Differential effects of dopamine D1 and D2/3 receptor antagonism on motor responses. *Psychopharmacology (Berl.)* **232**, 795–806.
- Treit, D. and Fundytus, M.** (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **31**, 959–962.
- Trendelenburg, A. U., Trendelenburg, M., Starke, K. and Limberger, N.** (1994). Release-inhibiting α 2-adrenoceptors at serotonergic axons in rat and rabbit brain cortex: evidence for pharmacological identity with α 2-autoreceptors. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **349**, 25–33.
- Trivers, R. L.** (1971). The Evolution of Reciprocal Altruism. *Q. Rev. Biol.* **46**, 35–57.
- Tsai, M. A., Wang, P. C., Cao, T. T., Liao, P. C., Liaw, L. L. and Chen, S. C.** (2013). Immunoprotection of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Lactococcus garvieae* against *Lactococcosis* in tilapia. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**, 437–449.
- Urtikova, N. A., Sapronova, A. Y., Brisorgueil, M. J., Verge, D. and Ugryumov, M. V.** (2009). Development of serotonergic neurons of dorsal raphe nuclei in mice with knockout of monoamine oxidase A and 5-HT1A and 5-HT1B autoreceptor. *Russ. J. Dev. Biol.* **40**, 212–221.
- Vaccari, A., Brotman, S., Cimino, J. and Timiras, P. S.** (1978). Adaptive changes induced by high altitude in the development of brain monoamine enzymes. *Neurochem. Res.* **3**, 295–311.
- Van Kesteren, R. E. and Spencer, G. E.** (2003). The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation. *Rev. Neurosci.* **14**, 217–231.
- van Olst, J. C. and Hunter, J. R.** (1970). Some aspects of the organisation of fish schools. *J. l'Office des Rech. sur les pêcheries du Canada* **27**, 1225–1238.
- Vargas-Pinilla, P., Paixa_o-Côrtes, V. R., Paré, P., Tovo-Rodrigues, L., De Alencar Gadelha Vieira, C. M., Xavier, A., Comas, D., Pissinatti, A., Sinigaglia, M., Rigo, M. M., et al.** (2015). Evolutionary pattern in the OXT-OXTR system in primates: Coevolution and positive selection footprints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 88–93.
- Velarde, E., Delgado, M. J. and Alonso-Gómez, A. L.** (2010). Serotonin-induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (*Carassius auratus*): Characterization and interactions with melatonin. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**.
- Vicente, M. A., Zangrossi, H., dos Santos, L., de Macedo, C. E. and Andrade, T. G. C. S.** (2008). Involvement of median raphe nucleus 5-HT1A receptors in the regulation of generalized anxiety-related defensive behaviours in rats. *Neurosci. Lett.* **445**, 204–208.
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G. and Iwama, G. K.** (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **116**, 89–95.
- Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, J. and Parnavelas, J. G.** (2007). Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 331–344.
- Vitalis, T., Ansorge, M. S. and Dayer, A. G.** (2013). Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: Special attention to the 5-HT3A and 5-HT6 receptor subtypes. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–20.
- Voigt, J. P. and Fink, H.** (2015). Serotonin controlling feeding and satiety. *Behav. Brain Res.* **277**, 14–31.
- Vrana, S. L., Azzaro, A. J. and Vrana, K. E.** (1992). Chronic selegiline administration transiently decreases tyrosine hydroxylase activity and mRNA in the rat nigrostriatal pathway. *Mol. Pharmacol.* **41**, 839–844.
- Vrana, S. L., Dworkin, S. I. and Vrana, K. E.** (1993). Radioenzymatic assay for tryptophan hydroxylase: [3H]H₂O release assessed by charcoal adsorption. *J. Neurosci. Methods* **48**, 123–129.
- Wagener, J., Schneider, J. J., Baxmann, S., Kalbacher, H., Borelli, C., Nuding, S., Küchler, R., Wehkamp, J., Kaeser, M. D., Mailänder-Sanchez, D., et al.** (2013). A peptide derived from the highly conserved protein gapdh is involved in tissue protection by different antifungal strategies and epithelial immunomodulation. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 144–153.
- Walther, D. J. and Bader, M.** (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1673–1680.
- Walther, D. J., Peter, J. U., Winter, S., Höltje, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinkel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C. S., Ahnert-Hilger, G., et al.** (2003). Serotonylation of Small GTPases Is a Signal Transduction Pathway that Triggers Platelet α -Granule Release. *Cell* **115**, 851–862.
- Wang, Y., Takai, R., Yoshioka, H. and Shirabe, K.** (2006). Characterization and Expression of Serotonin Transporter Genes in Zebrafish. *Tohoku J. Exp. Med.* **208**, 267–274.
- Wang, Z., Nishimura, Y., Shimada, Y., Umemoto, N., Hirano, M., Zang, L., Oka, T., Sakamoto, C., Kuroyanagi, J. and Tanaka, T.** (2009). Zebrafish β -adrenergic receptor mRNA expression and control of pigmentation. *Gene* **446**, 18–27.
- Weber, R. A., MacEira, J. J. P., Mancebo, M. J., Peleteiro, J. B., Martín, L. O. G. and Aldegunde, M.** (2012). Effects of acute exposure to exogenous ammonia on cerebral monoaminergic neurotransmitters in juvenile *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology* **21**, 362–369.
- Welch, J. E., Farrar, G. E., Dunna, A. J. and Saphiet, D.** (1993). Central 5-HT1A receptors inhibit adrenocortical secretion. *Neuroendocrinology* **57**, 272–281.
- Wendelaar, S.** (1997). The Stress Response in Fish. *Physiol. Rev.* **77**, 591–625.
- Westlund, K. N., Krakower, T. J., Kwan, S. W. and Abell, C. W.** (1993). Intracellular distribution of monoamine oxidase A in selected regions of rat and monkey brain and spinal cord. *Brain Res.* **612**, 221–230.
- Whitaker-azmitia, P. M., Druse, M., Walker, P. and Lauder, J. M.** (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behav. Brain Res.* **73**, 19–29.
- Whitaker-Azmitia, P. M.** (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: A role in autism? *Int. J. Dev. Neurosci.* **23**, 75–83.
- Whitaker-Azmitia, P. M. and Azmitia, E. C.** (1986). Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: Role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci. Lett.* **67**, 307–312.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Zhang, X. and Clarke, C.** (1994). Effects of gestational exposure to monoamine oxidase inhibitors in rats: Preliminary behavioral and neurochemical studies. *Neuropsychopharmacology* **11**, 125–132.

- Wilkens, H. (1988). Evolution and Genetics of Epigeal and Cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Evol. Biol.* 271–367.
- Wilkens, H. and Strecker, U. (2003). Convergent evolution of the cavefish *Astyanax* (Characidae, Teleostei): Genetic evidence from reduced eye-size and pigmentation. *Biol. J. Linn. Soc.* 80, 545–554.
- Wilkinson, G. S. (1984). Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature* 308, 181–184.
- Winberg, S. and Nilsson, G. E. (1992). Induction of social dominance by L-dopa treatment in Arctic charr. *Neuroreport* 3, 243–246.
- Winberg, S. and Nilsson, G. E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp.* 106, 597–614.
- Winberg, S. and Thörnqvist, P. O. (2016). Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Curr. Zool.* 62, 317–323.
- Winberg, S., Nilsson, G., Spruijt, B. and Höglund, U. (1993). Spontaneous locomotor activity in arctic charr measured by a computerized imaging technique: role of brain serotonergic activity. *J. Exp. Biol.* 179, 213–232.
- Winberg, S., Nilsson, A., Hylland, P., Söderstöm, V. and Nilsson, G. E. (1997). Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neurosci. Lett.* 230, 113–116.
- Winberg, S., Øverli, Ø. and Lepage, O. (2001). Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J. Exp. Biol.* 204, 3867–3876.
- Windsor, S. P., Tan, D. and Montgomery, J. C. (2008). Swimming kinematics and hydrodynamic imaging in the blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *J. Exp. Biol.* 211, 2950–2959.
- Wisor, J. P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G. H., Mignot, E. and Edgar, D. M. (2001). Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J. Neurosci.* 21, 1787–1794.
- Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., Goodspeed, J., Suci, C., Tan, J., Grimes, C., et al. (2010). Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 208, 450–457.
- Xiong, S., Krishnan, J., Peuß, R. and Rohner, N. (2018). Early adipogenesis contributes to excess fat accumulation in cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Dev. Biol.* 441, 297–304.
- Yadav, V. K., Ryu, J. H., Suda, N., Tanaka, K. F., Gingrich, J. A., Schütz, G., Glorieux, F. H., Chiang, C. Y., Zajac, J. D., Insogna, K. L., et al. (2008). Lrp5 Controls Bone Formation by Inhibiting Serotonin Synthesis in the Duodenum. *Cell* 135, 825–837.
- Yamamoto, Y., Espinasa, L., Stock, D. W. and Jeffery, W. R. (2003). Development and evolution of craniofacial patterning is mediated by eye-dependent and -independent processes in the cavefish *Astyanax*. *Evol. Dev.* 5, 435–446.
- Yamamoto, Y., Stock, D. W. and Jeffery, W. R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 431, 844–847.
- Yamamoto, Y., Byerly, M. S., Jackman, W. R. and Jeffery, W. R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev. Biol.* 330, 200–211.
- Yamamoto, K., Mirabeau, O., Bureau, C., Blin, M., Michon-Coudouel, S., Demarque, M. and Vernier, P. (2013). Evolution of dopamine receptor genes of the D1 class in vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 30, 833–843.
- Yamamoto, K., Fontaine, R., Pasqualini, C. and Vernier, P. (2015). Classification of Dopamine Receptor Genes in Vertebrates: Nine Subtypes in Osteichthyes. *Brain. Behav. Evol.* 86, 164–175.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8.
- Yang, J., Chen, X., Bai, J., Fang, D., Qiu, Y., Jiang, W., Yuan, H., Bian, C., Lu, J., He, S., et al. (2016a). The *Sinocyclocheilus* cavefish genome provides insights into cave adaptation. *BMC Biol.* 14, 1–13.
- Yang, J., Wang, Y. and Zhang, Y. (2016b). ResQ: An Approach to Unified Estimation of B-Factor and Residue-Specific Error in Protein Structure Prediction. *J. Mol. Biol.* 428, 693–701.
- Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Tamir, H., Sadler, T. W. and Lauder, J. M. (1993). Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 47, 573–584.
- Yoshizawa, M., Gorički, Š., Soares, D. and Jeffery, W. R. (2010). Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr. Biol.* 20, 1631–1636.
- Yoshizawa, M., Yamamoto, Y., O'Quin, K. E. and Jeffery, W. R. (2012). Evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors promotes eye regression in blind cavefish. *BMC Biol.* 10, .
- Yoshizawa, M., Jeffery, W. R., Van Netten, S. M. and McHenry, M. J. (2014). The sensitivity of lateral line receptors and their role in the behavior of Mexican blind cavefish (*Astyanax mexicanus*). *J. Exp. Biol.* 217, 886–895.
- Yoshizawa, M., Robinson, B. G., Duboué, E. R., Masek, P., Jaggard, J. B., O'Quin, K. E., Borowsky, R. L., Jeffery, W. R. and Keene, A. C. (2015). Distinct genetic architecture underlies the emergence of sleep loss and prey-seeking behavior in the Mexican cavefish. *BMC Biol.* 13, 1–12.
- Yoshizawa, M., Settle, A., Hermosura, M. C., Tuttle, L. J., Cetraro, N., Passow, C. N. and McGaugh, S. E. (2018). The evolution of a series of behavioral traits is associated with autism-risk genes in cavefish. *BMC Evol. Biol.* 18, 1–16.
- Youdim, M. B. H., Edmondson, D. and Tipton, K. F. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 295–309.
- Zangrossi, H. and Graeff, F. G. (2014). Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 46, 397–406.
- Zeiss, C. J. (2005). Neuroanatomical phenotyping in the mouse: The dopaminergic system. *Vet. Pathol.* 42, 753–773.
- Zhang, J., Zhang, C., Sun, P. and Shao, X. (2016). Tributyltin affects shoaling and anxiety behavior in female rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquat. Toxicol.* 178, 80–87.
- Ziegler, C. and Domschke, K. (2018). Epigenetic signature of MAOA and MAOB genes in mental disorders. *J. Neural Transm.* 125, 1581–1588.

Articles de revues publiés

La génétique évolutive du tétra mexicain

Astyanax mexicanus

■ **AUTEUR(S)** : J. LECLERCQ, C. PIERRE, V. SIMON, M. BLIN⁽¹⁾

■ **ORGANISME(S)** : ⁽¹⁾Équipe DECA, dirigée par Sylvie Rétaux, Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France - Email : Maryline.blin@inaf.cnrs-gif.fr - Téléphone : 01 69 82 41 29

RÉSUMÉ

Les poissons aveugles et dépigmentés appartenant à l'espèce *Astyanax mexicanus* sont un modèle exceptionnel pour étudier l'évolution d'un organisme en situation d'adaptation à un changement drastique d'environnement. En effet, dans l'obscurité des grottes, ce poisson cavernicole a subi un certain nombre de modifications morphologiques, physiologiques et comportementales. Cependant, ce morphotype peut toujours se reproduire avec son congénère qui vit dans les rivières de surface. Au laboratoire, les hybrides résultant de tels croisements permettent des approches génétiques pour identifier les mutations sous-jacentes à leur l'évolution troglomorphique. Après une présentation du modèle, nous exposons trois projets scientifiques en cours, actuellement, dans notre laboratoire. Nous expliquons les différentes possibilités de croisements entre morphotypes qui permettront de découvrir des mutations potentiellement impliquées dans des modifications du développement et du comportement de l'*A. mexicanus* cavernicole.

Mots-clés : poisson cavernicole, génétique, évolution, développement, comportement

Key words : Cavefish, genetic, evolution, development, behavior

INTRODUCTION

Pourquoi étudier des poissons ?

Les téléostéens (soit la quasi-totalité des poissons osseux) représentent à peu près la moitié des espèces de vertébrés.

Au cours de leur évolution, ils se sont diversifiés en différentes lignées qui présentent une très grande variété de génomes, de morphologies, de physiologies, de comportements et d'adaptations à des milieux variés. En une vingtaine d'années, le poisson zèbre (*zebrafish*, *Danio rerio*) est devenu le second animal vertébré modèle de laboratoire dans le monde. En effet, ces poissons présentent des avantages qui en font de bons animaux de d'étude : (I) leur élevage est plus simple et moins coûteux que l'élevage des rongeurs (II) ils se reproduisent bien en captivité et la fécondation naturelle externe permet l'obtention aisée d'œufs au stade une cellule qui sont faciles à injecter pour créer des lignées transgéniques (III) la très grande quantité d'embryons produite par un couple (environ 150 œufs) permet des analyses du développement embryonnaire (IV) la transparence et la taille des alevins permet l'imagerie *in vivo*. Pourtant, le *Danio* n'est pas le seul poisson étudié par les chercheurs. Pour preuve, on dispose actuellement du génome de pas moins de 60 espèces de téléostéens. Certaines espèces présentent des adaptations à des environnements extrêmes (grand froid, sécheresse, pression, acidité ou obscurité) qui rendent ces animaux intéressants pour les études d'évolution, de génétique et de comportement. Dans l'équipe Développement et Évolution du Cerveau Antérieur (DECA) dirigée par **Sylvie RÉTAUX**, c'est *Astyanax mexicanus* qui est étudié depuis plus de quinze ans. Ce poisson possède les mêmes caractéristiques que le *Danio*, ce qui permet de l'élever en laboratoire. De plus, il a la particularité et l'avantage d'exister sous deux formes ou morphotypes (morphotype de surface et morphotype cavernicole, **Figure 1.A, 1.B**), ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes du développement et de l'évolution du cerveau et des systèmes sensoriels dans un contexte de modification drastique de l'environnement.

Abréviations :

SF : morphotype de surface (surface fish) ; CF : morphotype cavernicole (cavefish)



Figure 1 : Élevage

A. Photo d'un groupe de SF adultes. Noter la nage en banc ; B. Photo d'un groupe de CF adultes. Noter la nage isolée ; C. Photo d'un rack de quatre bacs superposés, contenant des groupes de poissons SF reproducteurs.

Description générale de notre animal modèle

En 1936, lors d'une excursion dans une grotte mexicaine (*la Cueva Chica*) de la *Sierra de El Abra* (état de San Luis Potosi au Mexique), le spéléologue **Salvador CORONADO** découvre des poissons blancs vivant au fond de la grotte. Cette « espèce » est nommée *Anoptichthys jordani* (*anoptichthys* signifiant « sans yeux »). En 1946, c'est la population cavernicole *Anoptichthys antrobius* qui est découverte dans la *Cueva El Pachón*, à une centaine de kilomètres de là au nord. Puis c'est *Anoptichthys hubbsi* qui est découverte dans la *Cueva de Los Sabinos* en 1947... Tous ces poissons cavernicoles sont dépigmentés et n'ont pas d'yeux. D'autre part, un poisson de rivière assez proche morphologiquement est connu depuis longtemps, c'est *Astyanax fasciatus*. Les scientifiques pensaient être en présence d'espèces différentes jusqu'à ce que des recherches en génétique soient effectuées à partir de 1957. En laboratoire, le croisement des deux morphotypes donne des hybrides possédant des yeux de petite taille. De plus, la descendance de ce croisement s'avère féconde. Selon la définition biologique de l'espèce, puisque la descendance du croisement des deux populations est viable et féconde alors les deux espèces n'en font qu'une. Les scientifiques s'accordent sur le fait que les poissons cavernicoles du genre *Anoptichthys* et les *Astyanax fasciatus* sont de la même espèce et renomment les deux morphotypes *Astyanax mexicanus*.

Actuellement, on recense plus de 250 espèces de poissons cavernicoles à travers le monde (site web « *Subterranean Fishes of the World*: <https://cavefishes.org.uk/>; Graham PROUDLOVE). Toutes ont évolué indépendamment à partir d'un ancêtre de surface qui à l'occasion d'un débordement de rivière (dans le temps ou saisonnier) ou d'un évènement géologique s'est

retrouvé isolé dans une rivière souterraine. À chaque fois, la réponse évolutive converge vers une perte des yeux, une diminution de la pigmentation et une amélioration sensorielle (olfactive, gustative, mécano-sensorielle). Ainsi, chaque espèce cavernicole est une réplique naturelle de la même expérience évolutive qui teste la réponse à l'absence de lumière. Parmi toutes ces espèces de poissons, *A. mexicanus* est la seule pour laquelle le morphotype de surface est connu, ce qui fait son caractère exceptionnel. Les poissons de surface (SF) vivent en rivière et les poissons cavernicoles (CF) aveugles vivent dans l'obscurité de grottes mexicaines de la *Sierra de El Abra*. Trente populations cavernicoles différentes vivant dans trente grottes différentes sont connues à ce jour. Le morphotype SF et plusieurs populations cavernicoles sont élevées dans les animaleries de différents laboratoires publics (aux USA, au Mexique et en Europe). L'étude du comportement, en laboratoire, montre que comparés aux SF, les CF sont en permanente recherche de nourriture, ne nagent pas en banc, dorment très peu, ne sont pas agressifs, possèdent de meilleurs capacités olfactives, sont attirés par les vibrations à la surface de l'eau. En animalerie les différentes populations cavernicoles peuvent être croisées entre elles ou avec la population de surface. C'est ainsi, il y a une dizaine d'années, que des chercheurs ont tiré parti de ces possibilités de croisements entre les populations de CF pour montrer que ce ne sont pas exactement les mêmes gènes qui sont impliqués dans la perte de l'œil des différentes populations pourtant toutes phénotypiquement identiques (tests de complémentation génétique partielle) (Borowsky, 2008). En revanche, ces mêmes croisements et tests de complémentations montrent que c'est le même gène qui cause l'albinisme chez plusieurs populations cavernicoles : il s'agit d'*Oca2*, aussi responsable du phénotype albino chez d'autres vertébrés, y compris l'homme. *A. mexicanus* est donc un excellent système pour étudier les bases génétiques de traits morphologiques, physiologiques ou comportementaux (ce que ne permet pas le *Danio*). Enfin, il faut dire que les études de génétique sont maintenant grandement facilitées par le développement des techniques de séquençage haut débit et par la publication du génome et du transcriptome de notre espèce modèle.

Pour illustrer ce propos, nous allons présenter quelques études menées actuellement dans notre équipe. Dans ces trois « études de cas », nous souhaitons comprendre comment les variations génétiques entre les deux morphes peuvent se traduire par des changements phénotypiques majeurs : (I) Pendant l'embryogenèse, les CF développent d'abord de petits yeux malformés qui dégénèrent rapidement.

Nous cherchons l'origine développementale de ce défaut morphologique. (II) Les CF portent une mutation ponctuelle dans la séquence codante de la mono-amine oxydase (MAO, enzyme de dégradation de la sérotonine) qui augmente leurs niveaux cérébraux de sérotonine d'une manière qui serait considérée comme pathologique chez l'homme (Elipot *et al*, 2014a). Nous cherchons les conséquences neurochimiques et comportementales exactes de cette mutation. (III) Les CF ont gagné une spécialisation olfactive extraordinaire (Blin *et Rétaux*, 2019). Nous recherchons le déterminisme génétique de ce gain sensoriel. Ainsi, en combinant la puissance de la génétique et de la biologie comparée (SF vs CF), nous espérons découvrir de nouveaux gènes ou mutations impliqués dans des variations phénotypiques assez remarquables.

MATÉRIEL ET MÉTHODE : ÉLEVAGE ET CROISEMENTS

Élevage

L'espèce est classée comme *Ostéichthyen* car le squelette est osseux. Son appartenance à la classe des *Actinoptérygiens* est justifiée quant à elle par l'anatomie de ses nageoires qui sont constituées de rayons. De plus, il appartient à l'infra-classe des *Téléostéens* (comme la plupart des poissons actuels) et à l'ordre des *Characiformes*. Le morphotype de surface (Figure 1.A) est un poisson d'eau douce subtropical dont la distribution géographique est assez large, du sud des États-Unis au nord de l'Amérique du Sud. Il présente un comportement grégaire, et c'est un petit migrateur saisonnier. Ces animaux sont des omnivores opportunistes benthopélagiques d'environ 7-8 cm de long qui se nourrissent d'insectes, de crustacés, de vers et de débris végétaux. Tout comme leurs congénères de surface, les morphotypes cavernicoles (Figure 1.B) sont des poissons d'eau douce subtropicaux à mode de vie benthopélagique. Leur alimentation semble basée sur le substrat sédimentaire recouvrant le fond des grottes, la matière organique apportée par les fientes de chauve-souris ou par les eaux des rivières lors de la saison des pluies, et les arthropodes cavernicoles cohabitant avec eux dans les mares souterraines. Leur taille est équivalente à celle des SF. Notre élevage abrite les deux morphotypes de l'espèce. Les fondateurs de notre colonie sont arrivés en 2004 du laboratoire du professeur William R. JEFFERY (Université de Maryland, College Park, MD, États-Unis). Les SF sont originaires de San Solomon Spring, Blamorhea State Park au Texas et les CF de la grotte Pachón. Pour optimiser l'espace, l'élevage est organisé en armoires ou racks fabriqués par la société Müller & Pflieger. Chaque armoire porte 5 bacs (dont le bac de filtration) de 151L (L : 120cm ; l : 43.5cm ; h :

29cm) les uns sur les autres, chacun équipé d'un néon 35 W (Fig.1C). Un banc d'une vingtaine de poissons adultes (SF ou CF) est maintenu dans chaque bac. La température de l'eau est de 26 °C pour les SF et de 21°C pour les CF. Pour subvenir aux besoins énergétiques quotidiens des poissons, ils sont nourris avec des granulés de la marque TetraMin. L'aliment est distribué à raison d'environ 2 granulés par poisson matin (9h) et soir (17h). La photopériode est de 12/12 (8h-20h). L'espèce se reproduisant pendant la nuit, le stade des œufs récoltés le matin peut ne pas convenir pour certaines expériences (pour l'étude du développement précoce notamment). Nous maintenons donc aussi 4 bancs de SF et 4 bancs de CF en cycle jour-nuit inversé (16h-4h). Ainsi, il est possible en fonction des besoins d'obtenir des œufs en journée ou de nuit. Les techniques d'induction des pontes ont été déterminées empiriquement car les connaissances sur les conditions de reproduction en milieu naturel sont inconnues (Simon *et al*, 2019).

Induction pour reproduction naturelle d'un banc

Les animaux sont sollicités pour la reproduction une semaine sur deux. Chaque groupe est maintenu avec un sexe *ratio* de 1 femelle pour 2 mâles. Afin d'induire la ponte, le paramètre modifié est la température. Pour les poissons cavernicoles, on augmente progressivement la température de 21°C à 26°C. En revanche, pour les poissons de surface, on abaisse progressivement la température de 26°C à 21°C. Une boîte de récolte des œufs est placée sur le fond du bac et les œufs sont récoltés le matin suivant l'induction.

Induction pour reproduction naturelle d'un couple SF X CF : génération d'hybrides F1

Une femelle SF et un mâle CF issus chacun d'un banc de reproducteurs induit régulièrement sont transférés en fin de journée d'un aquarium à T° 21°C vers un aquarium (58*24*65 cm ; 20 litres) à T° 26°C (c'est la température d'induction de la femelle qui est appliquée). Une boîte de récolte des œufs est placée sur le fond du bac et les œufs hybrides F1 (de première génération) sont récoltés le matin suivant l'induction.

Induction pour reproduction naturelle hybride F1 X SF : backcross

Deux groupes avec le sexe *ratio* indiqué plus haut sont constitués : le premier est composé de femelles SF et de mâles hybrides, le second groupe est composé inversement. L'induction des pontes est réalisée dans les mêmes conditions que pour l'induction d'un banc. Le matin suivant le transfert, les œufs sont récoltés.

Induction pour reproduction naturelle d'un groupe d'hybrides de F1 : obtention d'hybrides F2

Un groupe d'hybrides F1 est constitué avec un sexe *ratio* de 2 femelles pour 8 mâles. Le groupe est maintenu dans son aquarium à une température de 21° pendant deux semaines. Pour induire une ponte, la température est montée à 26°C. Le changement de température inverse fonctionne aussi, mais la quantité d'œufs produite est plus faible. Une boîte de récolte des œufs est placée sur le fond du bac. Le matin suivant l'induction les œufs hybrides F2 sont récoltés.

Fécondation *in vitro*

Pour obtenir des œufs à des stades précis de développement précoce (moins de 20h post-fécondation), des fécondations *in vitro* (FIV) sont réalisées. Les poissons sont induits comme indiqué ci-dessus. Quand le comportement reproductif est observé (Simon *et al*, 2019) grâce à des caméras infrarouges installées dans notre pièce en photopériode inversée, les poissons sont pêchés. Si les femelles sont prêtes à pondre, les œufs sont expulsés immédiatement après une légère pression sur l'abdomen. Les œufs sont collectés dans une boîte de Pétri. Le sperme est collecté dans le couvercle de la boîte par massage répété de l'abdomen et de la nageoire anale des mâles. Le sperme est activé avec de l'eau et immédiatement mis en contact avec les œufs. La qualité des œufs est contrôlée à la loupe binoculaire. Comme seules les femelles nécessitent d'être induites, il est possible de réaliser des FIV entre des mâles et des femelles des différents morphotypes pour générer des hybrides.

Alevinage

Les œufs sont regroupés par environ 50 dans des boîtes de Pétri en verre (Ø 90 mm) contenant 30mL de milieu pour embryons (NaCl (1g.L⁻¹), KCl (30mg.L⁻¹), CaCl₂ (40mg.L⁻¹), MgSO₄ (160mg.L⁻¹)) et sont maintenus dans une étuve à la température de 24°C. A 24h post-fécondation, les embryons éclosent et deviennent des larves nageuses. Elles sont placées dans des nurseries de 1.5L avec un renouvellement d'eau continu. Les larves mortes sont retirées pour maintenir une qualité d'eau optimale. Les larves vivent sur leur réserve vitelline pendant 5 jours post-fécondation, stade auquel la bouche et le tube digestif sont intégralement formés. Les alevins sont alors nourris pendant 2 semaines avec des « micro-vers » (*Caenorhabditis elegans*) puis avec de la poudre de granulés et, à partir de 2 mois avec des granulés entiers. Ce mode d'alevinage est valable pour les larves SF, CF, F1, F2 et Fn.

PROJETS SCIENTIFIQUES

Des croisements réciproques pour l'étude de la régulation maternelle du développement

Chez les vertébrés, la mise en place du système nerveux central (y compris les yeux) a lieu très tôt dans le développement, lors de la gastrulation puis de la neurulation. Ces étapes font appel à l'expression précise et régulée de nombreux gènes. L'expression de certains gènes impliqués dans ces étapes est légèrement modifiée au niveau spatial et/ou temporel entre les deux morphotypes d'*A. mexicanus*, et ceci peut rendre compte des variations phénotypiques observées chez la larve (Pottin *et al*, 2011; Torres-Paz *et al*, 2019).

Chez les poissons, le développement est externe et dépend initialement des composants de l'œuf produits par la femelle lors de l'ovogénèse. Parmi les constituants de l'œuf, se trouvent des ARN et des protéines dont le rôle est d'assurer les premières étapes de développement, avant l'activation du génome zygotique : ce sont les déterminants maternels. Des modifications dans la répartition ou la quantité de ces déterminants ont des répercussions sur le développement de l'embryon. En particulier, des modifications d'expression de gènes observées lors de la gastrulation peuvent être causées par des changements au niveau des déterminants maternels.

Pour étudier la possibilité d'un « effet maternel » lors du développement du système nerveux chez les deux morphes d'*A. mexicanus*, on utilise la capacité du modèle à générer des hybrides. En réalisant des croisements réciproques entre les deux morphotypes (Figure 2), on obtient des hybrides dont la mère est soit un poisson de surface (hybride de surface) soit un poisson cavernicole (hybride cavernicole). En comparant l'expression des gènes d'intérêts entre les hybrides et les morphotypes maternels, on peut déterminer si l'expression du gène étudié est sous le contrôle d'un facteur maternel. C'est le cas si son expression chez les hybrides de surface est la même que chez les poissons de surface, et réciproquement pour les hybrides cavernicoles. De cette manière, nous avons pu identifier des modifications spatio-temporelles d'origine maternelle dans l'expression de certains gènes lors de la gastrulation chez le morphe cavernicole, et qui se traduisent par des modifications morphologiques persistantes au niveau de l'œil chez les larves (Torres-Paz *et al*, 2019 et travaux de thèse de Julien LECLERCQ, en cours). Il s'agit de la première démonstration d'un rôle de déterminants maternels sur l'évolution morphologique.

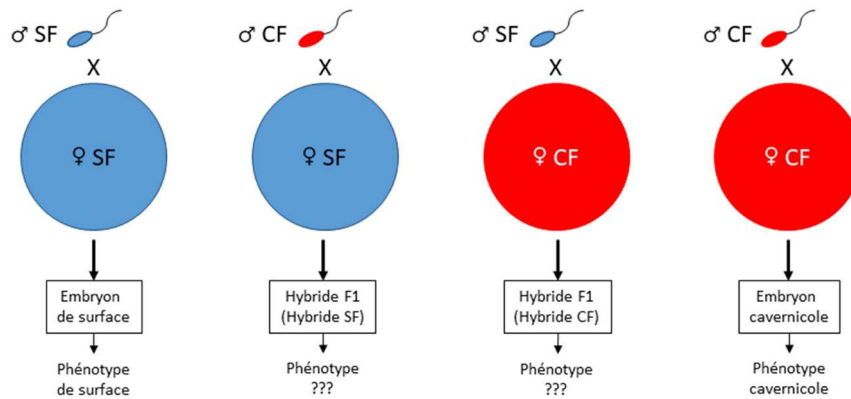


Figure 2 : Des hybrides F1 pour étudier « l'effet maternel »

Représentation schématique des croisements réalisés pour obtenir les deux types d'hybrides. On parle d'effet maternel si le phénotype observé chez chaque type d'hybrides F1 est le même que celui du morphotype de la mère.

Des croisements *backcross* pour générer des lignées de mutants

Le comportement du poisson cavernicole est très différent de celui du poisson de surface. Par exemple, il ne nage pas en banc, il n'est pas agressif et dort très peu. Une mutation dans le gène de la *Monoamine Oxydase* (MAO) a été trouvée chez le poisson CF (Elipot et al, 2014a). La MAO est une enzyme présente dans le cerveau, et qui dégrade des molécules de communication entre les neurones (tel que le neurotransmetteur sérotonine). La mutation trouvée chez le CF impacte donc son cerveau et pourrait peut-être être à l'origine de ses comportements si particuliers. En modifiant les équilibres de neurotransmetteurs dans le cerveau, la mutation pourrait par exemple empêcher les poissons de dormir, ou affecter leurs comportements sociaux (formation de banc). Afin de tester cette hypothèse, il est nécessaire de retirer la mutation du génome cavernicole, et à l'inverse, de la transférer dans le génome du SF, et d'observer d'éventuelles modifications du comportement des poissons. Pour ce faire, nous avons choisi de réaliser des « *backcross* », une technique souvent utilisée pour générer des lignées de drosophile. Chez le poisson, le temps de génération est plus long, et générer des lignées peut prendre plusieurs années. Mais l'approche est aussi très peu coûteuse en argent et en temps de manipulation, contrairement à des techniques d'édition de génome. Deux lignées de poissons sont donc à générer : le poisson cavernicole sans la mutation, et le poisson de surface avec la mutation. Prenons l'exemple de ce dernier. L'interfécondité des deux morphotypes nous permet d'utiliser la technique des *backcross* en série (Figure 3.A). Un poisson cavernicole est croisé avec un poisson de surface, ce qui génère des hybrides F1 (Figure 3.B), qui sont ensuite re-croisés avec

des poissons de surface. A chaque génération, les individus porteurs de la mutation sont sélectionnés (par génotypage) et croisés avec des poissons de surface, ce qui dilue le génome cavernicole de génération en génération, mais sans perdre la mutation. Au bout de plusieurs croisements de type *backcross*, on a généré des poissons SF qui ont un lointain aïeul cavernicole (Figure 3.C). Leur génome est en majeure partie un génome de poisson SF qui est cependant porteur de la mutation dans la MAO trouvée chez les CF. L'étude comparée des comportements, corrélée à la neuro-anatomie de ces poissons « hybrides de nième génération », permettra de déterminer comment la mutation MAO impacte le fonctionnement du cerveau sans être pathologique pour autant (Travaux de thèse de Constance PIERRE, en cours).

Des panels d'hybrides F2 pour étudier la génétique des capacités olfactives

Dans des études précédentes notre équipe a montré que les CF possèdent un système olfactif particulièrement efficace pour détecter des odeurs alimentaires (Blin et Rétaux, 2019). Lors de tests de comportement les CF répondent aux acides aminés (produits de dégradation des aliments) à la concentration de $[10^{-10}M]$ alors que les SF ont un seuil de détection de $[10^{-5}M]$. Or, les bases génétiques des variations de sensibilité olfactives entre espèces ou entre individus ne sont quasi pas connues. Un premier pas vers la compréhension des bases génétiques d'un trait est l'identification d'une région génomique qui porte des gènes ou des éléments régulateurs qui ont un impact sur le phénotype d'intérêt. Cette étape est cruciale pour réduire le nombre et la taille de régions génomiques à étudier plus précisément.

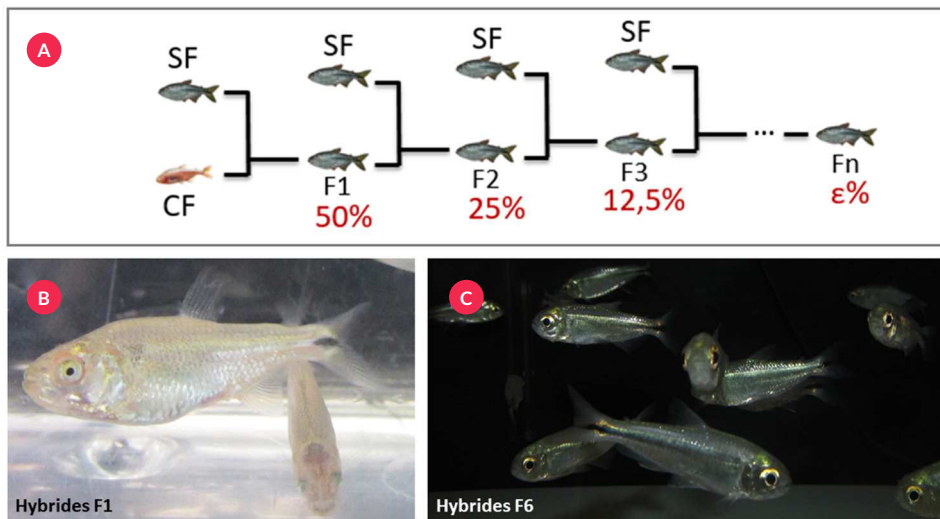


Figure 3 : Des croisements backcross pour générer des lignées de mutants

A. Schéma explicatif du croisement backcross ; B. Photo de deux hybrides F1. Noter la pigmentation (la mutation dans le gène *Oca2* des CF est récessive) et la petite taille de l'œil. Cependant, ces poissons hybrides F1 sont parfaitement voyants ; C. Photo d'un banc d'hybrides F6. Il reste théoriquement 3.2% de génome cavernicole dans leur génome (dont la mutation MAO sélectionnée à chaque génération). Ils sont phénotypiquement parfaitement semblables aux poissons SF.

Une des méthodes couramment utilisée est l'analyse des *loci* d'un trait quantitatif (*Quantitative Trait Locus*; QTL). Récemment ce sont des études QTL qui ont permis chez *A. mexicanus* d'identifier trois régions génomiques impliquées dans la régénération du cœur, ou bien 15 intervalles QTL impliqués dans la perte de l'oeil (Figure 4.A). Nous utilisons donc cette stratégie pour identifier les *loci* impliqués dans les meilleures capacités olfactives des CF. Il s'agit par conséquent de croiser un couple (SF x CF) afin de générer une famille d'hybrides F1, puis de croiser ces hybrides F1 entre eux pour générer des hybrides F2 (Figure 4.A et 4.B). Environ 400 individus F2 seront soumis à des tests olfactifs afin de déterminer leur seuil de détection individuel. Certains F2 auront le seuil de détection des SF, certains auront le seuil de détection des CF et d'autres auront sûrement un seuil de détection intermédiaire. La vitesse de réponse et le temps passé près de la source d'odeur seront mesurés afin d'attribuer à chaque individu un score quantitatif global de réponse olfactive. Les génotypes individuels seront ensuite séquencés et comparés au génotype des grands-parents F0. C'est la corrélation génotype-phénotype olfactif sur un échantillon large de plusieurs centaines d'individus qui permettra de déterminer les *loci*, gènes, et mutations impliqués dans la meilleure olfaction des CF. En fonction des modifications génétiques découvertes nous utiliserons différentes techniques d'édition du génome afin de valider les effets de ces variations génétiques sur les capacités olfactives.

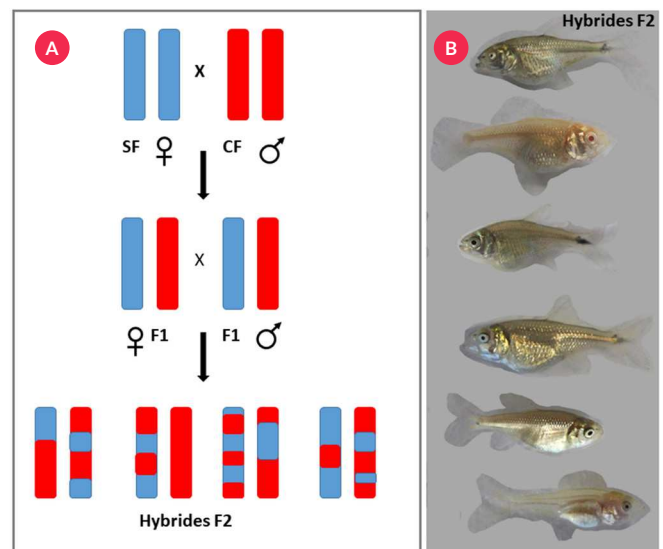


Figure 4 : Des hybrides F2 pour étudier la génétique des capacités olfactives

A. Représentation schématique de la ségrégation génétique obtenue après recombinaison chez les hybrides F2 après croisements successifs ; B. Photo d'une fratrie d'alevins F2 âgés de 2 mois. La ségrégation génétique permet, par exemple, d'observer une grande variabilité, au sein d'une même fratrie, dans la taille des yeux ou le degré de pigmentation.

CONCLUSION

A. mexicanus a longtemps été considéré comme une espèce non modèle. Le peu d'outils disponibles rendait, en effet, les études sur cette espèce, assez fastidieuses. Au fil des années cependant, de nombreux outils ont été mis en place : table de développement (Hinaux et al, 2011) et séquençage du transcriptome développemental ; chez l'adulte, séquençage du génome du poisson cavernicole Pachón (McGaugh et al 2014) et transgénèse (Elipot et al, 2014b). Un livre qui reprend l'ensemble des connaissances accumulées par les chercheurs sur *A. mexicanus* est maintenant disponible (Keene, 2016). Y sont répertoriées et référencées toutes les découvertes qui sont citées dans l'introduction de cet article. Toutes ces avancées scientifiques, technologiques et bibliographiques rendent l'espèce plus attractive pour de nouvelles équipes et participent à son développement global en tant que modèle. Ainsi, en tant que vertébré cavernicole, *A. mexicanus* devient le modèle de microévolution le plus établi pour étudier les mécanismes et les forces évolutives qui sous-tendent son évolution phénotypique spectaculaire en réponse à des changements d'environnement.

REMERCIEMENTS

Il est toujours difficile d'expérimenter en utilisant un animal qui ne soit pas un animal modèle « conventionnel ». La mise en œuvre des projets présentés ici ne serait pas possible sans le travail des zootechniciens de l'animalerie de notre Institut. Nous remercions chaleureusement **Krystal SAROUL, Louise VERNIER, Stéphane PÈRE, Valérie LAVALLÉE** et son équipe. Nous remercions **Sylvie RÉTAUX**, notre chef d'équipe, sans qui rien ne serait possible. Nous remercions **Alessandro ALUNNI** pour la relecture et **Sylvie RÉTAUX** pour les commentaires avisés lors de la préparation de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blin M et Rétaux S (2019). Voir ou sentir, l'histoire d'*Astyanax mexicanus*. *m/s* n° 3, vol. 35,216-219.
- Borowsky R (2008). Restoring sight in blind cavefish. *Current Biology* 1, R23-R24.
- Elipot Y, Hinaux H, Callebert J, Launay JM, Blin M, Rétaux S (2014a). A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax cavefish* behavioural syndrome. *Nat Commun.* 10;5:3647.
- Elipot Y, Legendre L, Père S, Sohm F, Rétaux S (2014b). *Astyanax* transgenesis and husbandry: how cavefish enters the laboratory. *Zebrafish* 11(4):291-9.
- Hinaux H, Pottin K, Chalhoub H, Père S, Elipot Y, Legendre L, Rétaux S (2011). A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. *Zebrafish.* 8(4):155-65.

Keene A.C, Yoshizawa M, McGaugh S. E. (2016). *Biology and evolution of the Mexican cavefish*. Academic Press, San Diego. Editors Elsevier.

McGaugh S, Gross J, Aken B, Blin M, Borowsky R, Chalopin D, Hinaux H, Jeffery W, Keene A, Ma L, Minx P, Murphy D, O'Quin K, Rétaux S, Rohner N, Searle S, Stahl B, Tabin C, Volff J, Yoshizawa M, Warren W (2014). The cavefish genome reveals candidate genes for eye loss. *NatCommun.*20;5:5307.

Pottin K, Hinaux H, Rétaux S (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 138(12):2467-76.

Simon V, Hyacinthe C, Rétaux S (2019). Breeding behavior in the blind Mexican cavefish and its river-dwelling conspecific. *PLoS One.* 20;14(2).

Torres-Paz J, Leclercq J, Rétaux S (2019). Maternally regulated gastrulation as a source of variation contributing to cavefish forebrain evolution. *eLife* 2019;8:e50160 doi: 10.7554/eLife.50160.

Elipot Y, Hinaux H, Callebert J, Launay JM, Blin M, Rétaux S (2014a). A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax cavefish* behavioural syndrome. *Nat Commun.* 10;5:3647.

Hartelust B.V.
Phone: +31 13 4555189
Email: info@hartelust.net



We proudly present our company as an important provider of non human primates for research only.

Our animals are selected, monitored and shipped out right from the source, prior to our quarantine facilities in the Netherlands. From there they can be shipped to any destination worldwide.

We have all permits to meet the regulations in the EU regarding quarantine and transport.

Please feel free to contact us for your requirements and we will make a suitable offer to meet your protocol and individual wishes.



Cite this article: Torres-Paz J, Hyacinthe C, Pierre C, Rétaux S. 2018 Towards an integrated approach to understand Mexican cavefish evolution. *Biol. Lett.* **14**: 20180101. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2018.0101>

Received: 10 April 2018

Accepted: 16 July 2018

Subject Areas:
evolution

Keywords:

Astyanax mexicanus, evolutionary biology, multi-disciplinary

Author for correspondence:

Sylvie Rétaux

e-mail: retaux@inaf.cnrs-gif.fr

[†]These authors contributed equally to this study.

Towards an integrated approach to understand Mexican cavefish evolution

Jorge Torres-Paz[†], Carole Hyacinthe[†], Constance Pierre and Sylvie Rétaux

Paris-Saclay Institute of Neuroscience, CNRS UMR9197, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

SR, 0000-0003-0981-1478

The Mexican tetra, *Astyanax mexicanus*, comes in two forms: a classical river-dwelling fish and a blind and depigmented cave-dwelling fish. The two morphotypes are used as models for evolutionary biology, to decipher mechanisms of morphological and behavioural evolution in response to environmental change. Over the past 40 years, insights have been obtained from genetics, developmental biology, physiology and metabolism, neuroscience, genomics, population biology and ecology. Here, we promote the idea that *A. mexicanus*, as a model, has reached a stage where an integrated approach or a multi-disciplinary method of analysis, whereby a phenomenon is examined from several angles, is a powerful tool that can be applied to understand general evolutionary processes. Mexican cavefish have undergone considerable selective pressure and extreme morphological evolution, an obvious advantage to contribute to our understanding of evolution through comparative analyses and to pinpoint the specific traits that may have helped their ancestors to colonize caves.

1. Introduction

Mexican tetras in rivers of Central America and in caves of central Mexico are the same species: *Astyanax mexicanus*. The former are ‘wild-type’ multi-coloured tropical freshwater fish. The latter are ‘natural mutants’ that live in total and permanent darkness, and they lack eyes and pigmentation (figure 1). They can be found in 30 karst caves in a restricted region of Mexico [2]. The two types of morphs can breed and give a fertile progeny, and cavefish from different caves are also inter-fertile [3]. Hence, after a drastic and sudden environmental change, their phenotypic evolution occurred rapidly within about 20 000 years [4] and is probably still ongoing. Of note, based on morphological distinctions, surface and cave morphs were originally proposed as different species and even genus, and the eyeless fish was given the name *Anoptichthys jordani* [5]. Speciation between the two morphs may be on its way [6], but has not happened yet, based on inter-fertility criteria.

The *A. mexicanus* system presents many advantageous features and appears an outstanding model system to study evolutionary forces (distal mechanisms) and evolutionary mechanisms (proximal mechanisms) underlying morphological, behavioural and physiological adaptations in response to environmental change. When compared with other fish such as sticklebacks, cichlids or whitefish that have also undergone recent radiations and have significantly contributed to evolutionary biology [7–9], *A. mexicanus* cavefish underwent considerable selective pressure and extreme morphological evolution. Obvious advantages of tetras are the insights that can be gained into understanding how circadian rhythms influence physiology and how other senses can compensate for loss of sight. The behavioural and genetic bases of their apparently easy colonization of caves—when compared with other endemic fish species living in Mexican rivers—sometimes called ‘pre-adaptations’, can be studied. Moreover, the cavefish model, like other fish evolutionary models, fulfils the prerequisites to any

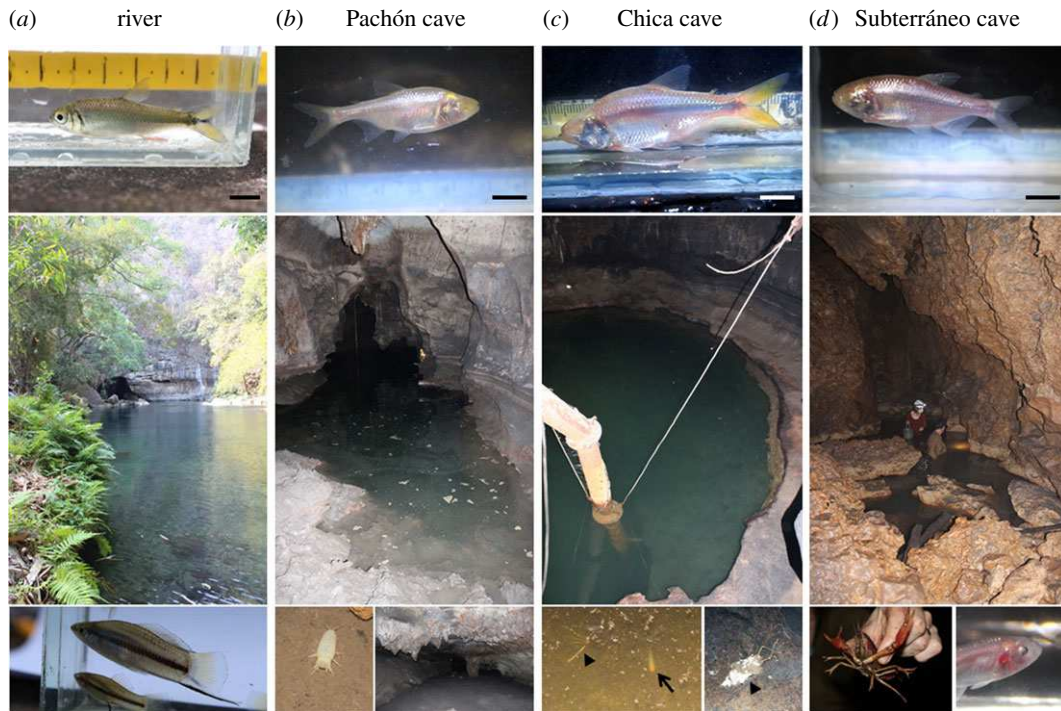


Figure 1. *Astyanax mexicanus* cavefish and surface fish. The morphology of the fish and the environment where they live are illustrated in a river and three different caves. Important differences, including between caves, are described below. Scale bars, 1 cm. (a) Surface fish. A specimen caught in the Nacimiento del Rio Choy. This environment is characterized by ambient light and its associated primary production. There, fish live in large schools, together with many other fish species (example shown: poeciliids). (b) Pachón cavefish. The Pachón cave is isolated, and the water enters exclusively by percolation during the rainy season. The bottom of the pool is mud, on which the adult fish feed [1]. They cohabit with many troglomorphic arthropods, including large ones like the *Speocirolana pelaezi* (3 cm) shown at the bottom left, on which they can also feed. (c) Chica cavefish. The Chica cave regularly receives external water flows and hosts a large bat colony. Fish (arrow) swim in waters with high organic contents, including decomposing bat cadavers (bottom pictures, arrowheads) and detritus brought from the surface by incoming water. (d) Subterráneo cavefish. The Subterráneo cave offers a rocky substrate. Seasonal floods bring surface fish into the cave, and hybridization sometimes occurs. The bottom right picture shows an eyed, F₂-type hybrid individual, cohabiting with blind cavefish in this cave. Here, predators are found, such as the non-troglomorphic crayfish shown at bottom left.

research: it has entered the genome era [10,11], can be bred and manipulated relatively easily [12,13] and its population biology has been studied for decades [2,14].

Several reviews, including a book on the biology of Mexican cavefish by contributors from the whole *Astyanax* scientific community, have been published recently [15–17], dealing with all the many facets of cavefish evolutionary biology. Instead of specifically reviewing one aspect, here we will focus on combining approaches to better understand cavefish evolution and to illuminate evolutionary mechanisms in general.

2. Towards an integrated approach

Researchers of Mexican cavefish have various disciplinary backgrounds: genetics, developmental biology, neuroscience, physiology, metabolism, genomics, population biology, ecology, cave biology or speleology. An integrated approach is by essence a multi-disciplinary method of analysis, whereby a phenomenon is examined from several angles (figure 2). In sticklebacks, for example, the combination of population biology, quantitative genetics and developmental biology has revealed strikingly convergent processes occurring in the non-coding regulatory sequences of a developmental transcription factor (*Pitx1*) and underlying the morphological evolution (loss of pelvic spine) of multiple freshwater populations from marine ancestors [18–21]. Here, we provide examples of questions that strongly benefit from an integrated approach in the cavefish system.

(a) Developmental biology and genetics: eye development and loss

A typical question at the frontiers of these two disciplines is that of eye development and loss, i.e. the mechanisms of morphological evolution. The problem was first examined through crosses between surface and cavefish or between cavefish originating from different caves [15]. F₁ hybrids from cave × surface parents have slightly reduced but functional eyes, indicating that cave alleles are mostly recessive. Sometimes, F₁ hybrids generated from parents originating from different caves develop small eyes, and such partial complementation suggests that different genes are affected in different caves, highlighting convergent evolution [22,23]. Quantitative trait loci (QTL) analyses show that the control of eye size in F₂ families is a complex trait, involving 12–15 loci [24]. As cave alleles at every eye or lens QTL cause size reductions, the authors suggested that eye loss evolved by natural selection, rather than by drift. A recent study examining cavefish retinal degeneration in the context of QTL mapping identified four regions, each involved in the control of the thickness of one distinct retinal layer, and in which several candidate genes, mostly corresponding to developmental transcription factors and regulators, were identified [25].

From the developmental biology standpoint, cavefish eye degeneration is triggered by the defective embryonic lens, which rapidly becomes apoptotic and causes the collapse of the entire eye [26]. Lens apoptosis is indirectly due to an increase in Shh (Sonic Hedgehog) signalling from the

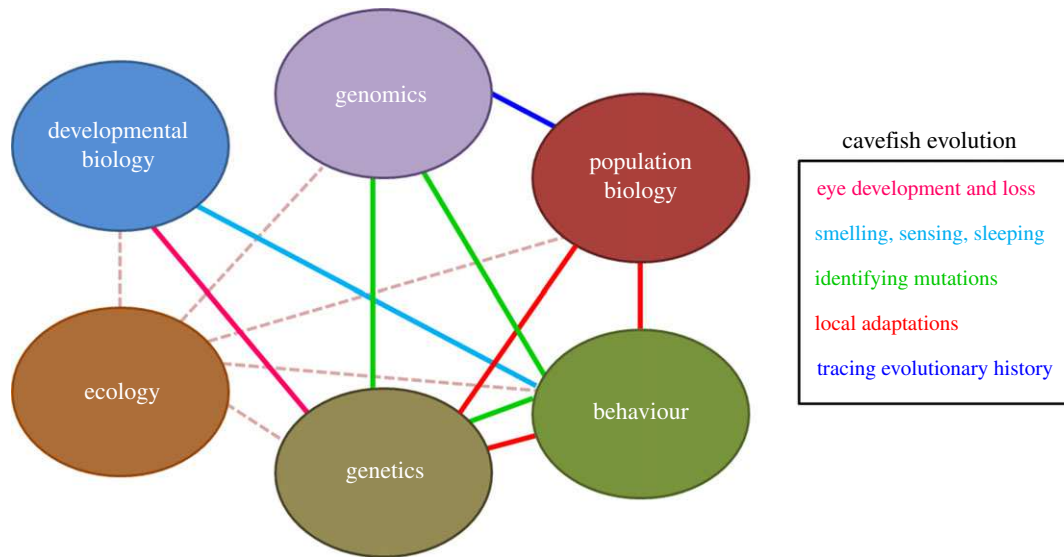


Figure 2. Towards an integrated approach. The mechanisms underlying cavefish evolution—and the evolution of any species—are better understood by combining insights from different disciplines. Connections and combinations between different disciplines are represented by coloured lines. The corresponding questions that can be addressed and are reviewed in text are indicated in the same colour.

embryonic midline [27]. Importantly, increased Shh signaling also affects pleiotropically other tissues of the future head and forebrain: jaw size and taste bud numbers are increased [28], the olfactory placode is enlarged at the expense of the lens placode [29], the preoptic region and hypothalamus in the forebrain are enlarged, partly at the expense of the ventral retina [30], and development is significantly changed [31,32]. These findings suggested that indirect selection might be at work during developmental evolution of eye loss in cavefish, i.e. that the eyes would be lost as secondary collateral damage resulting from the constructive evolution of other beneficial traits. Therefore, the evo-devo approach and the genetic approach converge in proposing selection acting as one of the distal mechanisms underlying eye loss. Of note, other evidence from studies of molecular evolution of the developmental transcriptome suggests genetic drift as a mechanism for eye loss: in cavefish, radical mutations (i.e. giving rise to amino acids with distinct physico-chemical properties in the two morphs) are over-represented in ‘eye genes’, which can be explained by relaxed selection for vision during evolution in the absence of light [10,33]. Therefore, there are probably two components underlying eye loss in cavefish: selection (direct or indirect) to improve survival in the dark and drift by random accumulation of mutations in ‘eye genes’ that are not counter-selected [34].

(b) Developmental biology and behaviour: smelling, sensing and sleeping

Embryogenesis proceeds through a hierarchical cascade of events starting before fecundation. Changes in brain shape, and consequently function, could arise from natural selection acting at different levels during embryogenesis: maternal gene products in the oocyte, expression of morphogens and patterning genes and timing of cell proliferation/differentiation. Emergence of novel behaviours through developmental variations is essential for evolutionary radiation [35,36]. Recent advances in sequencing, genome editing and transgenesis are helping to unravel the molecular mechanisms

of this evolution. Studying variations in the regulatory genome and epigenome in the near future will shed light on the mechanisms linking gene function and evolution of development.

Differential behavioural performances may stem from sensory specializations that have a developmental basis. In parallel to eye regression, cavefish evolved larger olfactory epithelia, sensory organs specialized in the detection of molecules related to feeding and reproduction. The enlargement in the embryonic tissue fated as olfactory epithelia results from subtle changes in the expression of the signaling molecules Bmp4 and Shh in the embryonic prechordal mesoderm. In parallel, behavioural assays have demonstrated the cavefish’s remarkable olfactory capabilities [29]. Increased olfactory sensitivity is probably not determined only by the size of the sensory organ and developmental plasticity and changes in central processing must also contribute to this adaptation [37].

Some cavefish populations have evolved a vibration attraction behaviour (VAB) towards oscillating objects in the water, mediated by neuromasts of the lateral line, particularly those located in the suborbital eye region [38,39]. Numeric differences in neuromasts appear at larval stages [40], but the embryological and genetic bases for such modifications remain unknown. Increased neuromast numbers in the optic region may result from eye degeneration, but this is independent of the pleiotropic Shh hypersignalling leading to eye regression [39].

Another behavioural adaptation of cavefish is sleep loss [41,42]. Sleep is a reversible state of elevated arousal threshold and quiescence. Its duration and intensity differ greatly across species, depending on ecological variables and evolutionary history [43]. It is regulated by the daily light–dark cycle (absent in caves), as well as by sensory processing and metabolic balance [44,45]. Neuromast hypersensitivity is implicated in sleep loss in cavefish [46]. The hypothalamic hypocretin/orexinergic system has a conserved role in the regulation of the sleep/wake cycle in vertebrates [47,48]. Higher *hypocretin* expression levels and numbers of neurons were reported in adult cavefish compared with surface fish, and functional

assays confirmed that increased orexinergic neurotransmission is associated with the sleep-loss phenotype [49]. Neuroanatomical variations in the hypocretin neuronal cluster exist from early embryogenesis, resulting from morphogen modulations at the end of gastrulation [31]. Developmental manipulations reducing the number of hypocretin neurons in one-week-old larvae decrease activity in these larvae, mimicking surface fish. This demonstrates that developmental evolution of the hypocretin cluster impacts cavefish behaviour. Variations in the establishment of other hypothalamic neuronal systems (neuropeptide Y (NPY), pro-opiomelanocortin) were also noted, and their contribution to behavioural changes must be explored.

(c) Behaviour, genetics and functional genomics: identifying mutations in cavefish

Cavefish display multiple behavioural traits that are different from surface fish and these appear to be advantageous for life in subterranean habitat, and have probably been selected for. This implies that they have a genetic basis.

QTL approaches indicate that the loss of sleep [41], the loss of schooling [50], the special feeding posture with a 45° angle to the substrate [51] and the VAB [39,42] have a multi-genic determinism, as F₂ fish resulting from crosses between two F₁ hybrids present diverse levels of these behaviours. Several QTL intervals were identified, allowing mapping of genomic regions associated with particular behaviours. The regions related to the control of sleep/locomotor activity and VAB are different [42]. Moreover, QTL analysis suggests candidate genes, such as the narcolepsy-associated *tp53-inducible protein* gene, a potential regulator of sleep located in the QTL interval identified as regulating locomotor activity [42].

Sometimes, the study of behavioural phenotypes themselves can suggest candidate genes. For example, Tinaja cavefish hyperphagia suggested investigating the leptin pathway, which led to the identification of mutations in the *Mc4r* (*melanocortin 4 receptor*) gene [52]. Or, the effect of deprenyl (inhibitor of serotonin degradation) on aggressiveness, together with comparative neuroanatomical analyses, implicated the serotonergic system in aggressiveness differences between the two morphs, and pinpointed a mutation in the *MAO* (*monoamine oxidase*) enzyme [32,53]. Therefore, the study of behavioural phenotypes, but also neurochemical and neuroanatomical studies, allows better targeting of candidate genes responsible for behavioural changes between the two morphs.

Once a candidate gene is identified, functional genomics should test the role of the gene in behavioural control. When cavefish and surface fish possess different alleles, crosses or genome editing by CRISPR/Cas9 can be used to insert a surface allele in cavefish and vice versa. When the gene differs in terms of expression level between cavefish and surface fish, inactivation or overexpression can be achieved. For example, the *hypocretin* gene is overexpressed in cavefish. The knock-down of its expression by morpholinos has demonstrated its involvement in sleep loss in cavefish [49].

Behavioural studies, genetics and functional genomics identify the genetic bases of behavioural changes. Then, interesting contributions can arise from population and phylogeographical studies to draw hypotheses on the evolutionary history of the trait. For example, the distribution of mutated alleles of *Mc4r* among caves and rivers suggests that the derived allele entered the cave starting from the

standing genetic variation existing in surface fish at the time of cave colonization [52] (see also §2d). Of note, genetic bases are one of several possible proximal causes for the behavioural difference between the two morphs. We also need to study the effects of the environment alone (e.g. absence of light, water physico-chemical parameters or trophic support), corresponding to the potential involvement of phenotypic plasticity or epigenetic mechanisms.

(d) Genomics and population biology: tracing back evolutionary history

The caves hosting cavefish have a broad distribution and have been grouped into three clusters: the El Abra, the Guatemala and the Micos groups. The evolutionary history and the origins of these cavefish populations are still poorly understood. While a rather ancient origin, millions of years ago, of the cavefish populations was generally quoted in the literature, recent analyses and modelling using two independent datasets (microsatellites and single nucleotide polymorphisms) suggest that cavefish invaded caves less than 25 000 years ago [4]. Such a recent origin should be verifiable and have interesting consequences in terms of population genomics approaches. The results should be comparable to those obtained in the threespine stickleback system (e.g. [54,55]). First, a recent origin and rapid evolution of cavefish implies that phenotypic evolution mainly relied on the fixation of genetic variants already existing in the ancestral surface population (as opposed to novel mutations arising, which takes more time), and many of them should still be found in the extant surface fish. Genome-wide scans should be performed at population level to estimate shared polymorphism [10], but we already have one example of such a case: the point mutation described in *Mc4r*, and responsible for increased appetite in some cavefish populations, has been found at low frequency (3%) in river-dwelling individuals [52]. Second, a recent origin also implies that gene loss/pseudogenization should not have had time to occur significantly on 'eye genes', which are not counter-selected in the dark. Genome-wide surveys on high-quality genomes are also needed to confirm this, but published data seem to support this prediction: cavefish crystallins [33] and opsins [56] do not show major loss of function mutations in their coding sequence, to be compared, for example, with two crystallins and two opsins that are inactivated/missing in the naked mole rat genome [57]. Third, if cavefish populations are young, it should be possible to find traces of selection genome-wide through selective sweep analyses. Selective sweep is the fixation of an allele through selection, and the fixation of neutral alleles at closely linked loci through genetic hitchhiking, resulting in reduced genetic diversity around the position under selection. Such analyses can be performed only if selection is recent; otherwise, novel polymorphisms arise with time and mask the swept region [58]. Again, population genomics approaches are promising, as an alternative/complement to QTL approaches, to identify loci under selection during cavefish phenotypic evolution.

(e) From population biology to behaviour and genetics: highlighting local adaptations

There are 30 described cave populations of *A. mexicanus*, named after the cave where they live [2]. All populations

are blind and depigmented, but these striking phenotypes are achieved, at least partially, through convergences. The set of genes involved in eye degeneration is not identical in different cave populations (S2a), and the mutations/deletions in *Oca2* (*ocular and cutaneous albinism 2*) responsible for the albino phenotype are not the same in the Molino (Guatemala group), Pachón or Japonés (both from the El Abra group) caves [59]. Other, less obvious phenotypes also show significant variations among caves. VAB [38] is present in Pachón and Sabinos cavefish (both from El Abra group), but does not have the same parental genetic determinism, paternal or maternal inheritance, in these two populations [60]. Additionally, some cave populations show VAB (Pachón, Sabinos, Piedras) but some do not (Molino) [39,42]. Finally, a small proportion of surface fish show a weak form of VAB, suggesting that the surface ancestors became adapted to caves by positive selection for VAB, followed by continued selection for amplification of this behaviour and its underlying sensory receptors, the neuromasts [38]. Similar phenotypic variations exist for sleep, aggressiveness or feeding behaviour among cave populations. Varying degrees of evolutionary-derived sleep reduction are described in Pachón, Tinaja, Molino, Sabinos and Chica populations [41], but this feature is dependent on sensory inputs from the lateral line only in the Pachón population [46], indicating that the phenotype may have emerged by different mechanisms. The loss of territorial and hierarchical aggressiveness—a surface fish hallmark—is described in Pachón cavefish, while Molino cavefish have conserved some degree of aggressiveness [32,61,62], and this phenotypic difference might be related to the presence or absence of an MAO mutation in the genomes of these two populations [53]. The increased appetite of Tinaja cavefish is not seen in Pachón cavefish [31,52], possibly related to the presence or absence in their genomes of mutated *Mc4r* alleles [52]. These examples highlight the complex genotype/phenotype relationships and the complex origins of *Astyanax* cavefish populations. Each cave seems to be a special case in terms of phenotype and combinations of alleles, and the possible scenario to explain allelic distributions in terms of origins, migrations and gene flows will necessitate further efforts in population biology and population genomics. Also, the impact of the specific environments found in each cave will have to be analysed, as the underestimated diversity in different caves (e.g. presence/absence of bats, predators or surface fish, trophic support, water entering by flooding or percolation, figure 1) may well contribute to the selection and fixation of different alleles, depending on local ecological conditions.

(f) Back to fieldwork and ecology of the species

Despite the fact that 30 cavefish caves are described and relatively accessible [2,63], few laboratory findings have been corroborated by experiments in the wild. Validating interpretations by assessing wild life cycle and cave ecology is important to avoid mis-/over-interpretations and to understand ecological diversity of caves, which may be related to genetic and behavioural differences (figure 1).

Subterranean habitats receive energy from external sources (bat colonies, insects, stream and percolating water charged with microfauna, particles and organic carbon) [2,64]. Food supplies vary depending on season and locality, hence the variable mud carbon contents in different caves [65]. Nevertheless,

examination of wild cavefish gut contents containing bat guano, mud, plankton, insects and congener fragments in different seasons suggested well-nourished adults with non-specialized dietary regime in the Chica, Sabinos, Subterráneo and Pachón caves [1,66–68]. Pachón cavefish growth rate is comparable to their surface conspecifics [65] and healthy juveniles with digestive systems containing large numbers and varieties of micro-arthropods are found [1], suggesting excellent hunting skills in blind fry, like in laboratory conditions [69]. Subterráneo wild cavefish are more responsive to olfactory stimuli than eyed hybrids cohabiting in the cave [70], suggesting that olfactory skills described in the laboratory [29] are also at work in the natural environment. VAB or acoustic capabilities should be investigated as well in several caves, as food-finding skills may depend on cave ecosystems.

Laboratory and wild cavefish have higher fat content than surface fish (S Rétaux 2004–2018, personal observations). Cavefish metabolism is also modified at the circadian level. In wild Chica cavefish, but not in laboratory animals of the same origin, low expression levels of the oscillatory gene *period1* are associated with abolished rhythmic functions, suggesting that ‘cavefish experience permanent light instead of perpetual darkness’ [71]. Alterations of circadian rhythm are a common trait in cave animals [72] and might contribute to saving energy by lowering metabolic demand [73]. Finally, the hypothesis of a genetic limitation in body size (wild Pachón cavefish seem to have smaller maximal sizes than Tinaja and Subterráneo) to lower energy expenditure and food needs has yet to be investigated [65]. These studies on wild specimens enlighten the many modifications in complex functions that might have evolved in different cave populations.

Longitudinal investigations are also needed to better understand cavefish lifestyle. Cavefish breed easily in laboratories, yet little is known of their reproductive cycle and mating behaviour in the wild. In the Chica cave, Bridges described large females with eggs and small specimens that he estimated to be less than a month old, as reported in [66]. The dry season was suggested to correspond to the cavefish breeding period, which is consistent with the report of juveniles in Pachón in March 2016 [1]. If confirmed, this would suggest a ‘synchronized’ breeding season from South to North of the Sierra—different from the North America Amblyopsid cavefish, which breed after spring floods that introduce food into caves [74]. As laboratory spawning in *Astyanax* cavefish and surface fish is induced by variations in water temperature [12], following circadian and year-round climatic variations in caves will be crucial.

Despite the obvious difficulties of performing field experiments, moving towards a fully integrative and multi-disciplinary approach to better apprehend cavefish evolution requires further fieldwork. In particular, taking into account the specific ecological features of the different caves, or of the different ponds in a single cave, is essential. This would allow the establishment of mesocosm to study cavefish behaviour and lifestyle in more natural conditions, and also to perform more long-term artificial evolution studies on surface fish.

3. Conclusion

This review highlights the importance of considering cavefish evolution from multiple angles. Such an enterprise may

sometimes appear long and difficult, but we believe it will turn out to be rewarding and insightful to understand the secrets of cavefish adaptations to their environment. The huge difference in environmental conditions experienced by surface and cave morphs, the existence of multiple, rapidly evolved cave populations, the variety of phenotypes exhibited by cavefish at morphological, physiological and behavioural levels, the experimental amenability exhibited by the species make Mexican tetras primary fish models to answer broader evolutionary questions. Major research directions will include deciphering the genetic and developmental evolutionary processes, including the type and number of genes involved, or whether coding or regulatory sequences are at play for morphological evolution. Fascinating

questions also include the mechanisms of convergence, or how similar outcomes can result from different mechanisms, highlighting the power of ‘genetic tinkering’ in evolution [75].

Data accessibility. This article has no additional data.

Authors' contributions. All four authors wrote the review.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. Work in the group is supported by CNRS, FRM, UNADEV-AVIESAN, IDEEV and an Ecos-Nord Franco-Mexican exchange program.

Acknowledgements. We thank all past and present group members who contributed to an excellent scientific atmosphere and to the advancement of our research projects. We also thank Didier Casane and Luis Espinasa for fruitful long-term collaborations and scientific stimulation.

References

- Espinasa L, Bonaroti N, Wong J, Pottin K, Queinnee E, Rétaux S. 2017 Contrasting feeding habits of post-larval and adult *Astyanax* cavefish. *Subterr. Biol.* **21**, 1–17. (doi:10.3897/subtbiol.21.11046)
- Mitchell RW, Russell WH, Elliott WR. 1977 Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution, and evolution. *Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ.* **12**, 1–89.
- Wilkens H. 1988 Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In *Evolutionary biology*, vol. 23 (eds MK Hecht, B Wallace), pp. 271–367. New York, NY: Plenum.
- Fumey J, Hinaux H, Noirot C, Thermes C, Rétaux S, Casane D. 2018 Evidence for Late Pleistocene origin of *Astyanax mexicanus* cavefish. *BMC Evol. Biol.* **18**, 43–62. (doi:10.1186/s12862-018-1156-7)
- Hubbs C, Innes WT. 1936 *The first known blind fish of the family Characidae: a new genus from Mexico*. Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan 342, 1–7.
- Borowsky R, Cohen D. 2013 Genomic consequences of ecological speciation in *Astyanax* cavefish. *PLoS ONE* **8**, e79903. (doi:10.1371/journal.pone.0079903)
- Bernatchez L *et al.* 2010 On the origin of species: insights from the ecological genomics of lake whitefish. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**, 1783–1800. (doi:10.1098/rstb.2009.0274)
- Henning F, Meyer A. 2014 The evolutionary genomics of cichlid fishes: explosive speciation and adaptation in the postgenomic era. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **15**, 417–441. (doi:10.1146/annurev-genom-090413-025412)
- Peichel CL, Marques DA. 2017 The genetic and molecular architecture of phenotypic diversity in sticklebacks. *Phil. Trans. R. Soc. B* **372**, 20150486. (doi:10.1098/rstb.2015.0486)
- Hinaux H, Poulain J, Da Silva C, Noirot C, Jeffery WR, Casane D, Rétaux S. 2013 *De novo* sequencing of *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachon cavefish transcriptomes reveals enrichment of mutations in cavefish putative eye genes. *PLoS ONE* **8**, e53553. (doi:10.1371/journal.pone.0053553)
- McGaugh SE *et al.* 2014 The cavefish genome reveals candidate genes for eye loss. *Nat. Commun.* **5**, 5307. (doi:10.1038/ncomms6307)
- Elipot Y, Legendre L, Pèrè S, Sohm F, Rétaux S. 2014 *Astyanax* transgenesis and husbandry: how cavefish enters the lab. *Zebrafish* **11**, 291–299. (doi:10.1089/zeb.2014.1005)
- Ma L, Jeffery WR, Essner JJ, Kowalko JE. 2015 Genome editing using TALENs in blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE* **10**, e0119370. (doi:10.1371/journal.pone.0119370)
- Avise JC, Selander RK. 1972 Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution* **26**, 1–19. (doi:10.1111/j.1558-5646.1972.tb00170.x)
- Casane D, Rétaux S. 2016 Evolutionary genetics of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *Adv. Genet.* **95**, 117–159. (doi:10.1016/bs.adgen.2016.03.001)
- Keene AC, Yoshizawa M, McGaugh SE (eds). 2016 *Biology and evolution of the Mexican cavefish*. San Diego, CA: Academic Press.
- Wilkens H, Strecker U. 2017 *Evolution in the dark. Darwin's loss without selection*. Berlin, Germany: Springer.
- Chan YF *et al.* 2010 Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a *Pitx1* enhancer. *Science* **327**, 302–305. (doi:10.1126/science.1182213)
- Peichel CL. 2005 Fishing for the secrets of vertebrate evolution in threespine sticklebacks. *Dev. Dyn.* **234**, 815–823. (doi:10.1002/dvdy.20564)
- Shapiro MD, Bell MA, Kingsley DM. 2006 Parallel genetic origins of pelvic reduction in vertebrates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 13 753–13 758. (doi:10.1073/pnas.0604706103)
- Shapiro MD, Marks ME, Peichel CL, Blackman BK, Nereng KS, Jonsson B, Schluter D, Kingsley DM. 2004 Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* **428**, 717–723. (doi:10.1038/nature02415)
- Borowsky R. 2008 Restoring sight in blind cavefish. *Curr. Biol.* **18**, R23–R24. (doi:10.1016/j.cub.2007.11.023)
- Wilkens H, Strecker U. 2003 Convergent evolution of the cavefish *Astyanax* (Characidae, Teleostei): genetic evidence from reduced eye-size and pigmentation. *Biol. J. Linn. Soc.* **80**, 545–554. (doi:10.1111/j.1095-8312.2003.00230.x)
- Protas M, Conrad M, Gross JB, Tabin C, Borowsky R. 2007 Regressive evolution in the Mexican cave tetra, *Astyanax mexicanus*. *Curr. Biol.* **17**, 452–454. (doi:10.1016/j.cub.2007.01.051)
- O'Quin KE, Yoshizawa M, Doshi P, Jeffery WR. 2013 Quantitative genetic analysis of retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE* **8**, e57281. (doi:10.1371/journal.pone.0057281)
- Yamamoto Y, Jeffery WR. 2000 Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* **289**, 631–633. (doi:10.1126/science.289.5479.631)
- Yamamoto Y, Stock DW, Jeffery WR. 2004 Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* **431**, 844–847. (doi:10.1038/nature02864)
- Yamamoto Y, Byerly MS, Jackman WR, Jeffery WR. 2009 Pleiotropic functions of embryonic *sonic hedgehog* expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev. Biol.* **330**, 200–211. (doi:10.1016/j.ydbio.2009.03.003)
- Hinaux H, Devos L, Bibliowicz J, Elipot Y, Alié A, Blin M, Rétaux S. 2016 Sensory evolution in blind cavefish is driven by early events during gastrulation and neurulation. *Development* **143**, 4521–4532. (doi:10.1242/dev.141291)
- Pottin K, Hinaux H, Rétaux S. 2011 Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the *Shh* and *Fgf8* forebrain organising centres. *Development* **138**, 2467–2476. (doi:10.1242/dev.054106)
- Alie A, Devos L, Torres-Paz J, Prunier L, Boulet F, Blin M, Elipot Y, Rétaux S. 2018 Developmental evolution of the forebrain in cavefish, from natural variations in neuropeptides to behavior. *eLife* **7**, e32808. (doi:10.7554/eLife.32808)
- Elipot Y, Hinaux H, Callebert J, Rétaux S. 2013 Evolutionary shift from fighting to foraging in blind cavefish through changes in the serotonin

- network. *Curr. Biol.* **23**, 1–10. (doi:10.1016/j.cub.2012.10.044)
33. Hinaux H, Blin M, Fumey J, Legendre L, Heuze A, Casane D, Rétaux S. 2015 Lens defects in *Astyanax mexicanus* cavefish: evolution of crystallins and a role for alphaA-crystallin. *Dev. Neurobiol.* **75**, 505–521. (doi:10.1002/dneu.22239)
 34. Rétaux S, Casane D. 2013 Evolution of eye development in the darkness of caves: adaptation, drift, or both? *Evodevo* **4**, 26. (doi:10.1186/2041-9139-4-26)
 35. Shumway CA. 2008 Habitat complexity, brain, and behavior. *Brain Behav. Evol.* **72**, 123–134. (doi:10.1159/000151472)
 36. Striedter GF. 2004 *Principles of brain evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.
 37. Blin M, Tine E, Meister L, Elipot Y, Bibliowicz J, Espinasa L, Rétaux S. 2018 Developmental evolution and developmental plasticity of the olfactory epithelium and olfactory skills in Mexican cavefish. *Dev. Biol.* **50012-1606(18)30089-7**. (doi:10.1016/j.ydbio.2018.04.019)
 38. Yoshizawa M, Goricki S, Soares D, Jeffery WR. 2010 Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr. Biol.* **20**, 1631–1636. (doi:10.1016/j.cub.2010.07.017)
 39. Yoshizawa M, Yamamoto Y, O'Quin KE, Jeffery WR. 2012 Evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors promotes eye regression in blind cavefish. *BMC Biol.* **10**, 108. (doi:10.1186/1741-7007-10-108)
 40. Jeffery W, Strickler A, Guiney S, Heyser D, Tomarev S. 2000 *Prox1* in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev. Genes Evol.* **210**, 223–230. (doi:10.1007/s004270050308)
 41. Duboue ER, Keene AC, Borowsky RL. 2011 Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Curr. Biol.* **21**, 671–676. (doi:10.1016/j.cub.2011.03.020)
 42. Yoshizawa M, Robinson BG, Duboue ER, Masek P, Jaggard JB, O'Quin KE, Borowsky RL, Jeffery WR, Keene AC. 2015 Distinct genetic architecture underlies the emergence of sleep loss and prey-seeking behavior in the Mexican cavefish. *BMC Biol.* **13**, 15. (doi:10.1186/s12915-015-0119-3)
 43. Siegel JM. 2009 Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 747–753. (doi:10.1038/nrn2697)
 44. Dewasmes G, Duchamp C, Minaire Y. 1989 Sleep changes in fasting rats. *Physiol. Behav.* **46**, 179–184. (doi:10.1016/0031-9384(89)90252-7)
 45. Velluti RA. 1997 Interactions between sleep and sensory physiology. *J. Sleep Res.* **6**, 61–77. (doi:10.1046/j.1365-2869.1997.00031.x)
 46. Jaggard J, Robinson BG, Stahl BA, Oh I, Masek P, Yoshizawa M, Keene AC. 2017 The lateral line confers evolutionarily derived sleep loss in the Mexican cavefish. *J. Exp. Biol.* **220**, 284–293. (doi:10.1242/jeb.145128)
 47. Ohno K, Sakurai T. 2008 Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 70–87. (doi:10.1016/j.yfrne.2007.08.001)
 48. Prober DA, Rihel J, Onah AA, Sung RJ, Schier AF. 2006 Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. *J. Neurosci.* **26**, 13 400–13 410. (doi:10.1523/JNEUROSCI.4332-06.2006)
 49. Jaggard JB, Stahl BA, Lloyd E, Prober DA, Duboue ER, Keene AC. 2018 Hypocretin underlies the evolution of sleep loss in the Mexican cavefish. *eLife* **7**, e32637. (doi:10.7554/eLife.32637)
 50. Kowalko JE *et al.* 2013 Loss of schooling behavior in cavefish through sight-dependent and sight-independent mechanisms. *Curr. Biol.* **23**, 1874–1883. (doi:10.1016/j.cub.2013.07.056)
 51. Kowalko JE, Rohner N, Linden TA, Rompani SB, Warren WC, Borowsky R, Tabin CJ, Jeffery WR, Yoshizawa M. 2013 Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 16 933–16 938. (doi:10.1073/pnas.1317192110)
 52. Aspiras AC, Rohner N, Martineau B, Borowsky RL, Tabin CJ. 2015 Melanocortin 4 receptor mutations contribute to the adaptation of cavefish to nutrient-poor conditions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 9668–9673. (doi:10.1073/pnas.1510802112)
 53. Elipot Y, Hinaux H, Callebert J, Launay J, Blin M, Rétaux S. 2014 A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioral syndrome. *Nat. Commun.* **5**, 3647. (doi:10.1038/ncomms4647)
 54. Marques DA, Lucek K, Meier JI, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2016 Genomics of rapid incipient speciation in sympatric threespine stickleback. *PLoS Genet.* **12**, e1005887. (doi:10.1371/journal.pgen.1005887)
 55. Terekhanova NV, Logacheva MD, Penin AA, Neretina TV, Barmintseva AE, Bazykin GA, Kondrashov AS, Mugue NS. 2014 Fast evolution from precast bricks: genomics of young freshwater populations of threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *PLoS Genet.* **10**, e1004696. (doi:10.1371/journal.pgen.1004696)
 56. Yokoyama S, Meany A, Wilkens H, Yokoyama R. 1995 Initial mutational steps toward loss of opsin gene function in cavefish. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 527–532. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040190)
 57. Kim EB *et al.* 2011 Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* **479**, 223–227. (doi:10.1038/nature10533)
 58. Rubin CJ *et al.* 2012 Strong signatures of selection in the domestic pig genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 19 529–19 536. (doi:10.1073/pnas.1217149109)
 59. Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, Jeffery WR, Zon LI, Borowsky R, Tabin CJ. 2006 Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat. Genet.* **38**, 107–111. (doi:10.1038/ng1700)
 60. Yoshizawa M, Ashida G, Jeffery WR. 2012 Parental genetic effects in a cavefish adaptive behavior explain disparity between nuclear and mitochondrial DNA. *Evolution* **66**, 2975–2982. (doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01651.x)
 61. Burchards H, Dölle A, Parzefall J. 1985 Aggressive behavior of an epigeal population of *Astyanax mexicanus* and some observations on three subterranean populations. *Behav. Processes* **11**, 225–235. (doi:10.1016/0376-6357(85)90017-8)
 62. Espinasa L, Yamamoto Y, Jeffery WR. 2005 Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav. Processes* **70**, 144–148. (doi:10.1016/j.beproc.2005.06.003)
 63. Elliott WR. 2016 Cave exploration and mapping in the Sierra de El Abra region. In *Biology and evolution of the Mexican cavefish*. (eds AC Keen, M Yoshizawa, SE McGaugh), pp. 9–40, Ch. 1. Academic Press.
 64. Culver DC, Pipan T. 2009 *The biology of caves and other subterranean habitats*. Oxford, UK: Oxford University Press.
 65. Simon V, Elleboode R, Mahe K, Legendre L, Ornelas-Garcia P, Espinasa L, Rétaux S. 2017 Comparing growth in surface and cave morphs of the species *Astyanax mexicanus*: insights from scales. *Evodevo* **8**, 23. (doi:10.1186/s13227-017-0086-6)
 66. Breder CM. 1942 Descriptive ecology of La Cueva Chica, with especial reference to the blind fish, *Anoptichthys*. *Zoologica* **27**, 7–15.
 67. Tafall BFO. 1943 Observaciones sobre la fauna acuática de las cuevas de la región de Valles, San Luis Potosí (Mexico). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **4**, 43–71.
 68. Wilkens H, Burns RJ. 1972 A new *Anoptichthys* cave population (Characidae, Pisces). *Ann. Speleol.* **27**, 263–270.
 69. Espinasa L, Bibliowicz J, Jeffery WR, Rétaux S. 2014 Enhanced prey capture skills in *Astyanax* cavefish larvae are independent from eye loss. *Evodevo* **5**, 35. (doi:10.1186/2041-9139-5-35)
 70. Bibliowicz J, Alie A, Espinasa L, Yoshizawa M, Blin M, Hinaux H, Legendre L, Pere S, Rétaux S. 2013 Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterraneo cave. *Evodevo* **4**, 25. (doi:10.1186/2041-9139-4-25)
 71. Beale A, Guibal C, Tamai TK, Klotz L, Cowen S, Peyric E, Reynoso VH, Yamamoto Y, Whitmore D. 2013 Circadian rhythms in Mexican blind cavefish *Astyanax mexicanus* in the lab and in the field. *Nat. Commun.* **4**, 2769. (doi:10.1038/ncomms3769)
 72. Cavallari N *et al.* 2011 A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol.* **9**, e1001142. (doi:10.1371/journal.pbio.1001142)
 73. Moran D, Softley R, Warrant EJ. 2014 Eyeless Mexican cavefish save energy by eliminating the circadian rhythm in metabolism. *PLoS ONE* **9**, e107877. (doi:10.1371/journal.pone.0107877)
 74. Niemiller ML, Poulson TL. 2010 Chapter 7: Subterranean fishes of North America: Amblyopsidae. In *The biology of subterranean fishes* (eds E Trajano, ME Bichuette, BG Kapoor), pp. 169–280. Boca Raton, FL: CRC Press.
 75. Jacob F. 1977 Evolution and tinkering. *Science* **196**, 1161–1166. (doi:10.1126/science.860134)

Titre : Conséquences fonctionnelles, comportementales et adaptatives d'une mutation de la MAO (MonoAmine Oxydase) chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*.

Mots clés : sérotonine (5-HT), syndrome comportemental, stress, phylogéographie, neurogénétique, poisson

Résumé : Le neurotransmetteur sérotonine contrôle une grande variété de mécanismes physiologiques et comportementaux. Chez les humains, les mutations qui affectent la monoamine oxydase (MAO), l'enzyme qui dégrade la sérotonine, sont hautement délétères. Pourtant, le morphotype cavernicole aveugle de l'espèce *Astyanax mexicanus* (téléostéens) porte une mutation (P106L) induisant une perte de fonction partielle de cette enzyme, et semble prospérer dans son habitat souterrain naturel. Cette thèse décrit les effets de cette mutation, depuis l'échelle moléculaire à l'échelle des populations, afin de mieux cerner sa contribution à l'évolution des traits neuro-comportementaux du poisson cavernicole lors de son adaptation au milieu souterrain.

Dans une première publication, nous avons établi 4 lignées de poissons, correspondant aux deux morphotypes de l'espèce *Astyanax mexicanus* (poisson cavernicole et poisson vivant en surface), chacun porteur ou non de la mutation P106L. La mutation P106L affecte le stress en augmentant l'amplitude de la réponse aigue au stress, tout en diminuant l'anxiété. Nous avons aussi étudié la distribution des allèles mutés dans les populations naturelles au Mexique et trouvé que l'allèle mutant est présent dans plusieurs grottes. L'évolution de l'allèle muté sous sélection ou dérive génétique est discutée.

Dans une seconde publication, nous avons étudié les conséquences structurelles et biochimiques de la mutation P106L. La réduction de l'activité enzymatique de la MAO mutée est probablement due à une réduction de la flexibilité de l'une des boucles formant l'entrée au site actif, limitant l'accès des substrats. Des mesures d'HPLC ont montré des perturbations majeures de taux de sérotonine, dopamine et noradrénaline (et métabolites) dans le cerveau des poissons mutants. La mutation P106L *mao* est donc entièrement responsable du déséquilibre monoaminergique observé dans le cerveau des poissons cavernicoles. Enfin, l'effet de la mutation est partiellement compensé par une réduction de l'activité de synthèse de la sérotonine par la TPH. Nos résultats en révèlent plus sur les spécificités des systèmes monoaminergiques des poissons.

Enfin, pour aggraver l'inhibition de la MAO, nous avons généré le premier poisson mutant knockout pour la MAO. Les mutants KO homozygotes sont chétifs et meurent durant les premières semaines de développement. Contrairement au système dopaminergique, le système sérotoninergique des poissons KO homozygotes est très fortement altéré : aucun neurone positif à la sérotonine n'est détecté dans l'hypothalamus.

Title: Functional, behavioral and adaptive consequences of the mutation in MAO (Mono Amine Oxidase) in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*.

Keywords : serotonin (5-HT), behavioral syndrome, stress, phylogeography, neurogenetic, fish

Abstract : The neurotransmitter serotonin controls a great variety of physiological and behavioral processes. In humans, mutations affecting the monoamine oxidase or MAO, the serotonin-degrading enzyme, are highly deleterious. Yet, blind cavefish of the species *A. mexicanus* carry a partial loss-of-function mutation in MAO (P106L) and seem to thrive in their subterranean environment. This thesis describes the effects of this mutation, from the molecular level to the population level, in order to decipher the exact contribution of *mao* P106L in the evolution of cavefish neuro-behavioral traits, during their adaptation to the cave environment.

In a first paper, we established 4 fish lines, corresponding to the blind cave-dwelling and the sighted river-dwelling morphs of this species, with or without the mutation. We found that *mao* P106L strongly affected anxiety-like behaviors. Cortisol measurements showed lower basal levels and an increased amplitude of stress response after a change of environment in fish carrying the mutation. Finally, we studied the distribution of the P106L *mao* allele in wild populations of cave and river *A. mexicanus*, and discovered that the mutant allele was present – and sometimes fixed – in all populations inhabiting caves of the Sierra de El Abra. The possibility that this partial loss-of-function *mao* allele evolves under a selective or a genetic drift regime in the particular cave environment is discussed.

In a second paper, we assessed the structural and biochemical consequences of the mutation. We found that the reduction of enzymatic activity of mutant MAO is probably caused by a decrease of flexibility in one of the three loops forming the entrance of the active site, thus reducing the access of substrates. HPLC measurements in brains of mutant and non-mutant larvae and adult fish showed major disturbances in serotonin, dopamine and noradrenalin (and metabolites) contents, demonstrating that the P106L *mao* mutation is fully responsible for monoaminergic disequilibrium in the cavefish brain. We also discovered that the effects of the mutation were partially compensated by a decrease in activity of the TPH, the serotonin biosynthesis rate-limiting enzyme. Our results shed light on the specificities of fish monoaminergic systems.

Finally in order to aggravate the MAO inhibition, we generated the first fish knockout MAO mutant. The KO homozygous mutants were stunted and died during the first weeks of development. Contrary to the dopaminergic system which seemed normal in the KO homozygous mutants, the serotonergic system was strongly impaired; no serotonin positive neuron was detected in the hypothalamus.

