



HAL
open science

Etude du rôle de CHD8 dans les troubles gastro-intestinaux associés aux troubles du spectre autistique

Gaëlle Hayot

► **To cite this version:**

Gaëlle Hayot. Etude du rôle de CHD8 dans les troubles gastro-intestinaux associés aux troubles du spectre autistique. Génétique humaine. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ049 . tel-03629402

HAL Id: tel-03629402

<https://theses.hal.science/tel-03629402>

Submitted on 4 Apr 2022

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.



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

IGBMC – CNRS UMR 7104 – INSERM U 1258

THÈSE présentée par :

Gaëlle HAYOT

soutenue le : **05 Octobre 2020**

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

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

**Etude du rôle de *chd8* dans les troubles gastro-intestinaux
associés aux Troubles du Spectre Autistique**

THÈSE dirigée par :

Dr GOLZIO Christelle

CR, HDR, Institut de Génétique et Biologie
Moléculaire et Cellulaire, Illkirch

RAPPORTEURS :

Dr CREUZET Sophie

DR, Institut des Neurosciences Paris-Saclay

Dr LAUMONNIER Frédéric

CR, HDR, Université de Tours

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr BOURGERON Thomas

DR, Institut Pasteur, Paris

Dr KABASHI Edor

DR, Institut Imagine, Paris

Dr GODIN Juliette

CR, HDR, Institut de Génétique et Biologie
Moléculaire et Cellulaire, Illkirch

A mes vieux,
merci d'être vous

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide et les conseils de nombreuses personnes, que je souhaite remercier ici.

Tout d'abord, je souhaite remercier **Christelle Golzio** de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Tes conseils, ta patience et tes encouragements m'ont permis de réaliser mon projet de thèse dans les meilleures conditions possibles.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury de thèse **Sophie Creuzet, Frédéric Laumonier, Thomas Bourgeron, Edor Kabashi** et **Juliette Godin** d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je souhaite également remercier **Juliette Godin** et **Sophie Creuzet** d'avoir pris le temps d'évaluer l'avancement de mon projet et de m'avoir donné de précieux conseils lors de Comités de Suivi de Thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe « Réarrangements chromosomiques et Troubles Neurodéveloppementaux » : grâce à vous, j'ai passé quatre années très agréables. Merci à **Chantal** : ton aide sur mes différents projets m'a été très précieuse.

Un grand merci à **Didier Hentsch** et **Serge Taubert**. Grâce à votre aide, j'ai pu m'essayer à l'analyse des comportements du poisson-zèbre, ce qui m'a apporté beaucoup de satisfaction.

Merci à **Sandrine Geschier** d'avoir pris soin de mes lignées de poissons. J'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions !

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui travaillent sur les plateformes de l'IGBMC et sans qui les expériences-clés de ce travail n'auraient pas pu être réalisées :

- Merci à toutes les personnes du service Imagerie Photonique : **Bertrand Vernay, Elvire Guiot, Erwan Grandgirard, Yves Lutz, Marcel Boeglin**.
- Merci à la plateforme GenomEast : **Christelle Thibault-Carpentier, Céline Keime, Marie Cerciati, Violaine Alunni**.
- Merci à **Claudine Ebel** et **Muriel Philipps**, du service Tri Cellulaire

Je remercie sincèrement le Dr Ravindra Peravali, de l'Institut Technologique de Karlsruhe, pour ses conseils et son aide pour analyser le comportement des poissons-zèbres.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
INTRODUCTION.....	11
I. LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE	11
A. <i>Définition et évolution des critères diagnostiques</i>	11
B. <i>Les comorbidités</i>	14
1. Les Comorbidités Développementales.....	14
2. Les comorbidités Psychiatriques.....	15
C. <i>Les Troubles du Spectre Autistique dans la population.....</i>	16
2. La prévalence dépend de facteurs sociaux-économiques.....	16
3. La prévalence est plus élevée chez les hommes.....	17
D. <i>Trouble psychologique ou développemental ?.....</i>	18
II. BASES GENETIQUES ET EPIGENETIQUES DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE	20
A. <i>Génétique des Troubles du Spectre Autistique.....</i>	20
1. Syndromes incluant des Troubles du Spectre Autistique.....	20
2. Variations du Nombre de Copies	20
3. Les mutations ponctuelles	23
B. <i>Systèmes biologiques affectés</i>	24
1. Défaut des connexions synaptiques.....	24
2. Défaut d'élagage ou de myélinisation des axones	27
3. Déséquilibre du ratio Excitation/Inhibition.....	28
C. <i>Epigénétique des Troubles du Spectre Autistique</i>	29
1. Régulation de la compaction de La chromatine et TSA.....	29
2. Les remodeleurs de la chromatine dépendants de l'ATP.....	32
D. <i>CHD8 : un gène majeur des Troubles du Spectre Autistique</i>	34
1. Structure de CHD8	35
2. Rôle de CHD8 dans la régulation de l'expression des gènes	36
3. <i>CHD8</i> , gène majeur des Troubles du Spectre Autistique	38
4. Rôle de <i>CHD8</i> dans les Troubles du Spectre Autistique	39
III. DEVELOPPEMENT DU TUBE DIGESTIF ET DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE	42
A. <i>Organisation du système Nerveux Entérique et du tube digestif.....</i>	42
B. <i>Développement du tube digestif.....</i>	45
C. <i>Les Cellules de la Crête Neurale</i>	47
1. Origine développementale des Cellules de la Crête Neurale	47
2. Les différents types de Cellules de la Crête Neurale	49
3. Les Cellules de la Crête Neurale chez le poisson-zèbre.....	52
4. Les neurocristopathies.....	54

D.	<i>Développement du système nerveux entérique</i>	55
IV.	LES VOIES DE SIGNALISATIONS	58
A.	<i>La voie RET/GDNF</i>	58
B.	<i>La voie EDRNB</i>	59
C.	<i>La voie Wnt</i>	59
D.	<i>La voie TGF-β</i>	60
E.	<i>La voie de la Sérotonine</i>	60
F.	<i>La voie de l'acétylcholine</i>	63
V.	MODELISATION DES TSA <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	64
A.	<i>Modélisation des TSA in vitro</i>	64
B.	<i>Modéliser des comportements humains chez le modèle murin</i>	65
C.	<i>Le poisson-zèbre</i>	65
	OBJECTIFS DE LA THESE	69
	PROJET 1	71
I.	MATERIEL ET METHODES	73
II.	RESULTATS	78
III.	DISCUSSION	93
	PROJET 2	97
	PROJET 2 RESUME	99
	PROJET 3	114
	PROJET 3 : RESUME	116
	DISCUSSION GENERALE	133
	DE L'UTILISATION DU POISSON-ZEBRE POUR MODELISER DES MALADIES RARES	133
	LIMITES DE L'UTILISATION DU MODELE POISSON-ZEBRE	134
	ETUDE DE LA FONCTION DU GENE <i>CHD8</i> DANS LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE	136
	BIBLIOGRAPHIE	141
	ANNEXES	157

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1: LES MALADIES COMPOSANT LES TSA DANS LE DSM-IV ET LE DSM-V.	13
FIGURE 2: LES VARIATIONS DU NOMBRE DE COPIES OU COPY NUMBER VARIATION (CNV).	21
FIGURE 3: DE NOMBREUSES PROTEINES SYNAPTIQUES SONT ASSOCIEES AUX TSA.	26
FIGURE 4: DESEQUILIBRE EXCITATION/INHIBITION DANS LES TSA.	28
FIGURE 5: MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES.	31
FIGURE 6: LES REMODELEURS DE LA CHROMATINE.	33
FIGURE 7: LA FAMILLE DES CHD.	34
FIGURE 8: STRUCTURE DE <i>CHD8</i>	35
FIGURE 9 : L'ORGANISATION DU TUBE DIGESTIF ET DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE.	42
FIGURE 10 : L'ORGANISATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL.	43
FIGURE 11 : DEVELOPPEMENT DU TUBE DIGESTIF HUMAIN.	45
FIGURE 12 : DEVELOPPEMENT DU TUBE DIGESTIF CHEZ LE POISSON-ZEBRE.	46
FIGURE 13 : LA NEURULATION ET L'INDUCTION DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE CHEZ LES MAMMIFERES.	47
FIGURE 14 : INDUCTION ET SPECIFICATION DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE CHEZ LE POISSON-ZEBRE.	48
FIGURE 15: LES DERIVES CELLULAIRES DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE.	49
FIGURE 16: EXPERIENCE DE TRANSPLANTATION CAILLE-POULET.	50
FIGURE 17: REGIONALISATION DE LA CRETE NEURALE CHEZ L'HUMAIN ET LE POISSON-ZEBRE.	52
FIGURE 18: LA NEURULATION CHEZ LE POISSON-ZEBRE.	53
FIGURE 19: CONTRIBUTION DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE AU DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE.	56
FIGURE 20: LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE CHEZ LA SOURIS.	57
FIGURE 21: TRAJET DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE LE LONG DE L'INTESTIN.	58
FIGURE 22: SYNTHESE DE LA SEROTONINE ET DE LA MELATONINE.	61
FIGURE 23: LA SYNAPSE SEROTONINERGIQUE.	62
FIGURE 24: LA SYNAPSE CHOLINERGIQUE.	63
FIGURE 25: LE POISSON-ZEBRE.	66
FIGURE 26: TESTS COMPORTEMENTAUX POUR LES TSA CHEZ LE POISSON-ZEBRE.	67
FIGURE 27: DE NOMBREUX ORGANES SONT OBSERVABLES CHEZ LE POISSON-ZEBRE.	134
FIGURE 28: DETECTION D'UN EFFET PARENTAL DANS LA LIGNEE <i>CHD8SA19827</i>	135
FIGURE 29: MODELE DE TRAVAIL.	139
FIGURE 30: DU PATIENT AU PATIENT : AVANCEE DE LA RECHERCHE SUR <i>CHD8</i> DANS LES TSA.	139

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: CRITERES DIAGNOSTIQUES DE L'AUTISME DANS LES DIFFERENTES VERSIONS DU DSM.....	12
TABLEAU 2: LES CNVS RECURRENTS CHEZ LES INDIVIDUS ATTEINTS DE TSA.	22
TABLEAU 3: GENES CANDIDATS POUR LES TSA JOUANT UN ROLE DANS LA FORMATION OU LE FONCTIONNEMENT DES SYNAPSES. LES CRITERES DE CLASSIFICATION DES GENES SFARI SONT PRESENTES EN ANNEXE 1.	25
TABLEAU 4: CONSERVATION DE <i>CHD8</i> DANS LES PRINCIPAUX MODELES ANIMAUX.....	39
TABLEAU 5: LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES ENTEROENDOCRINES. D'APRES LATORRE <i>ET AL.</i> , 2015[147] .	44
TABLEAU 6: NOMBRE DE CELLULES, DE READS ET DE READS MAPPEES DE MANIERE UNIQUE POUR CHAQUE ECHANTILLON UTILISE LORS DE L'EXPERIENCE DE SEQUENÇAGE DES ARNM.....	74
TABLEAU 7: ANTICORPS UTILISES POUR LES IMMUNOMARQUAGES.....	76

INTRODUCTION

I. LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

A. DEFINITION ET EVOLUTION DES CRITERES DIAGNOSTIQUES

Le terme « autisme » a été utilisé pour la première fois en 1911 par Eugen Bleuler, un psychiatre autrichien, pour décrire la perte de contact avec la réalité observée dans les cas de schizophrénie. Le mot « autisme » est dérivé du grec « autos » qui signifie « soi-même » et décrit un repli sur soi extrême.

En 1943, Léo Kanner, un pédopsychiatre américain, décrit pour la première fois plusieurs enfants, 8 garçons et trois filles, âgés de deux à dix ans, atteints d'autisme infantile. Ces enfants présentent plusieurs points communs : des difficultés de socialisation et de communication (les enfants montrent un désintérêt vis-à-vis des gens, sont auto-suffisants dans les jeux, ne montrent pas de marques d'affection, présentent une écholalie, et ont une difficulté à utiliser les bons pronoms) et des comportements et intérêts restreints et répétitifs (les patients sont très intéressés par les objets, ont des obsessions, peuvent être profondément absorbés par certaines activités, présentent des comportements compulsifs et répétitifs, n'aiment pas le changement). Léo Kanner présente ses patients comme étant atteints d'un défaut autistique du contact affectif congénital.[2]

La même année, Hans Asperger décrit un trouble qu'il choisit de nommer « autisme », en référence à Eugen Bleuler. Ce terme lui permet de différencier les individus atteints de cette pathologie des individus souffrant de schizophrénie. En effet, ses patients montrent des symptômes semblables à ceux de patients schizophrènes : ils ont un contact limité avec les autres, un comportement automatique, et présentent des stéréotypies. Cependant, dans le cas des patients schizophrènes, la perte de contact avec le monde extérieur est progressive, tandis que pour les individus atteints d'autisme, ce contact est fortement diminué dès le début de la vie. De plus, les patients autistes ne présentent pas d'hallucinations, de délire ou d'anxiété, contrairement aux individus atteints de schizophrénie. Asperger décrit 4 garçons, âgés de 6 à 11 ans, présentant de grandes ressemblances avec les enfants décrits par Léo Kanner. Ces enfants ont une relation à l'environnement limitée, font preuve d'obsession et d'agressivité. Les grandes étapes du développement sont retardées, ils sont maladroits et

manquent de coordination motrice. En outre, Asperger précise que de tels individus ne sont pas rares, et que les signes d'autisme sont décelables dès deux ans. Il établit également un parallèle entre les troubles résultant d'une cause organique, telle qu'une blessure lors de la naissance ou une encéphalite, entraînant des dommages cérébraux, et les troubles qu'aucune cause organique ne peut expliquer : la psychopathie autistique.[3]

Tableau 1: Critères diagnostiques de l'autisme dans les différentes versions du DSM.

Version	Catégorie de trouble	Critères Diagnostiques
DSM I et II	Autisme non décrit	
DSM III	Trouble global du développement	<ul style="list-style-type: none"> • Débute avant les 30 mois de l'enfant • Pas de réactivité vis-à-vis d'autres personnes • Déficit important du développement du langage • Particularité du langage (écholalie différée, inversion pronominale, langage métaphorique) • Réactions étranges à certains aspects de l'environnement (résistance au changement, attachement aux objets) • Pas de délire, d'hallucinations ou d'incohérences idéiques
DSM III-R	Trouble autistique	<ul style="list-style-type: none"> • Altération des interactions sociales réciproques • Altérations de la communication verbale et non verbale et des activités imaginatives • Présence d'activités et/ou d'intérêts restreints
DSM IV	Trouble envahissant du comportement	<ul style="list-style-type: none"> • Altération des interactions sociales et de la communication verbale et non verbale • Intérêts et activités restreints, répétitifs et stéréotypés
DSM IV-R	Trouble envahissant du comportement	<ul style="list-style-type: none"> • Altération des interactions sociales et de la communication • Intérêts et activités restreints, répétitifs et stéréotypés
DSM V	Trouble du Spectre Autistique	<ul style="list-style-type: none"> • Difficultés pour les interactions sociales et la communication • Comportements et intérêts restreints, répétitifs et stéréotypés

La définition de l'autisme et des Troubles du Spectre Autistique (TSA) a bien évolué depuis leur première description par Léo Kanner et Hans Asperger en 1943. Dans les premiers manuels diagnostiques et statistiques des troubles mentaux (DSM I et DSM II), l'autisme n'est

pas décrit. Les patients présentant des caractéristiques autistiques sont classés dans la catégorie des réactions schizophréniques de l'enfant.[4]

Ce n'est qu'à partir de la troisième édition du manuel (DSM III), en 1980, que l'autisme infantile est décrit comme un trouble global du développement. La troisième édition révisée du manuel (DSMIII-R), parue en 1987, introduit le trouble autistique [5], dont les critères de diagnostic seront conservés dans la quatrième édition du manuel (DSM IV), parue en 1994, ainsi que dans sa version révisée (DSM IV-R), qui date de 2000. Dans cette édition, le trouble autistique fait partie des Troubles Envahissants du Comportement, avec le syndrome d'Asperger et le Trouble Envahissant du Développement non spécifié. Les individus sans déficience intellectuelle, avec une perturbation du fonctionnement social sont diagnostiqués comme atteints d'un trouble autistique. [6, 7](Figure 1)

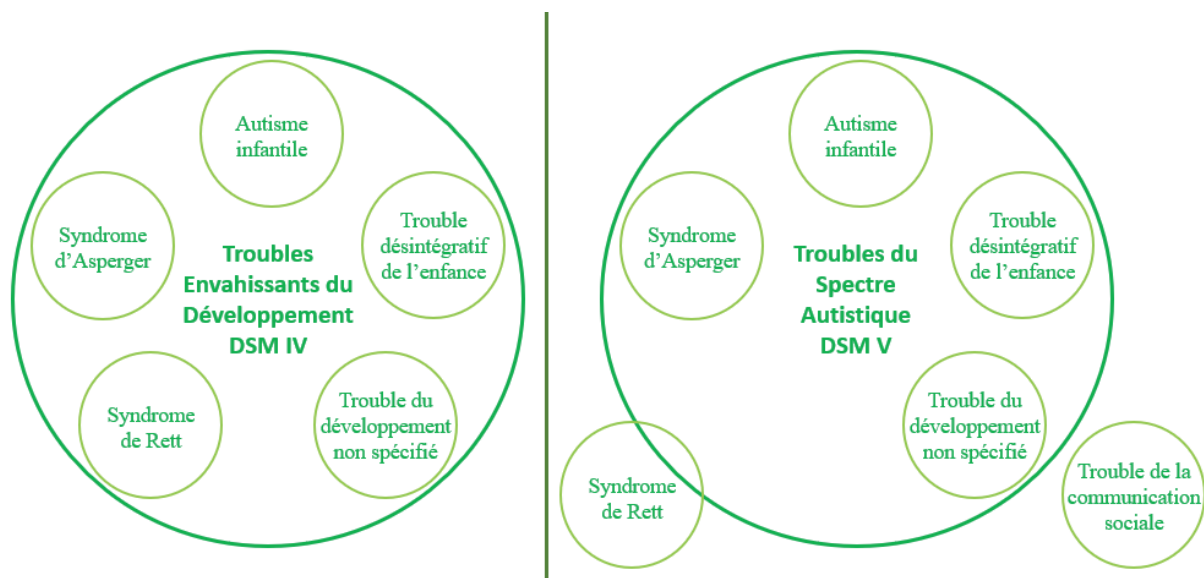


Figure 1: Les maladies composant les TSA dans le DSM-IV et le DSM-V. Dans la dernière édition du DSM, le syndrome de Rett n'est plus inclus dans les TSA, bien qu'ils présentent des caractéristiques communes. Les individus ne présentant pas de comportements et intérêts restreints, répétitifs et stéréotypés ne sont pas inclus dans les TSA, mais présentent un Trouble de la communication sociale.

Aujourd'hui, le diagnostic des TSA repose sur la présence concomitante de deux symptômes principaux : 1) des difficultés pour les interactions sociales et la communication et 2) des comportements et intérêts restreints, répétitifs et stéréotypés. (DSM V)[8] (Figure 1, Tableau 1). Ainsi, les TSA sont devenus, au fil des années, un rassemblement de troubles hétérogènes, et de différentes origines, rassemblés sous une même appellation. [9]

B. LES COMORBIDITES

L'hétérogénéité des TSA est également remarquable lorsque l'on s'intéresse aux différentes comorbidités qui peuvent accompagner le trouble principal. En effet, bien que les TSA puissent être présents de manière isolée chez les patients, ils sont le plus souvent accompagnés de comorbidités, qui peuvent être développementales, psychiatriques ou médicales.[10] On parle alors de TSA syndromiques, qui concernent environ 85 % des individus atteints de TSA.[10] Cependant, cette proportion de TSA dit syndromiques dépend très largement des atteintes considérées comme des comorbidités.

1. LES COMORBIDITES DEVELOPPEMENTALES

Plus de 80 % des individus souffrant de TSA présentent également une comorbidité développementale. [10] Ces comorbidités peuvent être cognitives : les patients souffrent de troubles du langage, de troubles de l'apprentissage, de troubles de l'intégration sensorielle, ou encore de troubles de l'attention-hyperactivité.[10] Les patients peuvent également présenter une déficience intellectuelle, bien qu'un quotient intellectuel inférieur à 70 ne soit pas un critère diagnostique des TSA.[8, 10]

Les comorbidités développementales peuvent également être somatiques comme par exemple, les troubles gastro-intestinaux incluant une constipation, des diarrhées, des reflux gastriques ou des douleurs abdominales. La prévalence de ces comorbidités varie entre 4 % et 97 % selon les cohortes étudiées. [11-14] On peut remarquer que Leo Kanner avait déjà noté des indications de l'existence de cette comorbidité : sur les 11 enfants décrits dans son étude de 1943, six présentaient des troubles gastro-intestinaux tels que des difficultés de nourrissage ou des vomissements.[2]

Une autre comorbidité somatique mise en évidence par Léo Kanner est la macrocéphalie, une augmentation du volume crânien : sur onze enfants décrits, cinq avaient une grosse tête.[2] On considère qu'un individu est macrocéphale lorsque son périmètre crânien est supérieur au 97^{ème} percentile. De nombreuses études ont depuis montré que de nombreux individus présentant des TSA ont également une macrocéphalie.[15] Selon les études, la prévalence de la macrocéphalie dans les populations souffrant de TSA varie entre 3 % et 42 %. [15]

A l'inverse, d'autres patients présentant des TSA ont une microcéphalie : leur périmètre crânien est inférieur au 3^{ème} percentile. Cette comorbidité est fréquemment associée à des comorbidités médicales. [16] D'autres comorbidités somatiques peuvent être présentes chez les individus atteints, comme, par exemple, une augmentation ou diminution de la stature, ou encore des anomalies du système nerveux central, telles qu'une agénésie du corps calleux, une réduction du nombre de neurones dans le cervelet, ou des défauts crânio-faciaux.[9, 11]

Les troubles du sommeil, tels que l'insomnie, les réveils fréquents durant la nuit, ou encore des difficultés à se réveiller le matin, affectent entre 50 % et 80 % des individus présentant un TSA. [9] Ces troubles semblent être causés par une dérégulation du rythme circadien. En effet, la production de mélatonine, une hormone essentielle au maintien de l'horloge biologique, est réduite chez les individus atteints de TSA. [17]

Certaines comorbidités peuvent être spécifiques d'une lésion génétique. Par exemple, les individus porteurs d'une duplication de la région 16p11.2 BP4-BP5 présentent un TSA, associé à une diminution de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) et à une microcéphalie, tandis que la délétion de cette même région entraîne un TSA associé à une augmentation de l'IMC et à une macrocéphalie. [18]

Des délétions dans la région 22q11, à l'origine du syndrome de DiGeorge ou syndrome vélocardio-facial, entraînent un TSA associé à des malformations crânio-faciales, tels qu'une fissure palatine dans 49 % des cas, des anomalies du tractus urinaire dans 36 % des cas, et à des maladies cardiaques congénitales dans 80 % des cas.[19]

2. LES COMORBIDITES PSYCHIATRIQUES

Environ 10 % des patients atteints de TSA présentent également un trouble psychiatrique. [10] Les comorbidités psychiatriques les plus représentées sont l'anxiété, le trouble obsessionnel-compulsif, les troubles de l'humeur, la dépression et la schizophrénie. [10-12] Asperger avait déjà émis l'hypothèse d'un lien entre autisme et schizophrénie. [3] Les comorbidités neurologiques, telles que l'épilepsie, l'encéphalopathie, la perte d'audition ou le syndrome de Gilles de la Tourette affectent 15 % des individus atteints de TSA. [10] Leo Kanner et Hans Asperger avaient noté que plusieurs de leurs patients présentaient des convulsions et des crises d'épilepsies.[2, 3]

C. LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE DANS LA POPULATION

1. Y A-T-IL UNE EPIDEMIE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE ?

La prévalence des TSA semble augmenter au cours du temps. Au début des années 1970, il y avait environ 4 ou 5 enfants atteints d'autisme pour 10 000.[20] En 2000, ils étaient environ 67 pour 10 000 et 90 pour 10 000 en 2006. En 2016, il y avait 185 enfants atteints de TSA pour 10 000, ce qui correspond à 1 enfant pour 54.[21] (Centers for Disease Control and Prevention, cdc.gov)

Cette augmentation peut être expliquée par plusieurs hypothèses. Elle peut être due à une augmentation des facteurs de risques dans l'environnement, comme la pollution, les pesticides, les perturbateurs endocriniens (bisphénol A). Les TSA ont également gagné en visibilité auprès des médecins et du grand public, ce qui a pu permettre un meilleur dépistage de ces troubles. Néanmoins, les évolutions successives de la définition de l'autisme et des TSA ont joué un grand rôle dans cette augmentation de la prévalence. King et al. ont, en effet, noté une augmentation de la prévalence des TSA à chaque changement des critères diagnostiques. [22]

2. LA PREVALENCE DEPEND DE FACTEURS SOCIAUX-ECONOMIQUES

Les patients décrits par Léo Kanner et Hans Asperger provenaient de familles avec un bon statut socio-économique : la plupart des parents étaient diplômés de l'université et étaient avocats, professeurs, ingénieurs, psychiatres, médecins.[2] Plusieurs études, conduites aux Etats-Unis, en Angleterre et en Australie, ont montré que la prévalence des TSA croissait avec le statut socio-économique de la famille, confirmant les observations de Kanner et Asperger.[23-25] En revanche, des études du même type menées en France et en Suède ont observé une plus forte prévalence de TSA dans des populations pauvres. [26, 27] Cette différence peut s'expliquer par une sous-estimation de la prévalence des TSA des populations à faible revenu, due au moins bon accès de ces populations aux services de santé.[27]

Aux Etats-Unis, une plus forte prévalence des TSA est observée dans les populations blanches, puis dans les populations noires, et enfin dans les populations d'origines hispaniques.[23, 28, 29] Cependant, l'écart entre ces populations semble se réduire au fur et à mesure des années.[28] Ceci semble suggérer que l'écart de prévalence entre ces populations serait dû à

une différence de statut socio-économique et d'accès aux soins pour les populations noires et hispaniques par rapport aux populations blanches, aux Etats-Unis.

3. LA PREVALENCE EST PLUS ELEVEE CHEZ LES HOMMES

Toutes les cohortes de patients atteints de TSA montrent un fort biais du sex-ratio. En moyenne, 80 % des personnes atteintes de TSA sont des hommes et 20 % sont des femmes. [10, 12, 21] Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette observation.

Tout d'abord, la présentation clinique des TSA diffère chez les garçons et les filles et les comorbidités sont également différentes.[30] Les garçons présentent des comportements stéréotypés plus marqués et ont plus de risques de développer de l'hyperactivité, des troubles obsessionnels-compulsifs, et des tics.[30] Les filles ont plus de risques d'être atteintes de dépression, d'anxiété et ont plus de risques de faire des tentatives de suicide et d'être admises en hôpital psychiatrique.[30] De plus, une méta-analyse a montré que le sex-ratio des TSA est plus proche de 75 %-25 %, ce qui suggère que les filles sont probablement sous-diagnostiquées.[31]

Il existe également une différence du type de mutations associées aux TSA chez les garçons et les filles. En effet, on retrouve chez les filles un plus grand nombre de délétions/duplications et de mutations ponctuelles estimées pathogènes que chez les garçons.[32] De plus, les variants retrouvés chez les filles sont estimés plus délétères que ceux retrouvés chez les garçons et les CNVs de grande taille sont plus souvent hérités de la mère non affectée que les petits CNVs. [32] Malgré cela, les filles sont, en général, moins affectées que les garçons par les TSA, ce qui pourrait suggérer l'existence d'un effet protecteur chez les femmes.[32]

De nombreux gènes de susceptibilité aux TSA sont localisés sur le chromosome X. Parmi les 144 gènes classés dans la catégorie 1 dans la base de données SFARI, 17 sont localisés sur le chromosome X, ce qui représente un enrichissement significatif par rapport au reste du génome (test exact de Fisher, p-value = 0,00010636). Cet enrichissement pourrait expliquer le plus grand nombre de garçons atteints de TSA : une partie de l'hérédité des TSA pourrait être liée à l'X. C'est notamment le cas pour le syndrome du X fragile, causé par une expansion de triplets dans la région régulatrice du gène *FMR1*, situé sur le chromosome X.

Les hormones sexuelles, testostérone et œstradiol, participent à la régulation de plusieurs gènes associés aux TSA. Notamment, la dihydrotestostérone et le 17β-œstradiol activent l'expression de *SHANK1*, *SHANK2* et *SHANK3*, 3 gènes associés aux TSA, bien que l'effet du 17β-œstradiol soit moindre que celui de la dihydrotestostérone. [33] De plus, si le 17β-œstradiol active l'expression du gène *RORA*, un autre gène associé aux TSA, la dihydrotestostérone l'inhibe.[34]

D. TROUBLE PSYCHOLOGIQUE OU DEVELOPPEMENTAL ?

Les premières descriptions de cas d'autisme par Léo Kanner et Hans Asperger mettent déjà en évidence la dimension familiale des TSA. En effet, parmi les cas décrits, plusieurs avaient des parents solitaires, présentant des tendances obsessives et/ou ayant des difficultés d'interactions sociales.[2, 3] Ces observations suggèrent une contribution génétique aux TSA ou une origine psychogénétique de l'autisme.

Dans les deux premières éditions du DSM, l'autisme est considéré comme une forme de schizophrénie se déclarant particulièrement tôt. Cependant, l'autisme et la schizophrénie présentent de nombreuses différences, déjà pointées par Asperger.[3] De plus, on n'observe pas de biais du sex-ratio chez les individus atteints de schizophrénie, contrairement aux individus atteints d'autisme.

En 1967, le psychanalyste Bruno Bettelheim, fervent défenseur de l'hypothèse de la psychogénèse, postula que des parents froids et distants, en particulier les « mères frigidaires », d'enfants non désirés étaient la principale cause d'autisme infantile.[35] Cependant, cette hypothèse est contredite par le fait que les parents d'enfants souffrant d'autisme ne sont pas plus détachés, froids ou obsessionnels que ceux d'enfants souffrant d'autres formes de psychoses infantiles.[36] La théorie de la psychogénèse a depuis été abandonnée, bien qu'elle persiste dans certains cercles psychanalytiques.

Entre la fin des années 60 et le début des années 70, plusieurs autres hypothèses ont été émises quant à l'étiologie de l'autisme. O'Gorman suggère que des phénomènes normaux de dissociation et de retrait sélectif sont exacerbés chez les individus souffrant d'autisme.[20] Hutt, Hutt et Ounsted suggèrent que l'autisme représente un degré d'introversion extrême, génétiquement déterminé.[20] Enfin, Rutter propose que l'autisme trouve son origine dans

des défauts de langage et/ou de cognition, qui pourraient dériver, dans certains cas, de troubles neurologiques.[20]

Les premières études pour rechercher les causes génétiques de l'autisme ont été réalisées à la fin des années 70. Des études systématiques conduites sur des paires de jumeaux dont au moins un était atteint de TSA ont montré une plus grande concordance chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes, ce qui suggère une forte influence de l'hérédité, et donc une composante génétique, pour les TSA. [37] [38]

Néanmoins, l'environnement peut également jouer un rôle déterminant dans l'apparition de TSA. Depuis les années 1990, plusieurs études cliniques ont démontré qu'une exposition à l'acide valproïque durant la gestation augmente les risques de TSA chez l'enfant.[39, 40] De la même façon, les enfants prématurés ont plus de risques d'être atteints d'un TSA.[41] Une infection de la mère durant les deux premiers trimestres de la grossesse peut également augmenter le risque d'apparition de TSA chez l'enfant à naître.[42, 43]

Une étude publiée en 1998 proposa une association entre les TSA et le vaccin « Rougeole-Oreillons-Rubéole ». De nombreuses études ont été réalisées afin de tester le lien entre TSA et vaccins, et aucun lien n'a été démontré.[44] L'étude originale a depuis été rétractée, en raison de conflits d'intérêts non déclarés et de défauts méthodologiques. Cependant, ses effets se font encore sentir et de nombreuses personnes adhèrent encore aujourd'hui à cette théorie du complot et refusent toute vaccination pour leurs enfants.

Il est aujourd'hui communément admis que les TSA sont un trouble développemental ayant des origines à la fois génétiques et environnementales. Quelques TSA sont d'origine purement génétique, avec une transmission mendélienne, mais le plus souvent, il s'agit d'interactions entre le génome et l'environnement ou d'interactions entre plusieurs allèles de susceptibilité.

II. BASES GENETIQUES ET EPIGENETIQUES DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

L'architecture génétique des TSA est très variée. Les causes génétiques peuvent être des anomalies chromosomiques, des mutations ponctuelles et des modifications épigénétiques.

A. GENETIQUE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

1. SYNDROMES INCLUANT DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

La cause génétique la plus courante des TSA est le syndrome de l'X Fragile (MIM 300624), causé par une expansion de triplets CGG dans la région régulatrice du gène *FMR1* (Xq27.3), qui s'accompagne d'une hyperméthylation du promoteur du gène, et donc d'une diminution de son expression.[45] La sévérité de la maladie est directement liée au nombre de répétitions du triplet CGG : un nombre de triplet compris entre 55 et 200 est appelé prémutation et un nombre de triplet supérieur à 200 est considéré comme une mutation complète.[45] Les individus porteurs d'une mutation complète dans *FMR1* souffrent de déficience intellectuelle, d'autisme et d'hyperactivité.[45] Ils ont un visage allongé, des oreilles larges ou proéminentes et un macro-orchidisme.[45] Le syndrome de l'X Fragile peut également être causé par des mutations ponctuelles dans le gène *FMR1*, aussi bien dans des exons qu'à des jonctions intron-exon.[46] Le syndrome de l'X Fragile représente environ 2 % des individus atteints de TSA. [47]

La sclérose tubéreuse de Bourneville (MIM 191100 et MIM 613254) est une maladie à hérédité autosomique dominante, caractérisée par des tumeurs bénignes dans de nombreux organes, tels que le cerveau, la peau, le cœur, les reins et les poumons. [48] Les tumeurs dans le système nerveux central entraînent selon les cas : autisme, épilepsie, des troubles du comportement et de l'apprentissage. [48]La sclérose tubéreuse de Bourneville est causée par des mutations dans les gènes *TSC1* et *TSC2* et représente environ 0,90 % des personnes atteintes de TSA.[47, 48]

2. VARIATIONS DU NOMBRE DE COPIES

Environ 3 % des patients atteints de TSA sont porteurs d'une ou plusieurs anomalies chromosomiques. Cette anomalie peut être une variation du nombre de copies (ou Copy Number Variant, CNV), une inversion ou une translocation. Les CNVs sont des duplications ou

des délétions de parties de chromosomes qui peuvent contenir un nombre important de gènes. (Figure 2)

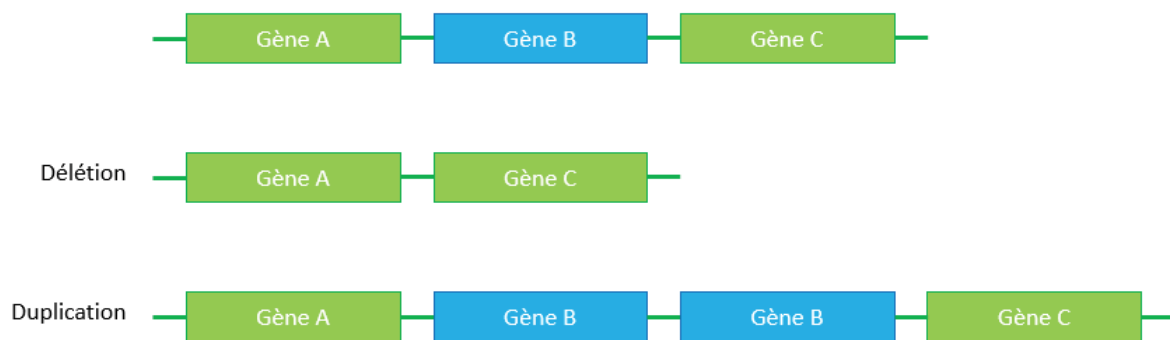


Figure 2: Les Variations du Nombre de Copies ou Copy Number Variation (CNV).

La base de données SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative, www.sfari.org) liste 17 CNV récurrents chez les individus souffrant de TSA. (Tableau 2)

Dans certains cas, le CNV ne contient qu'un seul gène, voire une partie d'un gène et il est alors simple de déterminer si ce gène est directement responsable du TSA. Par exemple, des micro-délétions exoniques du gène *AUTS2*, sur le chromosome 7q11.22, entraînent déficience intellectuelle, autisme, une microcéphalie associée à une paralysie cérébrale et des malformations faciales. [49] De même, des délétions de *NRXN1* sont associées à des TSA, de la déficience intellectuelle et hyperactivité, de la schizophrénie et des troubles de l'humeur, des convulsions et des malformations congénitales. [50] Enfin, des délétions de *SHANK1* sont associées à des TSA à haut niveau de fonctionnement [51] et des délétions de *SHANK2* sont associées à des TSA et de la déficience intellectuelle. [52]

Dans d'autres cas, le CNV peut contenir plusieurs dizaines de gènes et il est alors difficile de savoir si les TSA et leurs comorbidités sont dus à la variation de dosage d'un seul gène du CNV ou à la combinaison de la variation de dosage de plusieurs. Par exemple, une délétion d'une région de 600 kb, comprenant 29 gènes, et située sur le chromosome 16p11.2 BP4-BP5, a été associée à des TSA, de l'épilepsie, de l'obésité et de la macrocéphalie tandis qu'une duplication de cette même région est associée à de l'autisme, de la schizophrénie, de l'anorexie et de la microcéphalie. Pour ce CNV, le gène *KCTD13* est proposé comme le gène majeur responsable du phénotype miroir micro/macrocéphalie, et son déficit entraîne une altération de la mémoire à court terme chez la souris.[53, 54] L'effet de la variation de dosage de *KCTD13* est

exacerbé par la variation de dosage concomitante des gènes modificateurs *MVP* et *MAPK3*. [53]

Tableau 2: Les CNVs récurrents chez les individus atteints de TSA.

Locus	Coordonnées génomiques	Type de CNV	Nombre de gènes
1q21.1	145 900 678-147 965 543	Délétion-Duplication	9
2p16.3	47 600 165-53 040 270	Délétion-Duplication	10
3q29	195 676 676-197 366 632	Délétion-Duplication	21
5q35	178 554 060-179 589 550	Duplication	14
7q11.23	72 311 894-74 129 587	Délétion-Duplication	23
8p23.1	8 123 460-11 384 691	Délétion-Duplication	22
15q11.2	23 037 105-25 188 131	Délétion-Duplication	9
15q11.2-q13	19 956 119-30 081 250	Duplication	14
15q13.3	30 938 215-32 914 140	Délétion-Duplication	7
16p11.2 BP2-BP3	28 825 605-29 042 014	Délétion-Duplication	9
16p11.2 BP4-BP5	29 692 499-30 792 499	Délétion-Duplication	27
16p12.1	21 901 307-22 703 862	Délétion-Duplication	9
16p13.3	3 392 370-5 752 860	Délétion-Duplication	1
17p11.2	16 532 736-20 464 365	Délétion-Duplication	49
17q11.2	29 015 932-29 149 664	Délétion-Duplication	12
17q12	37 228 545-39 077 997	Délétion-Duplication	15
22q11.2	21 031 117-21 651 381	Duplication	44
22q13.3	41 122 568-49 565 875	Délétion	4

Les gènes de plusieurs CNVs peuvent également interagir, ce qui pourrait expliquer les similitudes de phénotypes de patients porteurs de CNVs différents. Ainsi, une délétion de la région 16p11.2 BP2-BP3 entraîne un TSA associé à une macrocéphalie et à de l'obésité, tandis que la duplication de la même région cause un TSA associé à une microcéphalie et de la maigreur.[55] Cette région 16p11.2 BP2-BP3 interagit au niveau chromatinien avec la région 16p11.2 BP4-BP5. [55] Le gène *LAT* est proposé comme le gène majeur responsable de la variation du volume de la tête chez les individus porteurs d'une duplication/délétion de la

région 16p11.2 BP2-BP3 et l'effet de *LAT* peut être modulé par les gènes *KCTD13*, *MVP* et *MAPK3*. [56]

Un effet miroir entre duplication et délétion d'une portion de chromosome est également observé dans le cas de CNV englobant le gène *SHANK3* : tandis qu'une délétion entraîne de l'autisme et un retard de développement du langage, la duplication de cette région est responsable d'un syndrome d'Asperger, associé à un développement précoce du langage. [57]

3. LES MUTATIONS PONCTUELLES

De nombreux cas de TSA sont causés par des mutations ponctuelles dans des gènes individuels. Les mutations peuvent être perte ou gain de fonction, dominantes ou récessives et elles peuvent être héritées ou *de novo*.

D'après la base de données SFARI, 913 gènes sont actuellement associés aux TSA, dont 363 sont considérés comme étant de bons gènes candidats. Un total de 144 gènes sont classés dans la catégorie 1 : ils sont clairement associés aux TSA et ils font tous partie de la liste de gènes SPARK (sparkforautism.org), qui recense les gènes connus de TSA. Lorsqu'un variant est détecté dans un des gènes de la liste SPARK chez un individu atteint de TSA, un diagnostic génétique peut être établi.

Dans certains cas, les TSA sont des pathologies liées à l'X. En effet, les gènes *NLGN3* et *NLGN4* sont localisés sur le chromosome X et plusieurs mutations faux-sens et non-sens (décalage du cadre de lecture entraînant un codon stop précoce) ont été identifiés chez des individus atteints de TSA. Ces individus ont hérité ces mutations de leurs mères, elles-mêmes porteuses saines. [58]

Dans d'autre cas, les mutations peuvent apparaître *de novo* chez le patient. Notamment, une mutation *de novo* faux-sens hétérozygote dans le gène *NLGN2*, avec effet perte de fonction, entraîne l'apparition de traits autistiques et de l'anxiété, des comportements obsessionnels-compulsifs, un retard de développement, de l'obésité et une macrocéphalie. [59] De même, des mutations tronquantes *de novo* dans le gène *DYRK1A* causent un syndrome comprenant déficience intellectuelle, TSA, comportement stéréotypé, troubles du langage, microcéphalie, retard de croissance intra-utérine, hypertension et des convulsions fébriles dans l'enfance. [60] Des mutations faux-sens hétérozygotes dans le gène *SHANK3* sont responsables de TSA

associés à un retard du langage et à une déficience intellectuelle sévère. [57] Enfin, des mutations faux-sens *de novo* dans les gènes *NTNG1* et *CHD8* ont été retrouvées chez des individus atteints de TSA provenant de la Simons Simplex Collection. [61]

Certaines mutations peuvent également être héritées. Ainsi, certains individus présentant des TSA sont porteurs de mutations faux-sens hétérozygotes dans le gène *SHANK2*, qu'ils ont héritées d'un de leurs parents.[52] Un petit pourcentage de patients est porteur de mutations récessives. Ainsi, deux frères porteurs d'une mutation non-sens homozygote dans le gène *FEV*, un facteur de transcription exprimé exclusivement dans les neurones du système sérotoninergique, présentaient des TSA. [62, 63]

B. SYSTEMES BIOLOGIQUES AFFECTES

Différentes hypothèses ont été proposées afin d'expliquer les troubles des interactions sociales et les intérêts et comportements restreints et stéréotypés caractéristiques des TSA. Il est aujourd'hui admis que ces troubles résultent d'une pathologie du développement du cerveau. La recherche d'un mécanisme commun à toutes les formes d'autisme s'est soldée par un échec et on sait aujourd'hui que l'origine des TSA est multiple. Plusieurs mécanismes cellulaires pouvant être impactés chez les personnes atteintes de TSA sont discutés dans ce chapitre.

1. DEF AUT DES CONNEXIONS SYNAPTIQUES

De nombreux gènes associés aux TSA sont impliqués dans la formation et le maintien des synapses. (**Tableau 2**) (**Figure 3**)

Les neuroligines (NLGN) et les neurexines (NRXN) sont des protéines qui permettent l'établissement et le maintien des synapses. Les protéines présynaptiques NRXN interagissent avec leurs homologues postsynaptiques NLGN. La protéine NLGN1 est présente dans les synapses excitatrices tandis que NLGN2 est localisée dans les synapses inhibitrices. La surexpression *in vitro* de *NLGN1* dans des neurones d'hippocampe de rat entraîne une augmentation du nombre de synapses excitatrices, mais pas du nombre de synapses inhibitrices. A l'inverse, la surexpression de *NLGN2* cause une augmentation du nombre de synapses inhibitrices, mais pas du nombre de synapses excitatrices. [64]

Tableau 3: Gènes candidats pour les TSA jouant un rôle dans la formation ou le fonctionnement des synapses. Les critères de classification des gènes SFARI sont présentés en Annexe 1.

Gène	Fonction du gène	Fonction dans la synapse	Score SFARI
CACNA1E	Canal calcique, voltage dépendant	Transmission neuronale	2
CACNB2	Canal calcique, voltage dépendant	Transmission neuronale	2
SCN1A	Canal sodium, voltage dépendant	Excitabilité neuronale	1
SCN2A	Canal sodium, voltage dépendant	Excitabilité neuronale	1
KCNQ3	Canal potassium, voltage dépendant	Excitabilité neuronale	1
KCNQ5	Canal potassium, voltage dépendant	Excitabilité neuronale	1
NRXN1	Récepteur de surface	Adhésion cellulaire	1
NLGN3	Récepteur de surface	Adhésion cellulaire	1
NLGN4X	Récepteur de surface	Adhésion cellulaire	2
CNTNAP2	Récepteur de surface	Adhésion cellulaire	2S
CDH13	Cadhérine	Adhésion cellulaire	2
CNTN4	Immunoglobuline	Adhésion cellulaire	2
CNTN5	Immunoglobuline	Adhésion cellulaire	2
CNTN6	Immunoglobuline	Adhésion cellulaire	2
SHANK1	Echafaudage protéique	Signalisation glutamatergique	2
SHANK2	Echafaudage protéique	Signalisation glutamatergique	1
SHANK3	Echafaudage protéique	Signalisation glutamatergique	1
SYNGAP1	Activateur de Ras GTPase	Signalisation glutamatergique	1
GABRG3	Récepteur GABAergique	Transmission neuronale	2

Les protéines SHANK sont également impliquées dans l'établissement des synapses. Ainsi, des neurones dérivés d'iPSC (cellules souches pluripotentes induites) d'individus porteurs d'une mutation hétérozygote dans *SHANK2* forment un plus grand nombre de synapses excitatrices, possèdent des dendrites plus allongées et des branchements dendritiques plus complexes que les neurones dérivés d'individus contrôles.[65] Cette augmentation du nombre de synapses excitatrices pourrait perturber l'équilibre excitation/inhibition des neurones.

La perte de fonction du récepteur synaptique *Ptchd1*, qui ne régule pas la voie sonic hedgehog, conduit à une diminution du nombre de synapses excitatrices dans l'hippocampe chez la souris. De plus, l'expression de *Npas4*, un gène dont la surexpression entraîne une augmentation du nombre de synapses inhibitrices, est amplifiée dans les neurones de l'hippocampe des souris *Ptchd1*^{-/-}. [66, 67] La diminution du nombre de synapses excitatrices

ou l'augmentation du nombre de synapses inhibitrices peut, une fois encore, être responsable d'un déséquilibre du ratio excitation/inhibition des neurones.

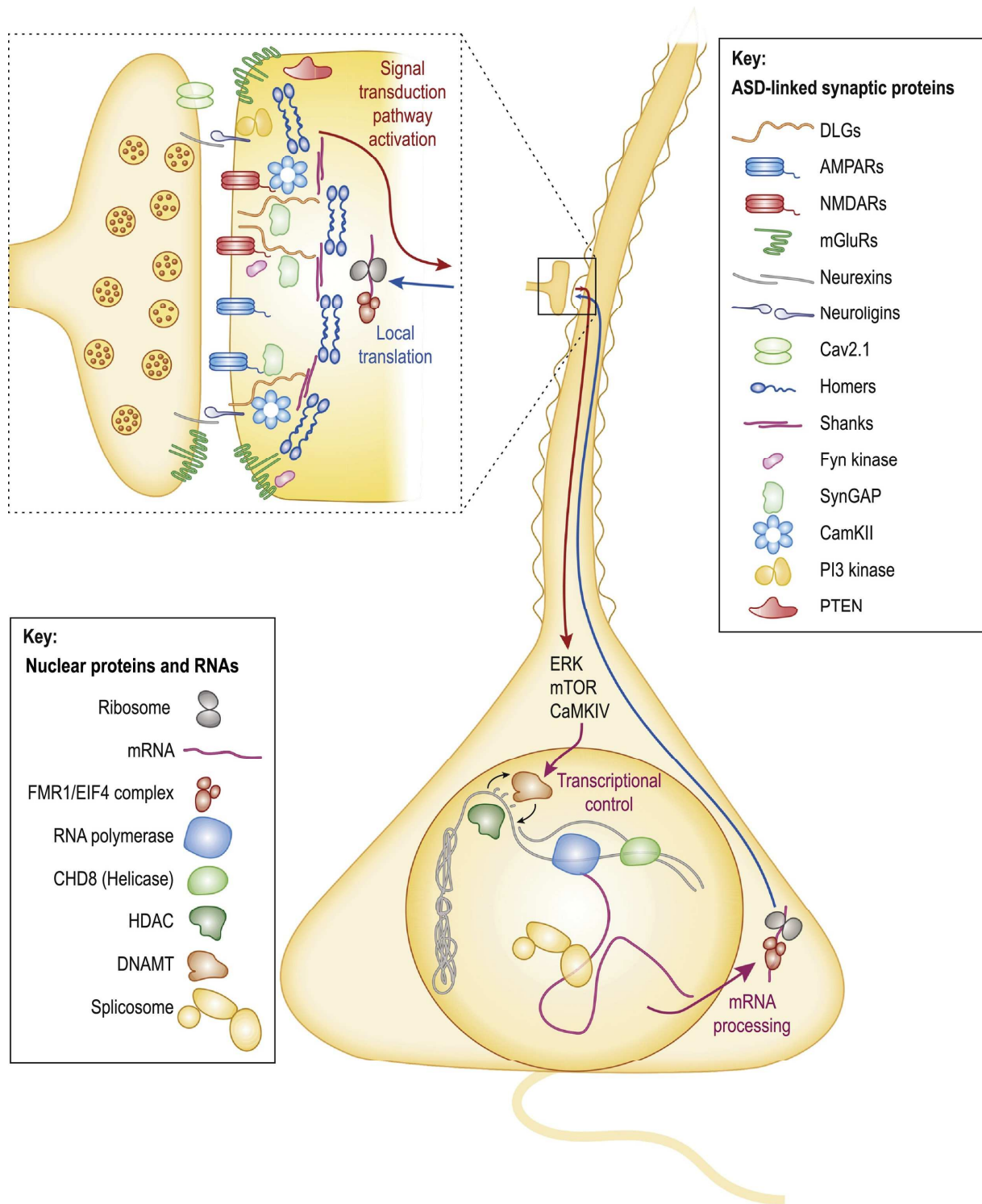


Figure 3: De nombreuses protéines synaptiques sont associées aux TSA. Ces protéines peuvent être impliquées dans l'architecture de la synapse, comme les protéines d'échafaudage SHANK, elles peuvent être des récepteurs, comme les récepteurs AMPA et NMDA, ou elles peuvent permettre la transduction du signal, comme la kinase PI3. D'après Heavner et Smith, 2020[68]

Enfin, Russo *et al.* ont montré que des protéines synaptiques sont moins exprimées dans des neurones dérivés d'iPSC d'individus atteints de TSA, par rapport à des individus contrôles. De plus, les neurones des individus atteints de TSA forment moins de synapses, sécrètent moins de glutamate et sont moins actifs *in vitro*. [69]

2. DEF AUT D'ELAGAGE OU DE MYELINISATION DES AXONES

Un retard de maturation des synapses ou une mauvaise myélinisation des axones, deux processus clés dans le renforcement du signal cortical et dans la réduction du bruit cortical, pourraient également être à l'origine de TSA, de même qu'un défaut d'élagage des axones. En effet, au cours du développement, de nombreuses synapses sont établies et sont ensuite élaguées. Un défaut dans ce mécanisme pourrait conduire à une surexcitation ou sur-inhibition des circuits corticaux. Il a d'ailleurs été observé un excès de synapses chez les patients souffrant de TSA à l'adolescence, ce qui n'est pas le cas durant l'enfance, suggérant un défaut d'élagage chez les patients.[70]

Les cellules microgliales, des cellules immunitaires résidentes qui ont la capacité d'internaliser et digérer des débris de cellules et les cellules mortes lors de réactions inflammatoires dans le cerveau, ont également pour rôle de détruire les synapses peu actives, afin de raffiner les circuits neuronaux. [71] Une suractivation de la microglie, comme celle observée dans le cervelet de jeunes adultes souffrant de TSA [72], pourrait conduire à un élagage trop important des axones. Des souris pour lesquelles l'activation de la microglie est altérée présentent en effet une plus grande densité dendritique et un plus grand nombre de synapses immatures. Ces mêmes souris présentent des troubles de la sociabilité et des comportements répétitifs.[73] Une altération de l'interaction neurones-microglie pourrait également être une cause de TSA.[74]

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales très importantes pour nourrir et protéger les neurones. Elles permettent également la myélinisation des axones dans le système nerveux central, un rôle rempli par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. Une mauvaise isolation des axones des neurones, due à un déficit en gaine de myéline, entraîne une diminution de la vitesse de l'influx nerveux. Des souris porteuses d'une mutation dans *Tcf4* - un gène dont la perte entraîne une forme syndromique de TSA associée à une déficience intellectuelle, de l'hyperventilation et des troubles gastro-intestinaux - présentent une

diminution du nombre d'oligodendrocytes matures et une augmentation du nombre de progéniteurs des oligodendrocytes. Ces altérations sont accompagnées d'une diminution de la proportion d'axones myélinisés.[75]

3. DESEQUILIBRE DU RATIO EXCITATION/INHIBITION

Les défauts de synaptogenèse ou d'élagage des axones perturbent la communication neuronale et peuvent aboutir à un déséquilibre du ratio Excitation/Inhibition du cortex. Dans le cerveau, l'équilibre entre excitation et inhibition est essentiel au bon fonctionnement des circuits neuronaux.[76, 77] L'excitation est principalement assurée par les neurones glutamatergiques tandis que l'inhibition résulte de l'activité des neurones GABAergiques. Le ratio excitation/inhibition est maintenu de manière homéostatique au niveau de chaque neurone afin de maximiser le ratio signal/bruit de fond et de permettre l'activation des différents réseaux neuronaux au moment approprié. Cet équilibre est mis en place en ajustant le nombre de synapses excitatrices et inhibitrices afférentes, et dépend de chaque neurone.[78] Plusieurs études ont également montré qu'il existait un équilibre global pour des regroupements de neurones ainsi que pour certaines zones du cerveau.[79] Un déséquilibre du ratio Excitation/Inhibition, à chacune de ces échelles, pourrait conduire à des troubles cognitifs ou psychologiques.

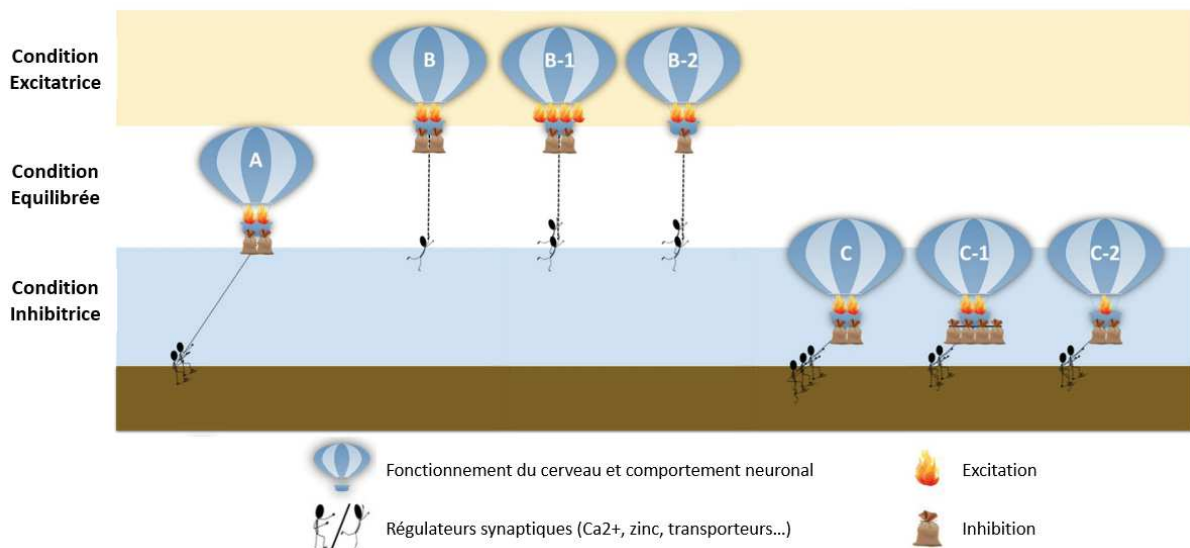


Figure 4: Déséquilibre Excitation/Inhibition dans les TSA. Le déséquilibre du ratio Excitation/Inhibition peut entraîner une surexcitation (B, B-1, B2) ou une sur-inhibition (C, C-1, C-2). Adapté de Kim et al., 2016 [80]

Certains aspects des TSA, comme les crises nerveuses subies par les patients, leur hypersensibilité sensorielle, ou encore la fréquente cooccurrence des TSA et de l'épilepsie, pourraient avoir comme explication une hyperexcitabilité du cortex cérébral.[81] Celle-ci trouverait son origine dans un déséquilibre du ratio Excitation/Inhibition, et, en particulier, dans une augmentation de l'excitation par rapport à l'inhibition, dans les systèmes sensoriels, mnésiques, émotionnels et sociaux. Ce déséquilibre pourrait conduire à une augmentation du bruit de fond par rapport au signal dans le système nerveux. Cette augmentation du ratio Excitation/Inhibition peut être causée par une augmentation des signaux excitateurs, dus à la signalisation glutamatergique, ou par une diminution de l'inhibition, due à la signalisation GABAergique. [81](Figure 4)

Ainsi, une augmentation de l'expression de *CYFIP1*, un gène associé aux TSA [82] et localisé aux densités post-synaptiques inhibitrices, entraîne une augmentation du nombre de synapses excitatrices et une diminution du nombre de synapses inhibitrices.[83] En revanche, la perte de *CYFIP1* cause une augmentation de l'inhibition synaptique en augmentant l'expression de récepteurs GABA et de la neuroligine 3.[83]

L'augmentation des signaux excitateurs peut être due à des défauts de fonctionnement des synapses glutamatergiques. Par exemple, *GRIA1* et *GRIA2*, deux gènes codant des sous-unités de récepteurs AMPA activés par le glutamate, sont associés aux TSA.[84]

La diminution de l'inhibition régulée par les neurones GABAergiques pourrait entraîner une stimulation excessive des neurones glutamatergiques [85]. Cependant, cette altération ne semble pas être due aux récepteurs GABA, bien que plusieurs d'entre eux aient été associés aux TSA.[86] [87]

C. EPIGENETIQUE DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

1. REGULATION DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE ET TSA

Des modifications épigénétiques, causées par une mutation dans un gène ou par l'environnement, peuvent également être responsables des TSA. Environ 20 % des gènes associés aux TSA sont directement impliqués dans la régulation épigénétique : ils permettent de moduler la conformation de la chromatine et de réguler l'expression de nombreux gènes sans altérer la séquence ADN. [88] Ces mécanismes sont essentiels au bon développement

des systèmes nerveux centraux et périphériques : une régulation précise de l'expression des gènes, aussi bien spatialement que temporellement, est essentielle au bon déroulement du développement des systèmes nerveux. Ces derniers sont composés de nombreux types cellulaires différents, les cellules neuronales (interneurones, cellules de Purkinje, cellules pyramidales, motoneurones...) et gliales (astrocytes, cellules de Schwann, oligodendrocytes, microglie...), ayant des fonctions très variées. La modulation de l'organisation du génome dans ces différents types cellulaires permet leur bon fonctionnement.

Dans le noyau interphasique, les chromosomes occupent des zones définies appelées territoires chromosomiques. [89] La localisation de chaque chromosome et de chaque gène dans le territoire chromosomique n'est pas due au hasard : elle est spécifique du tissu, du type cellulaire et du stade de développement, les gènes les plus actifs étant situés vers le centre du noyau tandis que les gènes inactifs sont plus proches de la membrane nucléaire. [90]

Le niveau de compaction de la chromatine influe également sur l'expression des gènes. La chromatine fortement condensée, appelée hétérochromatine est transcriptionnellement inactive. Au niveau des gènes actifs, la chromatine est décondensée : c'est l'euchromatine. L'hétérochromatine facultative regroupe les régions de la chromatine qui sont condensées mais peuvent être décondensées et activées, si nécessaire. L'état de compaction de la chromatine peut être modulé par des protéines architecturales et par des modifications post-traductionnelles des queues d'histones.

Les histones sont les composants des nucléosomes. Chaque nucléosome est constitué de deux copies de chaque histone de cœur (H2A, H2B, H3, H4) autour desquelles est enroulé le double brin d'ADN. Le nucléosome est lié à l'ADN par l'histone de liaison H1. La distance entre les nucléosomes est caractéristique des espèces et types cellulaires étudiés.[91] Certains résidus Lysine des queues des histones peuvent être acétylés ou méthylés : ces modifications jouent le rôle de marques épigénétiques et influencent le niveau de compaction de la chromatine. **(Figure 5)** Par exemple, la triméthylation de la Lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) et l'acétylation de la Lysine 9 de l'histone H3 (H3K9ac) sont des modifications caractéristiques de l'euchromatine.[92, 93] A l'inverse, la triméthylation de la Lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) et la triméthylation de la Lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me3) sont des marqueurs de l'hétérochromatine.[94, 95] Enfin, les régions d'hétérochromatine facultative sont

reconnaissables à la présence de triméthylation de la Lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3).[96]

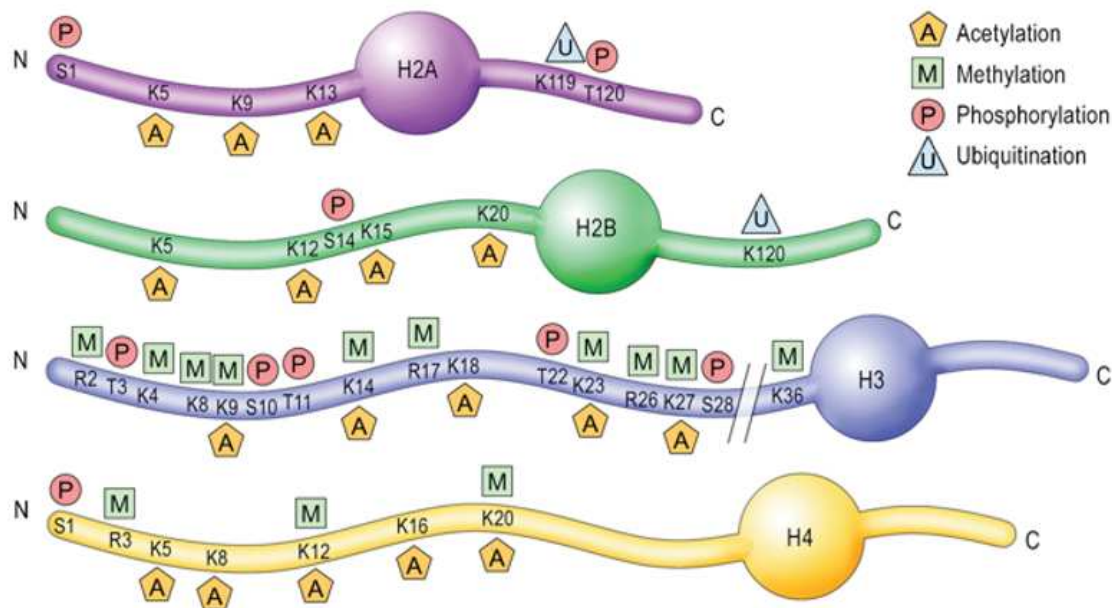


Figure 5: Modifications post-traductionnelles des histones. Adapté de Gräff et Mansuy. [97]

Plusieurs gènes impliqués dans l'ajout de modification aux queues d'histones (*ANKRD11* [98, 99], *KAT6A* [100, 101]), la reconnaissance et la liaison à la chromatine *via* ces modifications (*CHD2* [102, 103], *CHD7* [104, 105], *CTCF* [100, 106]), et l'élimination des modifications des queues d'histones (*KDM5B* [100, 107] et *HDAC4* [108, 109]) sont également des gènes responsables de TSA. Une mutation tronquante dans le gène *HIST1H1E*, codant pour l'histone de liaison H1.4, nécessaire à la liaison de l'ADN et du nucléosome, induit des TSA et une déficience intellectuelle. [88] Enfin, de nombreux gènes de la liste SPARK sont impliqués dans le remodelage de la chromatine (*ARID1B* [110, 111], *CHD8* [61, 112]).

Le niveau d'expression des gènes est également régulé par la méthylation de l'ADN sur les Cytosines des dinucléotides CpG. La méthylation du corps du gène est associée avec la répression de la transcription du gène. De même, la méthylation des îlots CpG, situés dans les promoteurs des gènes, est associée à un relâchement de la chromatine et à l'activation de la transcription. Ainsi, les régions hétérochromatiques sont globalement plus méthylées que les régions euchromatiques.

Le patron de méthylation des dinucléotides CpG n'est pas significativement altéré chez les individus atteints de TSA par rapport aux individus neurotypiques.[113] En revanche, Siu et al. ont observé que les patrons de méthylation des dinucléotides CpG chez les individus porteurs d'une mutation hétérozygote dans *CHD8* d'une part et chez les individus porteurs d'une délétion 16p11.2 d'autre part, sont caractéristiques de leurs altérations génétiques respectives. Ces observations indiquent que l'étude des patrons de méthylation permettrait ainsi de différencier les groupes d'individus atteints de TSA.[113] Cette étude suggère un possible rôle de *CHD8* et du locus 16p11.2 dans la méthylation de l'ADN, mais d'autres gènes sont plus directement liés à la méthylation du génome. Le gène *DNMT3A*, code une DNA méthyltransférase dont la fonction est d'établir la méthylation *de novo* du génome. [114] En particulier, elle est essentielle à l'établissement correct des patrons de méthylation lors du développement et joue un rôle dans l'établissement des empreintes parentales.[114] Des mutations dans *DNMT3A* entraînent des TSA ainsi que l'établissement d'un patron de méthylation aberrant.[115] Les autres DNA méthyltransférases ne sont, pour le moment, pas associées aux TSA d'après la base de données SFARI Gene.

Les deux types de marques épigénétiques, modifications des queues d'histones et méthylation des dinucléotides CpG, permettent de réguler finement le transcriptome des cellules selon le rôle qu'elles auront à jouer. Ainsi, les neurones possèdent généralement plus d'euchromatine que les cellules gliales matures, et sont le siège d'une plus grande activité transcriptionnelle que celles-ci.[116, 117] De plus, au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires en neurones, l'hétérochromatine subit de nombreux réarrangements et se compacte au fur et à mesure de l'avancée du processus de différenciation.[118, 119]

2. LES REMODELEURS DE LA CHROMATINE DEPENDANTS DE L'ATP

Les remodeleurs de la chromatine ont pour rôle de faire glisser les nucléosomes sur l'ADN, afin de changer le niveau de compaction de la chromatine. Ils peuvent également modifier la composition des octamères d'histones et changer la conformation de l'ADN nucléosomique. Ces enzymes peuvent soit altérer le contact ADN-histone dans le nucléosome, grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP, soit être le vecteur de modifications post-traductionnelles des queues d'histones.

Les remodeleurs de la chromatine sont regroupés en quatre familles : les SWI/SNF, les ISWI, les INO80 et les CHD. Ils ont pour point commun la présence d'un domaine ATPase de la famille SNF2.[120](Figure 6)

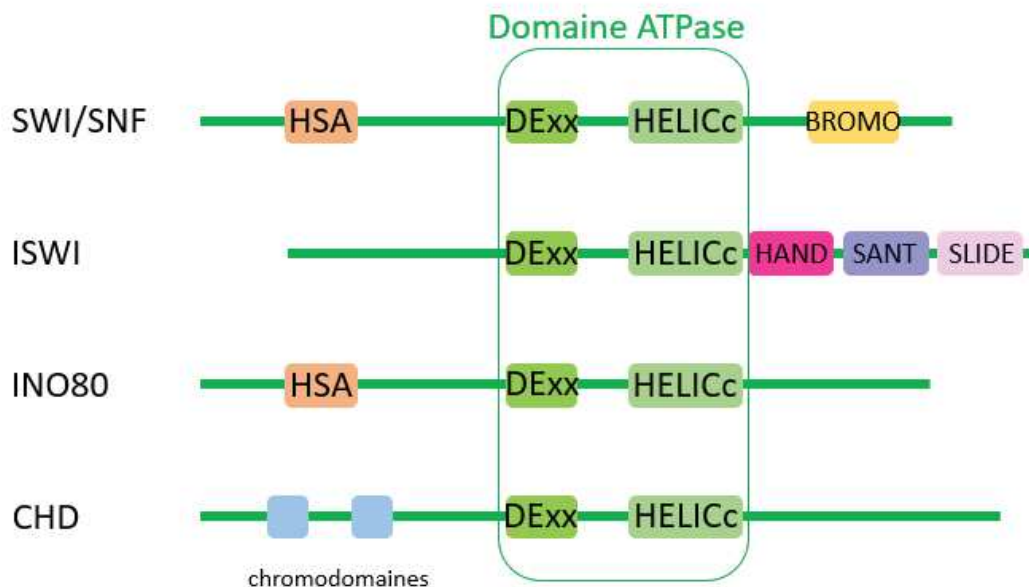


Figure 6: Les remodeleurs de la chromatine. Toutes les familles de remodeleurs de la chromatine possèdent un domaine ATPase constitué d'un domaine DExx et d'un domaine hélicase HELICc. Chaque famille possède des domaines particuliers. Le domaine HSA est impliqué dans la liaison à l'actine et aux protéines liées à l'actine. Les chromodomaines permettent la liaison à la chromatine en interagissant avec les résidus Lysine méthylés des queues d'histones. Le domaine BROMO se lie aux résidus Lysine acétylés des queues d'histones. Les domaines HAND, SANT et SLIDE permettent l'interaction avec les nucléosomes. Adapté de Tyagi et al., 2016.[120]

Les remodeleurs de la famille SWI/SNF (switch/sucrose-non-fermenting) possèdent, en plus du domaine ATPase, un domaine HSA, permettant la liaison à l'actine et aux protéines liées à l'actine, et un domaine BROMO, qui les rend capables de reconnaître les résidus Lysine acétylés des queues d'histones. Ces enzymes ont pour fonction de moduler l'activité transcriptionnelle, soit en l'activant, soit en la réprimant.[120-122]

Les protéines membres de la famille ISWI (imitation switch) jouent un rôle dans l'espacement des nucléosomes, avec lesquels elles interagissent, *via* leur domaines HAND, SANT et SLIDE. Elles participent également à la répression de la transcription et à la réparation des dommages de l'ADN.[120, 123]

La famille INO80 (inositol requiring 80), tout comme la famille SWI/SNF, possède un domaine HSA permettant la liaison à l'actine et aux protéines liées à l'actine. Elle regroupe des enzymes impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN, grâce à leur activité hélicase.[120]

La famille CHD (chromodomain helicase DNA-binding) comprend des remodeleurs de la chromatine qui utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour modifier la structure ou la position des nucléosomes. Ces enzymes possèdent, en plus du domaine ATPase, deux chromodomains contigus. Il y a 9 CHD identifiées chez l'humain, qui sont regroupées en trois sous-familles, en fonction des domaines additionnels qu'elles possèdent. [120](**Figure 7**)

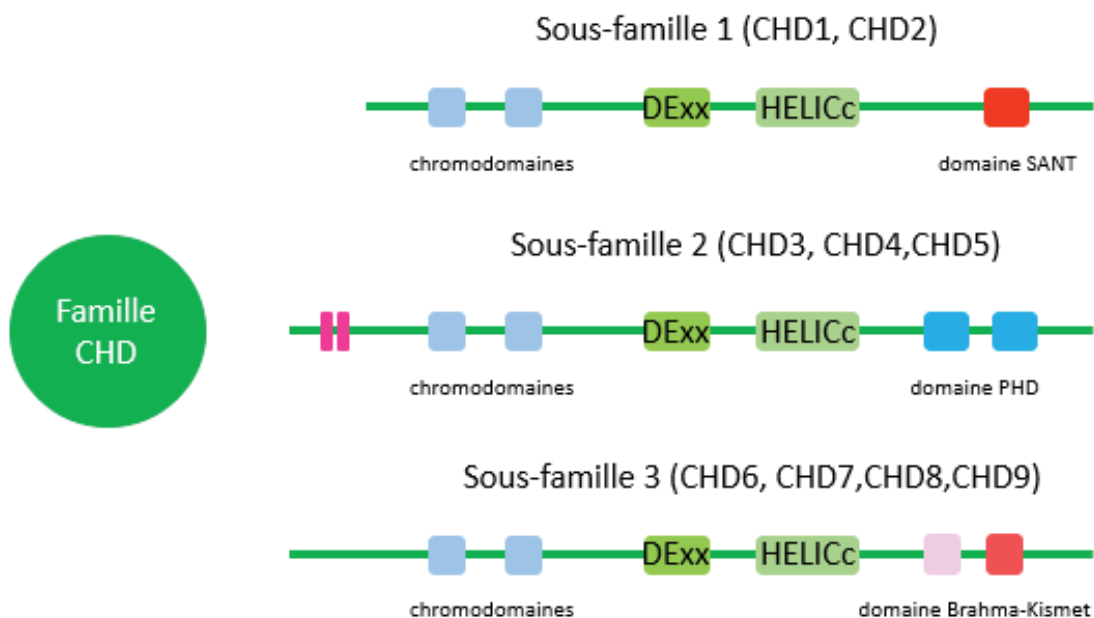


Figure 7: La famille des CHD comprend trois sous-familles, caractérisées par les domaines dans leur partie C-terminale.

Parmi les neuf CHD recensées chez l'humain, cinq sont associées aux TSA : CHD1, CHD2, CHD3, CHD7 et CHD8.

D. CHD8 : UN GENE MAJEUR DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

Découvert par Sakamoto *et al.* en 2000 [124] à l'occasion d'un criblage visant à identifier de nouvelles protéines impliquées dans la voie de signalisation WNT, CHD8 (aussi appelé Duplin) est un remodeleur de la chromatine ATP-dépendant dont le rôle est de condenser ou

décondenser la chromatine afin de réguler l'expression de nombreux gènes au cours du développement.

CHD8 est situé sur le bras long du chromosome 14 (bande cytogénétique 14q11.2). La duplication ou la délétion de cette région entraîne un TSA, associé à une macrocéphalie, des troubles gastro-intestinaux et des troubles du sommeil.

1. STRUCTURE DE CHD8

CHD8 est une protéine de 2581 acides aminés qui possède plusieurs domaines permettant sa fonction de remodeleur de la chromatine. (**Figure 8**)

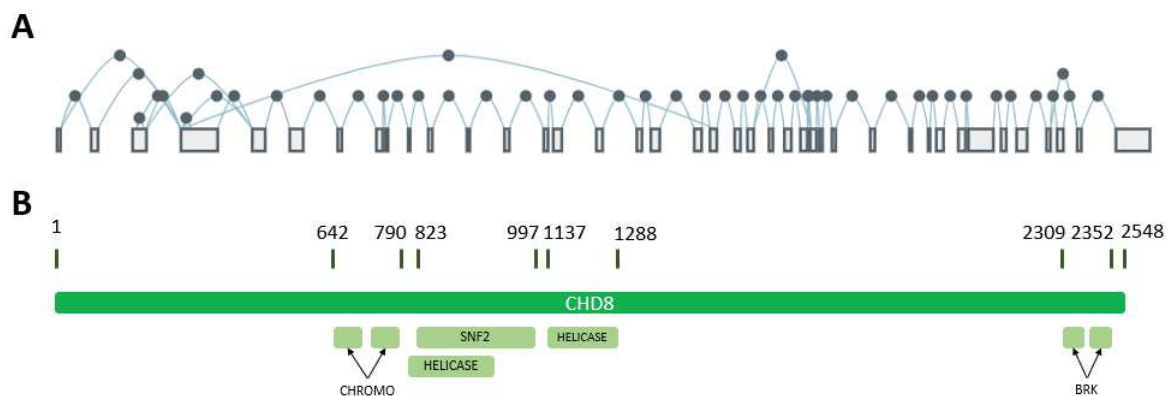


Figure 8: Structure de CHD8. A : Le gène *CHD8* possède 38 exons et code une protéine de 2548 acides aminés possédant deux chromodomains, un domaine SNF2, un domaine hélicase et deux domaines Brahma-Kismet.

Un chromodomaine, chromatin organization modifier, est un domaine de 40 à 50 acides aminés, qui est impliqué dans le remodelage et la manipulation de la chromatine. Il permet à la protéine de cibler certaines régions du noyau, en se liant à d'autres protéines ou à des acides nucléiques. Ce domaine est présent dans des protéines jouant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, la formation d'hétérochromatine, la liaison aux histones méthylées ou encore la répression transcriptionnelle induite par les ARN.[125]

Le domaine SNF2 de CHD8 lui permet d'hydrolyser l'ATP en ADP afin de libérer de l'énergie. Cette énergie permet au complexe SWI/SNF, auquel appartient CHD8, de rendre l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription, en altérant ses interactions avec les histones. Ce domaine est fréquemment retrouvé dans des protéines impliquées dans la régulation de la

transcription, la réparation et la recombinaison de l'ADN, ainsi que dans la décompaction de la chromatine. [126]

CHD8 possède également un domaine hélicase, composé de deux sous-domaines : un domaine DEAD et un domaine C-terminal. Les hélicases peuvent ouvrir les acides nucléiques double-brin, qu'ils soient ADN ou ARN. Afin d'y parvenir, elles sont capables de se déplacer sur la chromatine et de déplacer les protéines qui y sont liées.[127]

Le rôle des deux domaines BRK (Brahma and Kismet domain), situés dans la région C-terminale de CHD8, est encore inconnu. Cependant, ils sont souvent associés à des hélicases ou à des facteurs de transcription et ils sont impliqués dans plusieurs complexes SWI/SNF.[128]

2. ROLE DE CHD8 DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

CHD8 régule l'expression de nombreux gènes, par différents moyens : en remodelant la chromatine, en agissant comme un facteur de transcription, en modifiant l'épissage des ARN messagers ou encore en agissant, *via* des interactions protéiques, sur des voies de signalisation.

CHD8 est capable de remodeler la chromatine grâce à son activité ATPase, stimulée par l'ADN lié au nucléosome. Cette activité est dépendante du domaine hélicase SNF2 et permet de déplacer les nucléosomes sur la chromatine. [129] La liaison de CHD8 à l'histone H1 pourrait également jouer un rôle dans le déplacement des nucléosomes.[130] CHD8 fait ainsi partie de plusieurs complexes modificateurs de la chromatine : le complexe MLL1, à travers son interaction avec WDR5 [129], le complexe CoREST, le complexe SWI/SNF et le complexe NuRD.[129]

CHD8 possède également une action de facteur de transcription. En effet, il est retrouvé au niveau du site d'initiation de la transcription de gènes actifs et dans des régions activatrices de la transcription.[131, 132] De plus, CHD8 interagit avec CTCF et se lie à plusieurs de ses sites cibles. CTCF est impliqué dans la répression et l'activation de la transcription, mais également dans l'isolation de régions du génome.[112] Cette interaction avec CTCF permet à CHD8 de jouer un rôle dans la méthylation des îlots CpG et la modification post-traductionnelle des queues d'histones, en particulier leur acétylation.[112] Enfin, CHD8 est

capable de se lier aux di- et triméthylations de la Lysine 4 de l'histone H3 et est retrouvé au niveau des promoteurs U6 de l'ARN polymérase III.

CHD8 est également en complexe avec certaines petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP) : les snRNP U2 et U5.[129] Ces deux snRNP font partie du spliceosome et sont donc nécessaires au bon épissage des ARN messagers. Cette interaction entre CHD8 et le spliceosome pourrait permettre à CHD8 de moduler l'équilibre entre les isoformes de certains gènes. Par exemple, la perte de *CHD8* entraîne un épissage alternatif sur les gènes *TSEN15*, impliqué dans l'hypoplasie ponto-cérébelleuse, et *ACTR3*. [133]

Enfin, CHD8 est capable d'agir directement sur certaines voies de signalisation, comme, par exemple, la voie WNT/ β -caténine, à travers des interactions protéine-protéine. La voie WNT est une voie de signalisation qui permet de réguler simultanément de nombreux processus biologiques, durant toute la vie d'un organisme. La liaison d'un ligand WNT sur le récepteur Frizzled peut entraîner l'activation de la voie canonique, la voie WNT/ β -caténine, ou l'activation de voies non canoniques : la voie WNT/PCP (Planar Cell Polarity, ou Polarité Cellulaire Planaire) ou la signalisation calcique. L'équilibre entre le niveau d'activation de ces différentes voies dépend en partie du ligand WNT qui se lie à Frizzled.

Après avoir été transloqué dans le noyau, grâce à son interaction avec l'importin- α , CHD8 est capable de se lier directement à la β -caténine, via les répétitions armadillo [124, 129, 134] présentes dans sa région C-terminale. Cette liaison prévient la fixation de TCF4 à la β -caténine et la transcription de gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine. [124] En parallèle, CHD8 peut se lier à la région promotrice proximale de gènes cibles de la β -caténine pour réprimer leur transcription.[129]

Cependant, selon les tissus et organismes étudiés, CHD8 peut jouer le rôle d'activateur ou de répresseur de la voie Wnt/ β -caténine. En effet, si la perte de CHD8 entraîne une activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules COS (cellules dérivées de cellules rénales de singe) et chez la drosophile, *Chd8* est un activateur de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules neuronales, *in vivo* et *in vitro*. De plus, les phénotypes comportementaux dus à la diminution de l'expression de *Chd8* chez la souris, peuvent être sauvés grâce à une surexpression de la β -caténine.[132] Néanmoins, la délétion de *Chd8* chez l'embryon murin n'entraîne pas une

augmentation de l'expression des gènes effecteurs de la voie Wnt- β -caténine, suggérant que CHD8 joue un rôle dans d'autres voies de signalisation.[135]

Par exemple, des travaux conduits sur la drosophile ont montré que *kismet*, l'orthologue de CHD8 et de CHD7, est capable de réprimer la voie Sonic Hedgehog dans certaines cellules de l'aile de la drosophile.[136] De plus, la diminution de l'expression de CHD8 chez *Xenopus tropicalis* entraîne l'expression ectopique de *sonic hedgehog* ainsi que la surexpression de *Pax2*, un des gènes-cibles de la voie Sonic Hedgehog. [136]

Chd8 est fortement exprimé au début du développement puis son expression diminue, jusqu'à la naissance. Après la naissance, *Chd8* est exprimé faiblement dans certains organes, tels que le cerveau, le tube digestif ou les organes reproducteurs.[135](GTEx)

3. CHD8, GENE MAJEUR DES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

CHD8 (MIM 610528) est un gène majeur des TSA. En effet, des mutations tronquantes dans CHD8 et des variations du nombre de copies (CNV) de la région 14q11.2 ont été retrouvées, de manière répétée, chez des patients atteints de TSA.[61, 102, 137, 138] Les individus porteurs d'une telle mutation présentent des TSA (87 % des cas) associé à une macrocéphalie (80% des cas), des troubles gastro-intestinaux (80 % des cas) et des troubles du sommeil (67 % des cas).[137] Ils peuvent également présenter un retard de développement et une déficience intellectuelle.[138]

Lors d'une étude réalisée par Bernier *et al.* en 2014, un séquençage complet de CHD8 a été réalisé dans une cohorte d'individus atteints de TSA (6176 individus) et dans une cohorte d'individus contrôles (8792 individus), issues de la Simons Simplex Collection. Aucune mutation de CHD8 n'a été retrouvée chez les individus contrôles, tandis que 20 mutations tronquantes ont été identifiées parmi les individus atteints de TSA, ce qui correspond à une prévalence d'environ 0,33 %.[137]

Les mutations de CHD8 menant à des TSA sont retrouvées sur toute la longueur du gène et affectent tous les domaines de la protéine.[61, 137] La plupart de ces mutations apparaissent *de novo* chez l'individu atteint, mais pour certains patients, la mutation est héritée, du côté paternel ou maternel.[137]

En tant que remodelleur de la chromatine, *CHD8* est impliqué dans la régulation directe ou indirecte de l'expression de nombreux gènes. Plusieurs de ces gènes sont recensés dans la base de données SFARI comme de bons candidats pour les TSA. [139] *CHD8* régule également l'expression de gènes impliqués dans les synapses et de gènes codant des sous-unités de canaux ioniques. [131]

4. ROLE DE *CHD8* DANS LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE

Du fait de son rôle majeur dans les TSA, la fonction de *CHD8* a été étudiée en utilisant plusieurs modèles animaux différents, en particulier, le modèle murin et le poisson-zèbre.

Tableau 4: Conservation de *CHD8* dans les principaux modèles animaux.

Espèce	Nom du gène	Couverture	Homologie
<i>Mus musculus</i>	<i>Chd8</i>	100 %	96,13 %
<i>Danio rerio</i>	<i>chd8</i>	94 %	62,14 %
<i>Xenopus tropicalis</i>	<i>CHD8</i>	86 %	75,84 %
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>kismet</i>	54 %	49,20 %

5. ETUDE DE *Chd8* CHEZ LA SOURIS

De nombreux modèles murins ont été créés afin d'étudier le rôle de *Chd8* dans les TSA. La délétion homozygote de *Chd8* chez la souris entraîne un arrêt du développement au moment de la gastrulation.[135] Cependant, la mutation hétérozygote de *Chd8* est viable et permet d'observer les conséquences d'une diminution de l'expression de *Chd8* sur le comportement, la taille de la tête et le fonctionnement intestinal chez la souris.

La délétion hétérozygote de *Chd8* entraîne une augmentation du volume cérébral [131, 140, 141] et un raccourcissement de la longueur de l'intestin, accompagné d'un ralentissement du transit intestinal.[131] Les souris *Chd8*^{+/-} sont également plus anxieuses que les souris sauvages.[131, 132, 141] Certains modèles murins présentent des troubles sociaux compatibles avec les TSA : le nombre de contacts sociaux diminue mais leur durée augmente.[131, 132, 141] Cependant, certaines études n'observent pas de troubles du comportement qui pourraient être associés aux TSA.[140]

L'augmentation du volume cérébral chez les individus *Chd8*^{+/-} semble due à une hyperprolifération des progéniteurs neuronaux. En effet, une prolifération accrue des progéniteurs neuronaux est observée avant la naissance chez des souriceaux hétérozygotes.[140] De plus, la réduction de l'expression de *Chd8 in utero*, grâce à l'utilisation de petits ARN anti-sens, entraîne une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux corticaux.[132] Cet effet de *Chd8* sur la prolifération des progéniteurs neuronaux semble lié à l'action de la voie Wnt/ β -caténine dans ces mêmes cellules. En effet, une diminution de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine est observée dans les progéniteurs neuronaux des individus *Chd8*^{+/-} et les troubles du comportement observés chez ces individus sont sauvés par une surexpression de la β -caténine. [132]

La différenciation des neurones est également altérée lorsque l'expression de *Chd8* diminue. Ainsi, la diminution de l'expression de *Chd8* entraîne une diminution de la croissance des axones et des dendrites et un défaut de projection des axones.[142] De plus, l'arborisation dendritique des neurones est moins complexe que chez les individus sauvages. [132]

La migration des progéniteurs neuronaux est également retardée chez les embryons de souris pour lesquels l'expression de *Chd8* a été diminuée.[142]

Le rôle de *Chd8* ne se limite pas aux progéniteurs neuronaux. En effet, les troubles comportementaux et la macrocéphalie observés chez les souris *Chd8*^{+/-} sont également dus à des altérations du fonctionnement des oligodendrocytes. L'ablation conditionnelle de *Chd8* dans les oligodendrocytes entraîne un défaut de myélinisation des axones, dû à un défaut de génération, de prolifération et de différenciation des progéniteurs des oligodendrocytes.[143]

Les phénotypes comportementaux des souris *Chd8*^{+/-} ont été mis en relation avec un retard du développement neural durant les stades fœtaux précoces.[131] *Chd8* interagit physiquement avec REST, le maître régulateur du développement neuronal. Une diminution de l'expression de *Chd8* entraîne une augmentation de l'expression de REST, ce qui cause une diminution de l'expression des gènes cibles de REST.[131] Le complexe que REST forme avec ses corépresseurs prévient la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones matures. [144] La diminution de l'expression de *Chd8* pourrait donc empêcher la différenciation des neurones.

6. ETUDE DE *CHD8* DANS LE MODELE POISSON-ZEBRE

Les modèles murins ont permis d'établir le lien entre les mutations dans *Chd8* et les TSA associés à une macrocéphalie. Cependant, les troubles gastro-intestinaux observés chez les individus porteurs d'une mutation dans *CHD8* ont été peu explorés. Récemment, plusieurs études ont utilisé le modèle poisson-zèbre pour comprendre la cause de ces troubles.

Chez le poisson-zèbre, la diminution de l'expression de *chd8*, grâce à l'utilisation de morpholino, entraîne, tout comme chez la souris, une augmentation de la taille de la tête.[137, 139] Cette macrocéphalie est due à une augmentation de la prolifération cellulaire dans le cerveau, entraînant une augmentation du nombre de neurones post-mitotiques au niveau du cerveau antérieur.

La diminution de l'expression de *chd8* entraîne également un ralentissement du transit intestinal chez les larves de poisson-zèbre. Cette altération de la fonction intestinale est liée à une diminution du nombre de neurones entériques chez les larves pour lesquelles l'expression de *chd8* a été diminuée.[137]

En revanche, ces modèles aquatiques invalidés pour le gène *chd8* n'ont pas encore été soumis à des tests de comportement (par exemple : tests de sociabilité, agressivité, anxiété, activité).

III. DEVELOPPEMENT DU TUBE DIGESTIF ET DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE

A. ORGANISATION DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE ET DU TUBE DIGESTIF

Le Système Nerveux Entérique est un système nerveux autonome qui fonctionne de concert avec le Système Nerveux Central. Son rôle est de réguler le fonctionnement du tube digestif, en agissant sur l'activité motrice et sécrétrice de ce dernier.

Chez l'humain, le Système Nerveux Entérique est organisé en deux plexus concentriques. Le plexus myentérique est inséré entre la couche musculaire longitudinale et la couche musculaire circulaire et relie les ganglions myentériques. Le plexus sous-muqueux est, lui, enchâssé dans la couche sous muqueuse et relie les ganglions sous-muqueux. **(Figure 9)**

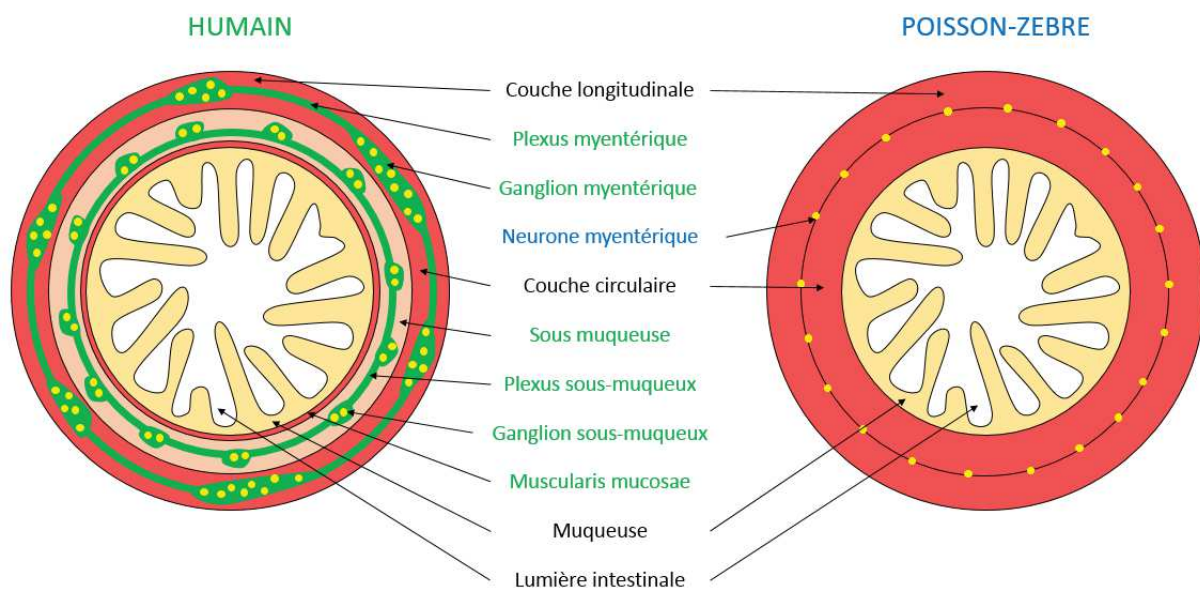


Figure 9 : L'organisation du tube digestif et du Système Nerveux Entérique est globalement conservée entre l'humain et le poisson-zèbre. Sur la gauche, le tube digestif humain est formé de deux couches musculaires, enchâssant les plexus et ganglions myentériques. Les plexus et ganglions sous-muqueux sont insérés dans la couche sous-muqueuse, constituée de tissu conjonctif. Sur la droite, le tube digestif du poisson-zèbre est également formé de deux couches musculaires entre lesquelles sont disposés de manière isolée les neurones entériques. Il n'existe ni couche sous-muqueuse, ni neurones sous-muqueux.

L'organisation du tube digestif et du système nerveux entérique est conservée, bien que simplifiée chez le poisson-zèbre, par rapport à l'humain. **(Figure 9)** Le Système Nerveux Entérique est composé d'une couche de neurones myentériques située entre les couches

musculaires longitudinale et circulaire. En revanche, il n'est pas organisé en plexus, comme chez l'humain.

La composition de la muqueuse intestinale est également conservée entre l'humain et le poisson zèbre. (Figure 10)

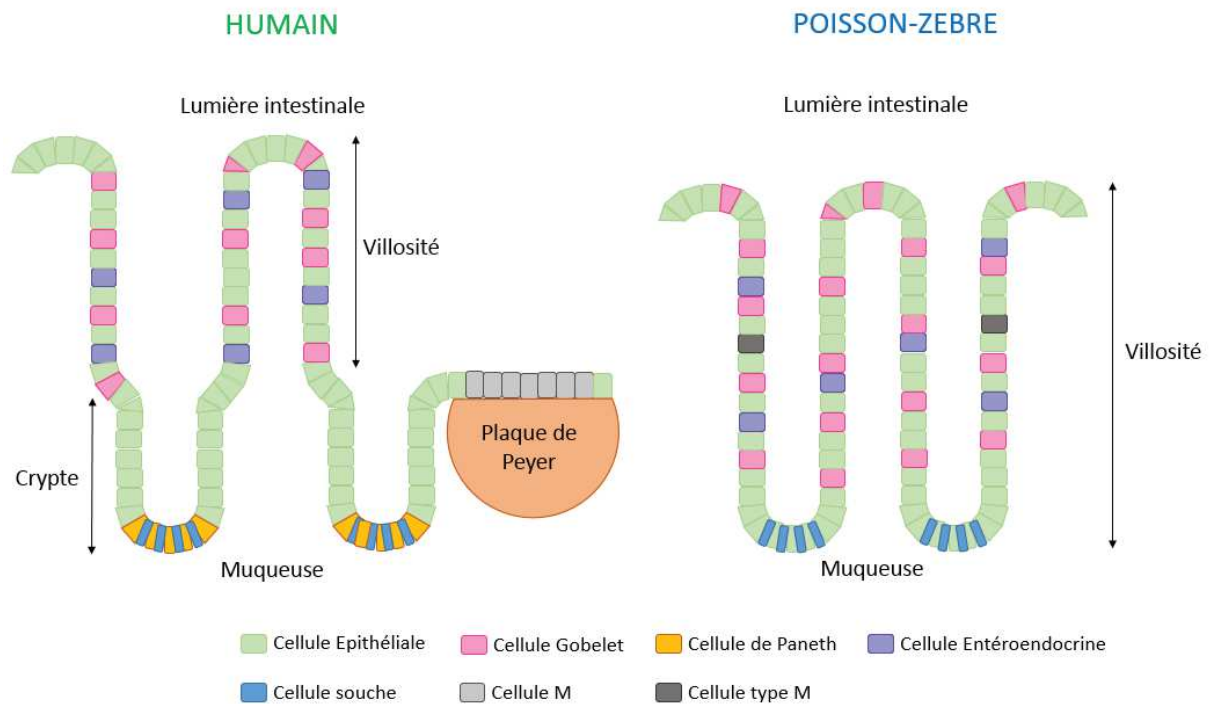


Figure 10 : L'organisation de l'épithélium intestinal est globalement conservée entre l'humain et le poisson-zèbre. Adapté de Brugman, 2016 [145]

Les cellules souches de l'intestin sont à l'origine de tous les types cellulaires composant l'épithélium intestinal, et permettent son renouvellement continu.[146]

Les cellules épithéliales, ou entérocytes, sont les cellules les plus représentées de l'épithélium intestinal. Elles permettent l'absorption de l'eau, des nutriments et des électrolytes présents dans la lumière intestinale.[146]

Les cellules gobelet, aussi appelées cellules caliciformes, ont pour rôle la fabrication du mucus qui protège et lubrifie l'épithélium intestinal.[146]

Les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones et des peptides gastro-intestinaux et les libèrent dans la circulation sanguine, les diffusent dans la lumière intestinale ou les transmettent au système nerveux entérique. Les cellules entéroendocrines sont classées en

fonction de la combinaison d’hormones et de peptides qu’elles sécrètent. (**Tableau 5**) Les cellules entérochromaffines sécrètent de la sérotonine, tout comme les cellules de type L, K et I.[146, 147]

Tableau 5: Les différents types de cellules entéroendocrines. D’après Latorre et al., 2015[147]

Type cellulaire	Localisation	Molécules sécrétées
Cellules A	Estomac	Ghréline
Cellules EC	Estomac, intestin grêle et gros intestin	Sérotonine
Cellules L	Intestin grêle distal, colon	GLP-1, GLP-2, PYY, Sérotonine
Cellules K	Intestin grêle proximal	GIP, Sérotonine
Cellules I	Intestin grêle proximal	CCK, Sérotonine
Cellules D	Estomac, intestin grêle	Somatostatine
Cellules G	Estomac, duodénum	Gastrine

Les cellules de Paneth sont situées dans les cryptes et entourent les cellules souches. Elles protègent la muqueuse intestinale en sécrétant des peptides antimicrobiens et régulent l’interaction de l’intestin avec son microbiote. [146]

Les plaques de Peyer sont les sites d’induction de la réponse immunitaire dans l’intestin. Elles sont composées de regroupements de follicules lymphoïdes, majoritairement composés de lymphocytes T et de lymphocytes B. Elles sont séparées de la lumière intestinale par les **cellules M** (Microfold cells) et peuvent capturer les antigènes et les présenter aux cellules dendritiques. [148]

Il existe quelques différences d’organisation et de composition de la muqueuse intestinale entre l’humain et le poisson-zèbre. Chez l’humain, la production des cellules de l’épithélium intestinal par les cellules souches a lieu au niveau des cryptes intestinales, qui sont absentes chez le poisson-zèbre. De plus, le poisson-zèbre ne possède pas de cellules de Paneth, qui se trouvent dans les cryptes et entourent les cellules souches. Enfin, le poisson-zèbre ne possède pas de plaques de Peyer, ni de cellules M. En revanche, des cellules vacuolisées, pouvant tenir le rôle des cellules M, ont été observées chez le poisson-zèbre.[145]

Bien que le Système Nerveux Entérique et le tube digestif soient intimement liés par leur fonction, leurs développements sont indépendants.

B. DEVELOPPEMENT DU TUBE DIGESTIF

Après la fécondation, trois grandes étapes sont essentielles au développement d'un organisme pluricellulaire. Durant la segmentation, l'embryon est le siège d'une activité mitotique intense, dont la finalité est l'augmentation du nombre de cellules de l'embryon, sans augmentation de son volume. A l'issue de la segmentation, le rythme des divisions cellulaires ralentit et les cellules migrent, donnant naissance à trois feuillets : l'ectoderme (feuille externe), le mésoderme (feuille moyenne) et l'endoderme (feuille profonde). Cette étape de gastrulation est accompagnée de la neurulation : la formation du tube neural. Enfin, durant l'organogénèse, les organes se forment à partir des trois feuillets embryonnaires.

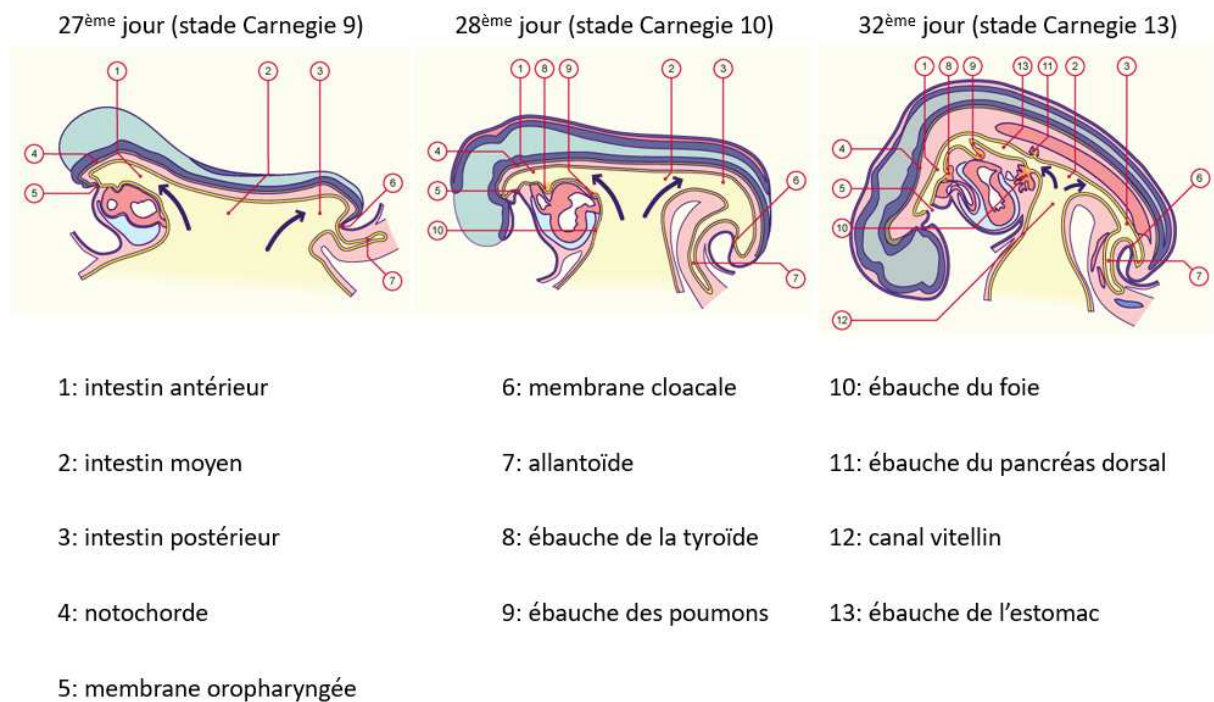


Figure 11 : Développement du tube digestif humain. Les autres stades de Carnegie sont visibles en Annexe 2.

Le tube digestif est un dérivé de l'endoderme (feuille profonde), qui donne naissance à l'épithélium intestinal (ou muqueuse), et du mésoderme (feuille moyenne), qui est à l'origine des couches musculaires. A l'issue de l'étape de gastrulation, l'embryon humain subit une plicature et deux flexions successives qui vont permettre la création d'un tube d'endoderme

aveugle à ses extrémités : l'intestin primitif. (**Figure 11**) Celui-ci est à l'origine de nombreux organes, en plus du tube digestif, tels que le pharynx, le foie, les voies biliaires et le pancréas.

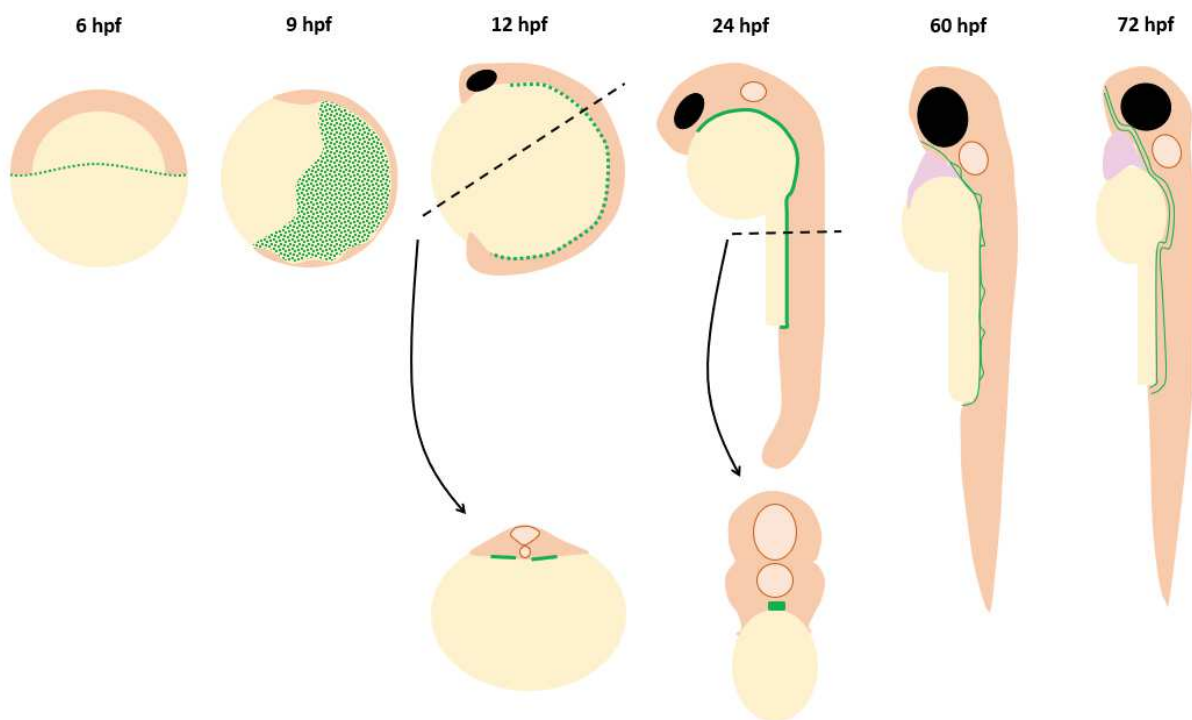


Figure 12 : Développement du tube digestif chez le poisson-zèbre. Les cellules de l'endoderme sont représentées en vert sur le schéma. A 12 hpf, les cellules de l'endoderme forment deux lignes continues sur tout l'axe antéro-postérieur de l'embryon, puis se combinent pour former un cylindre à 24 hpf. L'intestin se vacuolise progressivement à partir de 60 hpf et les lumens se rejoignent jusqu'à ce que tout l'intestin soit vacuolisé, à 72 hpf. Le développement complet du poisson-zèbre est visible en Annexe 3

Bien que l'organisation du tube digestif soit globalement conservée entre l'humain et le poisson-zèbre, il se développe de manière très différente entre les deux espèces. Chez le poisson-zèbre, l'endoderme est défini par une couche de cellules en contact avec la couche syncytiale. Au cours des premières étapes de la gastrulation, les cellules de l'endoderme migrent de manière aléatoire et recouvrent tout le sac vitellin, avant de se regrouper en deux lignes, de part et d'autre de la ligne dorsale de l'embryon. Ces deux lignes courent sur tout l'axe antéro-postérieur de l'embryon et finissent par fusionner afin de former une tige composée d'endoderme et de mésoderme. Ensuite, les cellules de l'endoderme se polarisent et forment un pseudo-épithélium, à l'intérieur duquel plusieurs lumen se forment et s'agrandissent jusqu'à se rejoindre et fusionner. [149-151] (**Figure 12**)

C. LES CELLULES DE LA CRETE NEURALE

Les Cellules de la Crête Neurale (CCN) sont une population cellulaire embryonnaire éphémère, caractéristique du groupe des vertébrés, dont le rôle lors du développement est essentiel à la formation de nombreux tissus et organes.

1. ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE

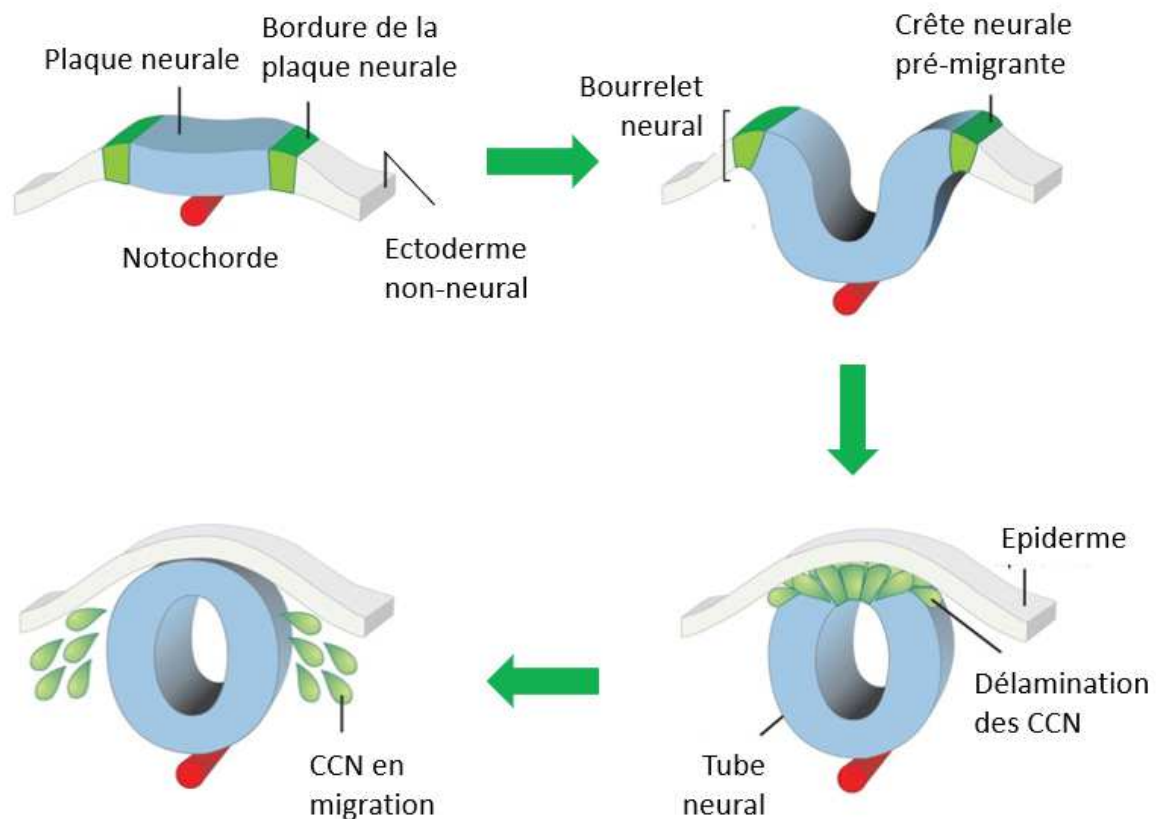


Figure 13 : La neurulation et l'induction des Cellules de la Crête Neurale chez les mammifères. La plaque neurale est une portion de l'ectoderme induite par une combinaison de signaux provenant des tissus adjacents, en particulier de la notochorde. Lorsque la plaque neurale s'invagine, les cellules situées à la bordure de la plaque neurale subissent une induction et une transition épithélium-mésenchyme qui leur permet de migrer et de coloniser de nombreux organes. Adapté de Simoes-Costa et al., 2015.[152]

Durant l'étape de neurulation, une portion de l'ectoderme est induite en plaque neurale, sous l'effet de signaux combinés des voies BMP, Wnt, Notch, et de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque, qui proviennent des cellules ectodermiques adjacentes.[153] Ces mêmes signaux vont conduire les cellules qui bordent la plaque neurale à acquérir leur identité et exprimer plusieurs facteurs de transcription, tels que *ZIC*, *PAX3*, *PAX7*, *DLX5*, *MSX1* et *MSX2*, nécessaires

à l'expression ultérieure des gènes de la Crête Neurale. [153] La plaque neurale s'invagine alors pour former le tube neural. Au niveau de la cicatrice, à la frontière entre la plaque neurale et l'ectoderme non-neural, et sur tout l'axe antéro-postérieur de l'embryon, certaines cellules subissent une transition épithélium-mésenchymateuse (TEM). [154] Ces cellules sont les Cellules de la Crête Neurale, qui forment le quatrième feuillet embryonnaire, et qui expriment des facteurs de transcription spécifiques: *SOX9*, *SOX10*, *FOXD3*, *SLUG/SNAIL*, *AP-2* et *C-MYC*. [152] Ces facteurs de transcription permettent aux Cellules de la Crête Neurale d'acquérir leurs propriétés en activant certains gènes. Ainsi, *SNAIL2* régule l'expression de protéines d'adhésion, telles que la cadhérine 6B, dont la répression est nécessaire à la migration des Cellules de la Crête Neurale et influence leur morphologie.[155] *FOXD3*, quant à lui, est indispensable au maintien des capacités de prolifération et de multipotence des Cellules de la Crête Neurale.[156](Figure 13)

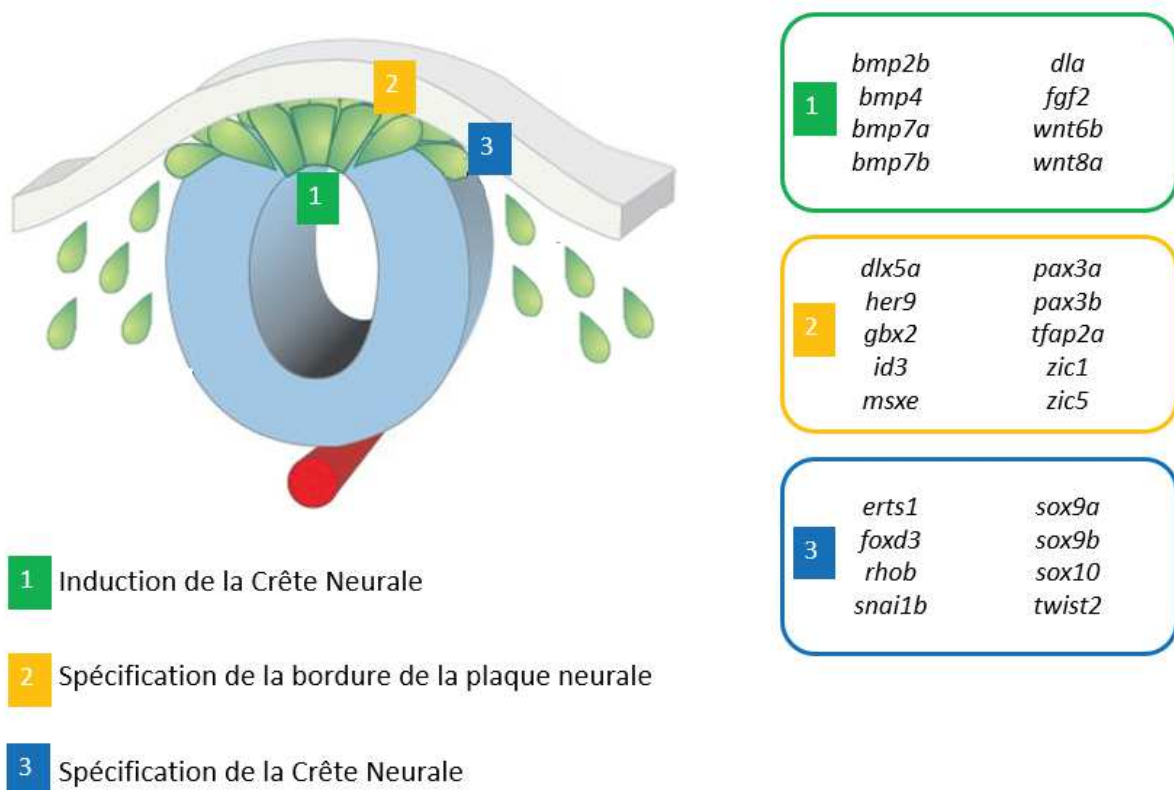


Figure 14 : Induction et spécification des Cellules de la Crête Neurale chez le poisson-zèbre. L'induction de la Crête Neurale se fait sous l'influence de voies de signalisation, en particulier la voie *bmp*, la voie *fgf* et la voie *wnt*. La bordure de la plaque neurale, où siègent les futures Cellules de la Crête Neurale, est spécifiée par une combinaison de facteurs de transcription dont *pax3a/b* ou *msxe*. La spécification de la Crête Neurale dépend de

l'expression des facteurs de transcription *foxd3*, *snai1b*, *sox9* et *sox10*. Adapté de Simoes-Costa et al., 2015 et Kratochwil et al., 2015.[152, 157]

Enfin, *SOX9* et *SOX10* participent à la régulation de la différenciation des Cellules de la Crête Neurale en activant les gènes spécifiques de leurs différents dérivés. [1](Figure 15)

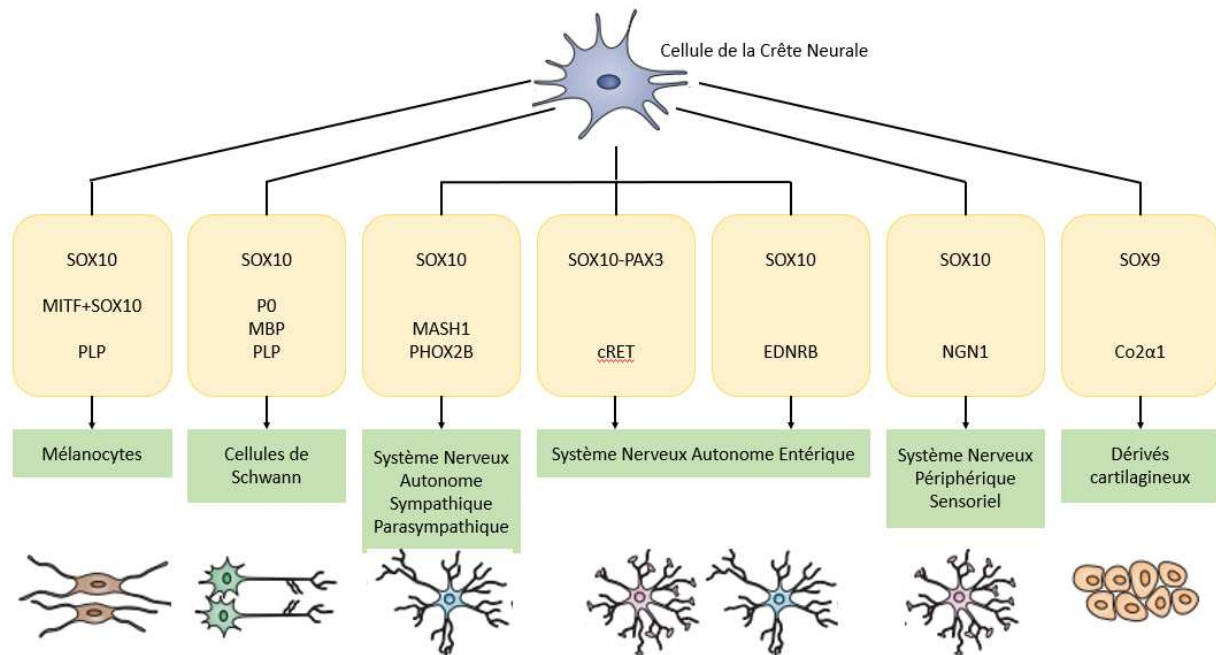


Figure 15: Les dérivés cellulaires des Cellules de la Crête Neurale. Les CCN peuvent donner naissance à de nombreux dérivés cellulaires, en fonction des combinaisons des facteurs de transcription qu'elles expriment. Adapté de Sauka-Spengler et Bronner-Fraser, 2008.[1]

Les Cellules de la Crête Neurale représentent une population cellulaire éphémère et multipotente : après migration et différenciation, elles donneront naissance à de nombreux types cellulaires différents et participeront à la création de nombreux organes. (Figure 15)

2. LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES DE LA CRETE NEURALE

Quatre populations de Cellules de la Crête Neurale sont définies en fonction du niveau auquel elles apparaissent sur l'axe antéro-postérieur de l'embryon.[158] (Figure 17) Ces populations migrent selon des trajets bien définis, expriment des combinaisons de gènes caractéristiques et donnent naissance à différents dérivés cellulaires, qui peuvent être de type ectodermique ou mésodermique.

La mise en évidence de ces différentes populations a été possible grâce aux expériences de transplantation de Nicole Le Douarin. Des portions du tube neural furent prélevées sur des

embryons de poulet, avant l'induction de la Crête Neurale et remplacées par la même portion du tube neural, au même stade de développement, mais provenant d'embryons de caille. Le devenir des cellules greffées pouvait alors être déterminé grâce à une particularité des cellules de caille : elles possèdent un nucléole très large. Les cellules greffées ont pu, par la suite, être suivies grâce à des anticorps anti-QCPN, qui reconnaissent un antigène périnucléaire, spécifiquement sur les cellules de caille.[158] (**Figure 16**)

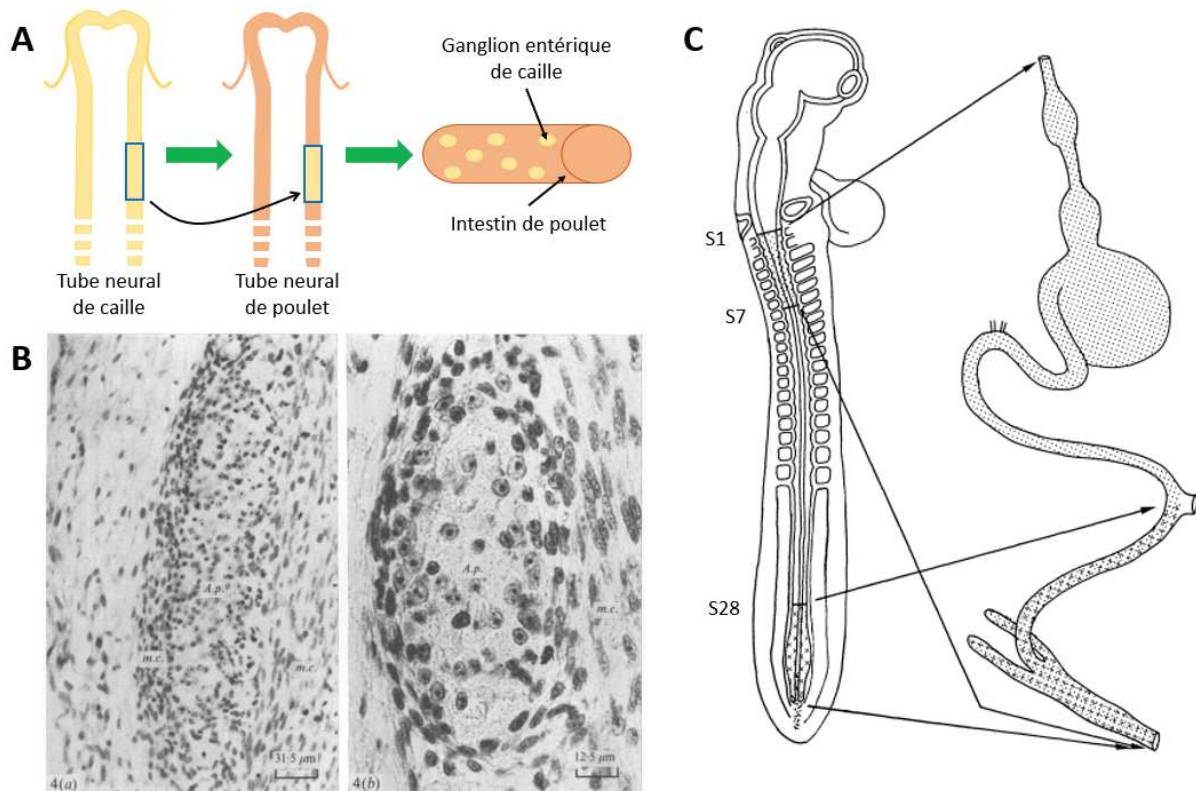


Figure 16: Expérience de transplantation caille-poulet. A : Procédé expérimental. Une portion de tube neural de caille est prélevée et greffée à un embryon de poulet, au même stade de développement. B : Les cellules de caille peuvent être distinguées des cellules de poulet grâce à l'aspect de leur noyau, qui possède un nucléole très large. C : La majorité des neurones entériques dérivent des CCN originaires de la portion du tube neural localisé au niveau des somites 1 à 7. Les CCN issues du tube neural localisé postérieurement au somite 28 donnent naissance à une partie des neurones entériques, situés dans le tube digestif post-ombilical. Adapté de Le Douarin et Teillet, 1973. [159]

Les Cellules de la Crête Neurale céphalique apparaissent entre le prosencéphale et le rhombencéphale. Elles participent à la formation des os et des cartilages de la face et du cou, mais aussi à la formation des tendons, muscles et tissus connectifs des oreilles, des yeux, des dents et des vaisseaux sanguins. Elles forment également des cellules pigmentaires (comme les mélanocytes), et une grande partie du système nerveux périphérique de la tête. Elles sont

très importantes pour la bonne croissance du cerveau ainsi que sa formation. [160, 161] **(Figure 17)**

Les Cellules de la Crête Neurale vagale apparaissent au niveau des somites 1 à 7 et peuvent être divisées en deux sous-populations : **les Cellules de la Crête Neurale cardiaque**, qui apparaissent au niveau des somites 1 à 3 et sont indispensables à la formation du septum cardiaque, et les **Cellules de la Crête Neurale entérique**, originaires du tube neural au niveau des somites 4 à 6. Les Cellules de la Crête Neurale vagale sont les progéniteurs des cellules de muscle lisse - participant à la formation du cœur, des artères et des arches pharyngées - mais également des mélanocytes et du système nerveux entérique de l'estomac et de l'intestin antérieur. Les cellules qui apparaissent au niveau du somite 7 participent également à la formation des ganglions de la racine dorsale.[159, 162] **(Figure 17)**

Les Cellules de la Crête Neurale du tronc proviennent des régions du tube neural situées entre les somites 8 et 27. Ces cellules participent à la formation du système nerveux périphérique. En effet, elles ont pour dérivés les neurones et cellules gliales de la racine dorsale et des ganglions sympathiques, mais aussi les cellules de Schwann associées aux racines ventrales. Tout comme les Cellules de la Crête Neurale céphalique et vagale, elles sont à l'origine de cellules pigmentaires. Enfin, elles donnent naissance aux cellules chromaffines adrénérgiques de la médullosurrénale.[158] **(Figure 17)**

Les Cellules de la Crête Neurale sacrée sont originaires des régions du tube neural postérieures au somite 28. Elles n'ont été décrites que chez les amniotes et participent à l'établissement du Système Nerveux Entérique. En particulier, elles sont à l'origine des ganglions entériques présents dans la partie distale de l'intestin. [159]**(Figure 17)**

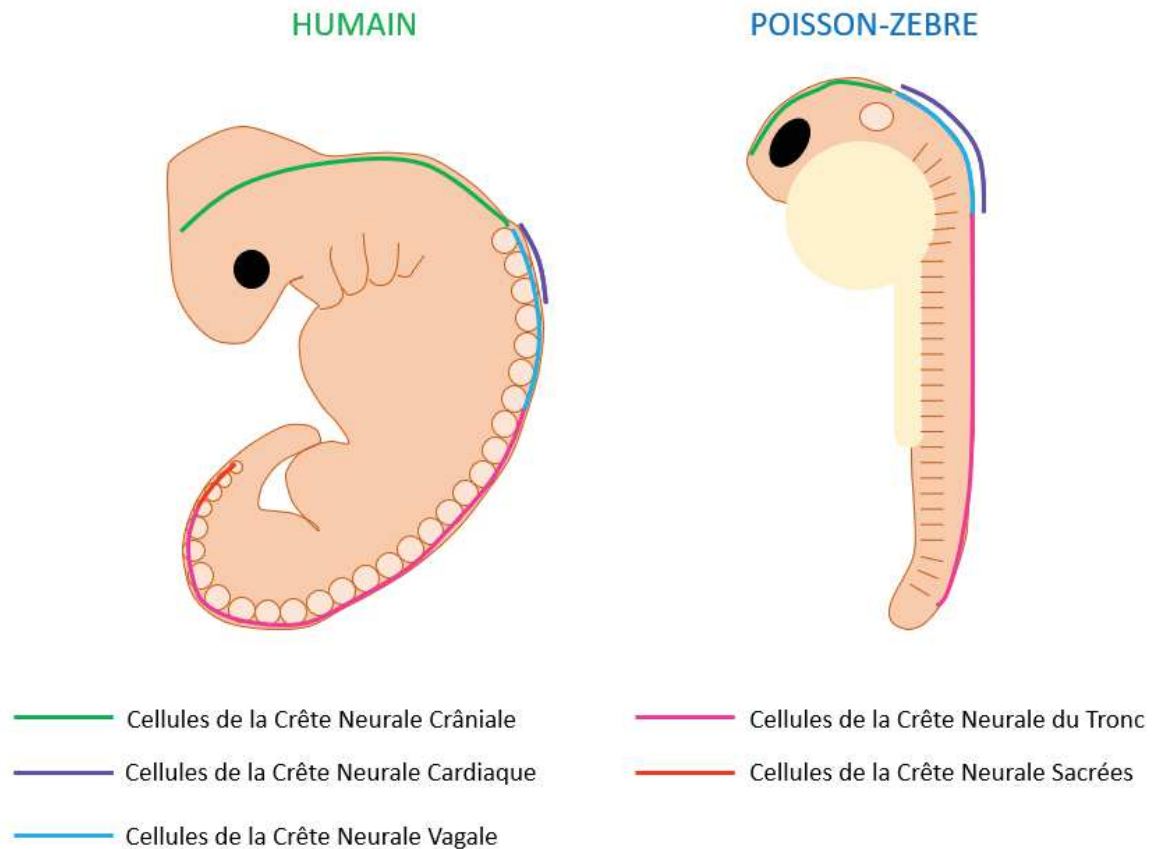


Figure 17: Régionalisation de la Crête Neurale chez l'humain et le poisson-zèbre. Le devenir des CCN dépend de la localisation de la portion du tube neural dont elles sont originaires. La différence majeure entre l'humain et le poisson-zèbre est l'absence de CCN Sacrées chez le poisson-zèbre (en orange).

3. LES CELLULES DE LA CRETE NEURALE CHEZ LE POISSON-ZEBRE

Comme tous les vertébrés, le poisson-zèbre possède un tube neural et des Cellules de la Crête Neurale. Cependant, le mécanisme de formation du tube neural ainsi que la régionalisation de celui-ci présentent des différences entre le poisson-zèbre et les mammifères.

Contrairement aux mécanismes mis en œuvre chez les mammifères, la neurulation ne résulte pas de l'invagination de la plaque neurale mais d'un mécanisme dit de « neurulation secondaire ». Une fois la gastrulation achevée, l'ectoderme situé immédiatement au-dessus de la notochorde, et ne contenant que des progéniteurs neuronaux, s'épaissit. Des deux côtés de cette plaque neurale, une partie de l'ectoderme, comprenant des progéniteurs neuronaux, de futures Cellules de la Crête Neurale, et de futures cellules épidermiques, s'épaissit légèrement. Les cellules neuronales et épidermiques se séparent et il y a alors formation d'une

quille neurale, progressivement recouverte d'épiderme. Les cellules de la quille neurale subissent une polarisation et un neurocoele se forme. [163] (**Figure 18**)

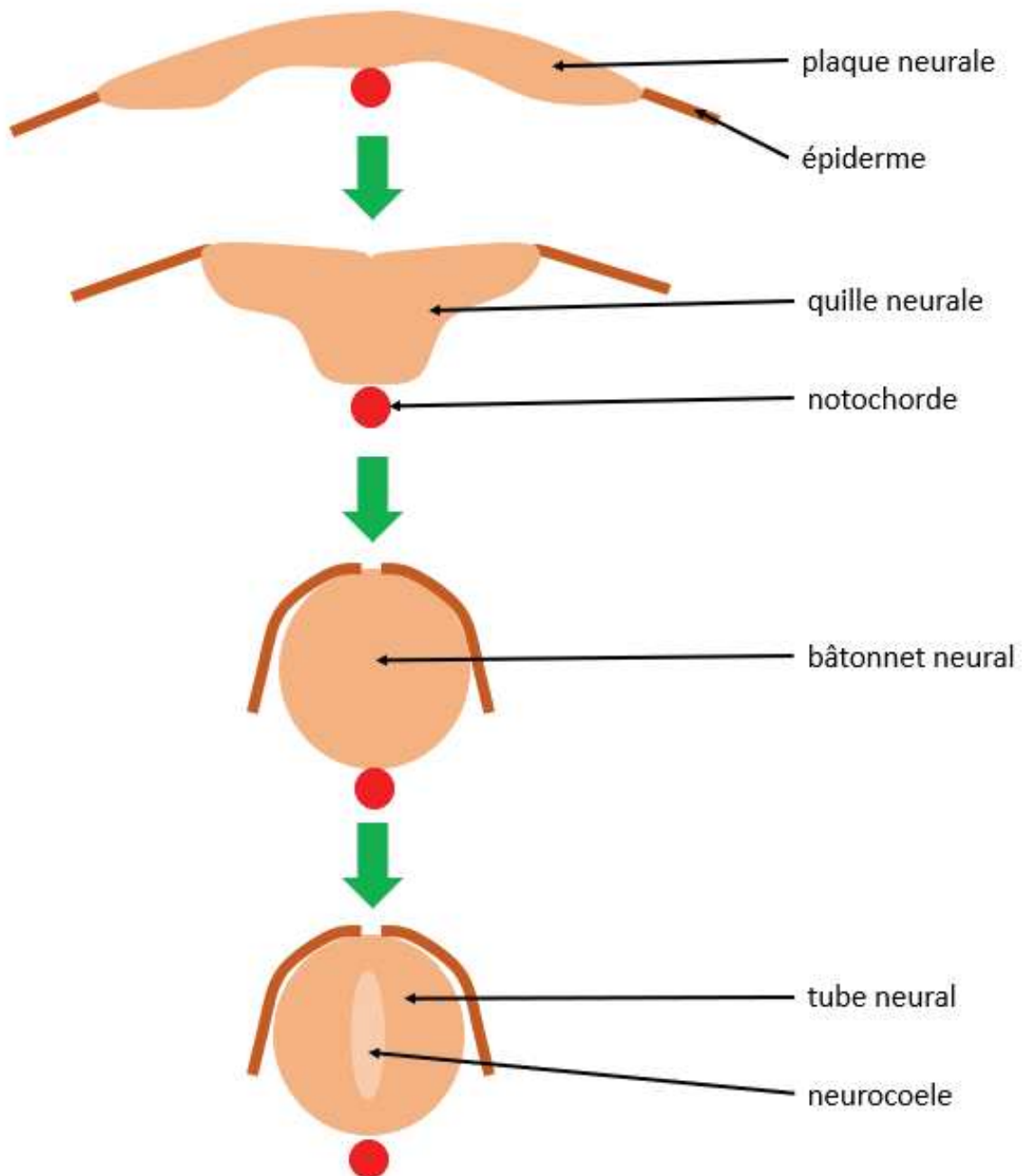


Figure 18: La neurulation chez le poisson-zèbre. L'ectoderme situé au-dessus de la notochorde ne s'invagine pas, mais s'épaissit pour former une « quille neurale », puis un bâtonnet neural, qui se vacuolise progressivement.

La régionalisation du tube neural est également différente entre le poisson-zèbre et les mammifères. (**Figure 17**) La différence la plus notable est que les Cellules de la Crête Neurale

sacrée n'ont jamais été décrites chez le poisson-zèbre.[164] De plus, le territoire de la Crête Neurale céphalique est réduit chez le poisson-zèbre, au profit de la Crête Neurale vagale. Enfin, les Cellules de la Crête Neurale cardiaque sont réparties sur tout le territoire de la Crête Neurale vagale, au lieu de n'en occuper qu'une partie comme chez les mammifères et les oiseaux.

4. LES NEUROCRISTOPATHIES

Les maladies dues à un défaut des cellules de la crête neurale sont appelées « neurocristopathies ». Les Cellules de la Crête Neurale étant les précurseurs de nombreux types cellulaires, et participant à la formation de nombreux organes, les neurocristopathies peuvent affecter de nombreux tissus différents.

La maladie de Hirschsprung (MIM 142623 et MIM 600155) est caractérisée par des constipations et occlusions intestinales causées par une absence d'innervation neuronale de la partie terminale de l'intestin. Cette maladie touche 1 naissance sur 5000, et 80 % des individus affectés sont des hommes. Lorsque la maladie est d'origine génétique, des mutations sont retrouvées dans les gènes suivants : *RET*, *GDNF*, *NRTN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*. La maladie se transmet de manière autosomique dominante, avec une pénétrance incomplète. La maladie peut être isolée ou faire partie d'un syndrome, comme par exemple, le syndrome de Bardet-Biedl ou le syndrome d' Ondine (causé par des mutations dans le gène *PHOX2B*). Une origine environnementale est suspectée dans certains cas : si la mère a été exposée à des perturbateurs endocriniens ou à des agents tératogènes durant la grossesse.

Le syndrome de DiGeorge, ou syndrome vélocardiofacial, (MIM 188400) est causé par une délétion du chromosome 22q11.2, comprenant le gène *TBX1*. Ce syndrome se transmet de manière autosomique dominante. Les patients atteints du syndrome de DiGeorge présentent un développement anormal du thymus, entraînant un déficit immunitaire. En plus des atteintes immunitaires, des anomalies de la face, des gros vaisseaux du cœur et des glandes parathyroïdes sont observées. Les patients peuvent également être atteints de troubles de l'apprentissage et d'hyperactivité.

Le syndrome de Waardenburg (MIM 193500) est une maladie génétique, à hérédité autosomique dominante, causée par des mutations dans les gènes *PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *SOX10*,

EDNRB, EDN3. Les individus atteints de ce syndrome présentent, le plus souvent, une surdité neurosensorielle congénitale, qui peut être associée à des défauts de pigmentation des cheveux et des iris, et à une dystopie canthale. Certaines formes du syndrome de Waardenburg peuvent être associées à des manifestations de la maladie de Hirschsprung.

La neurofibromatose de Von Recklinghausen, ou Neurofibromatose de type 1, (MIM 162200) est la plus fréquente des neurocristopathies : elle touche 1 naissance sur 3000. Cette affection est due à des mutations dans le gène *NF1* et se transmet de manière autosomique dominante. Elle est caractérisée par la présence de très nombreux neurofibromes (des tumeurs nerveuses périphériques) et de tâches « café au lait ».

La sclérose tubéreuse de Bourneville (MIM 191100) se transmet de façon autosomique dominante et touche 1 naissance sur 10 000. Elle est due à des mutations dans les gènes *TSC1* et *TSC2*. Elle est caractérisée par des hamartomes qui peuvent toucher de nombreux tissus différents, tels que la peau, les reins, le cœur, les poumons, et le cerveau. Les individus atteints de cette maladie sont souvent atteints d'épilepsie et peuvent également présenter des troubles neuropsychiatriques, comme par exemple, une déficience intellectuelle ou des TSA.

Le phéochromocytome (MIM 171300) est une tumeur des cellules chromaffines de la glande médullosurrénale, qui dérivent des Cellules de la Crête Neurale du tronc. Elle peut évoluer en tumeur maligne et créer des métastases qui seront retrouvées au niveau des os, du foie, mais aussi le long de l'aorte et au niveau du thorax. Cette maladie est provoquée par des mutations dans les gènes *RET, VHL, NF1, SDHB, SDHC, SDHAF2* ou *TMEM127* et se transmet de manière autosomique dominante.

D. DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE

Le système nerveux entérique dérive majoritairement des Cellules de la Crête Neurale vagale. Les Cellules de la Crête Neurale du tronc engendrent quelques ganglions de l'intestin antérieur et les Cellules de la Crête Neurale sacrée ne donnent naissance qu'à certains ganglions de la partie postérieure de l'intestin.[165, 166] (**Figure 19**)

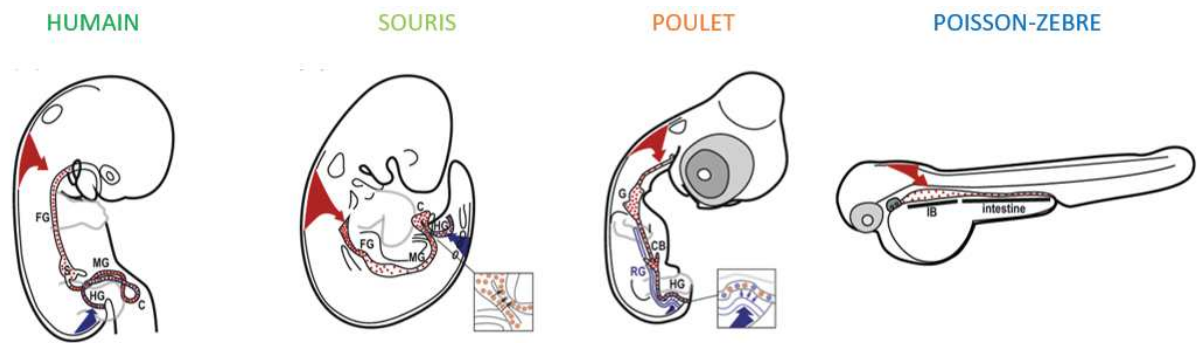


Figure 19: Contribution des Cellules de la Crête Neurale au développement du Système Nerveux Entérique. Chez l'humain, la souris et le poulet, le système nerveux entérique dérive majoritairement des CCN vagues et en partie des CCN sacrées. En revanche, chez le poisson-zèbre, le système nerveux entérique dérive exclusivement des CCN vagues. Adapté de Heanue et al., 2016. [167]

Chez la souris, les Cellules de la Crête Neurale pré-entérique, dérivant de la Crête Neurale vagale, migrent jusqu'à l'intestin antérieur et l'envahissent au jour embryonnaire E9.5.[168] Elles migrent alors de manière rostro-caudale, jusqu'à atteindre l'extrémité distale de l'intestin au jour embryonnaire E14.[169] Cette migration est accompagnée d'une migration radiale qui permet la formation des deux couches de ganglions formant le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux.[170] Durant la migration, les Cellules de la Crête Neurale prolifèrent et se différencient en neurones et en cellules gliales, qui vont se regrouper en ganglions et former un réseau à travers tout le tube digestif. Enfin, les Cellules de la Crête Neurale sacrée migrent ventralement, afin d'envahir l'extrémité distale du tube digestif à la suite des Cellules de la Crête Neurale vagale.[165](**Figure 20**)

Chez l'humain, le développement du Système Nerveux entérique se déroule de la même manière que chez la souris. L'invasion du tube digestif par les Cellules de la Crête Neurale se fait avant la quatrième semaine de développement et, à la septième semaine de développement, les Cellules de la Crête Neurale ont atteint l'extrémité distale du tube digestif.[169, 171]

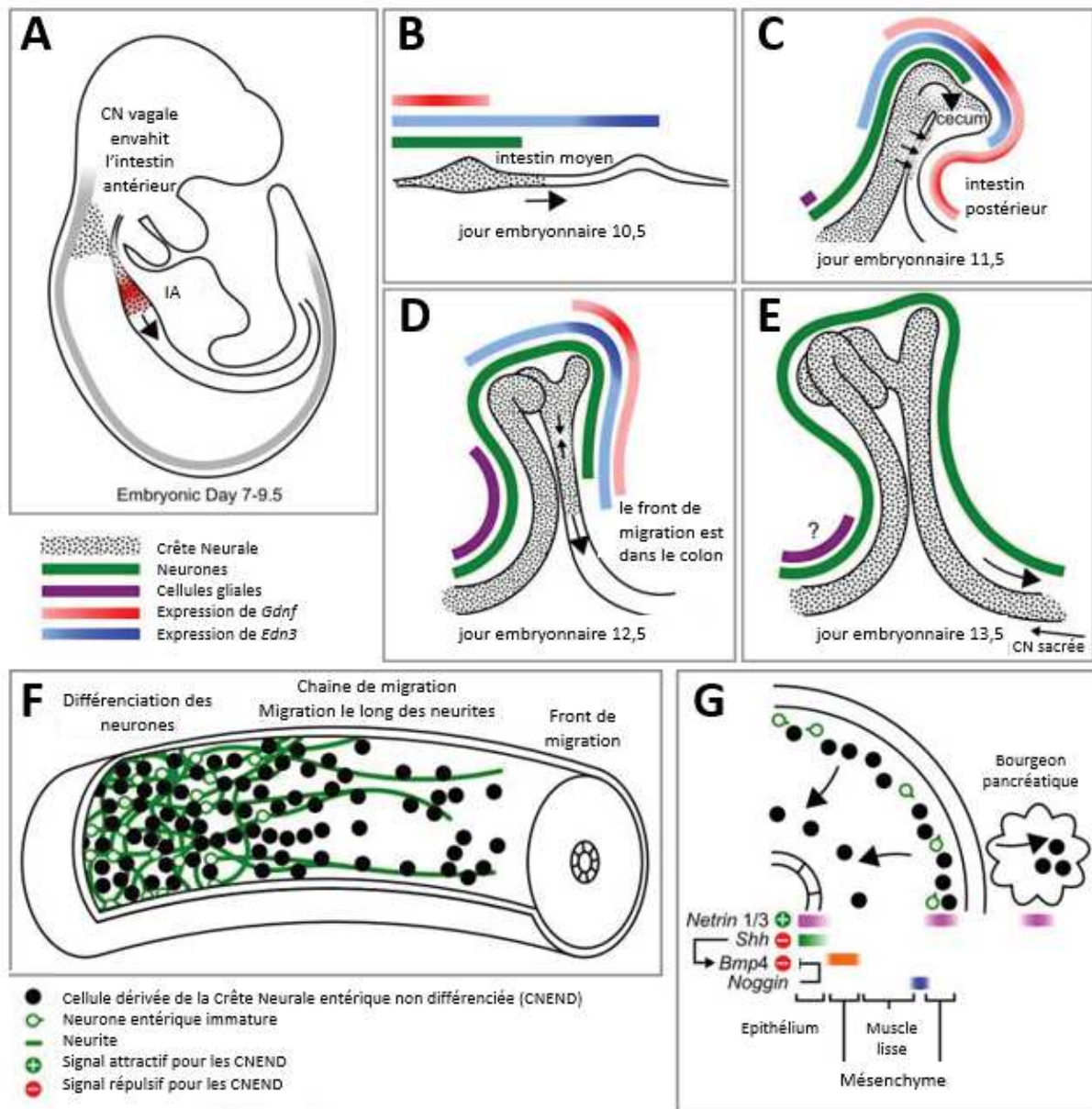


Figure 20: Le développement du Système Nerveux Entérique chez la souris. A : Les CCN envahissent le tube digestif à E7-E9.5. B,C,D,E : Les CCN migrent le long du tube digestif jusqu'à atteindre son extrémité distale à E13.5. F : Les CCN se différencient en neurones au cours de la migration. Les CCN présentes au front de migration restent indifférenciées jusqu'à la fin de la migration. G : Une fois l'extrémité distale du tube digestif atteinte, les CCN migrent radialement pour former les plexus muqueux et myentériques. Adapté de Lake and Heuckeroth, 2013. [172]

Chez le poisson-zèbre en revanche, seules les Cellules de la Crête Neurale vagale sont à l'origine du système nerveux entérique. (**Figure 19**) La migration des Cellules de la Crête Neurale le long du tube digestif peut être suivie en observant l'expression de *phox2b*, un facteur de transcription exprimé par les Cellules de la Crête Neurale et par les neurones

différenciés.[173] Les Cellules de la Crête Neurale vagale quittent le tube neural à 24 heures post-fécondation et migrent vers le tube digestif, qu'elles envahissent à 32 heures post-fécondation. [174] Elles migrent alors en deux lignes parallèles, jusqu'à atteindre l'extrémité distale de l'intestin à 72 heures post-fécondation. (**Figure 21**) [173] Au fur et à mesure de leur migration, les Cellules de la Crête Neurale vagale les plus antérieures se différencient et migrent ventralement pour recouvrir l'intestin. [173] A 82 heures post-fécondation, tout l'intestin est recouvert de neurones différenciés.

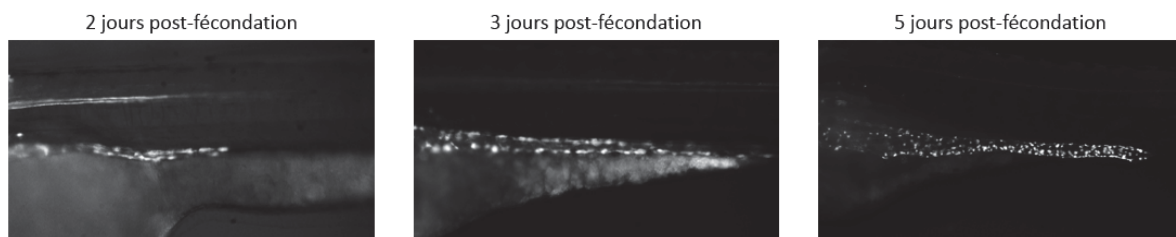


Figure 21: Trajet des Cellules de la Crête Neurale le long de l'intestin. Les CCN envahissent le tube digestif à 32 hpf puis migrent en deux lignes parallèles jusqu'à l'extrémité distale de l'intestin, qu'elles atteignent à 3 jpf. Les CCN migrent ensuite ventralement et prolifèrent afin de recouvrir l'intestin. Données personnelles.

IV. LES VOIES DE SIGNALISATIONS

A. LA VOIE RET/GDNF

La voie RET/GDNF est nécessaire à la régulation de la prolifération, différenciation, survie et migration des Cellules de la Crête neurale lors du développement du système nerveux entérique. [175]

Les ligands GFL (ligands de la famille de GDNF ou Facteur Neurotrophe dérivé de la Glie) forment tout d'abord un complexe avec GFR α , un corécepteur ancré dans la membrane grâce au glycosylphosphatidylinositol. La formation de ce complexe permet la dimérisation de deux récepteurs à tyrosine kinase RET et la transphosphorylation de plusieurs tyrosines au niveau du domaine cytoplasmique de chacun des deux récepteurs. [175]

L'activation du récepteur RET peut entraîner l'activation de différentes voies de signalisation : la voie Ras/ERK est activée par le recrutement de Grb2/Sos au niveau de la tyrosine phosphorylée 1062, tandis que la voie PI3K/Akt est activée par le recrutement de Grb2/GAB au même endroit. Ces deux voies de signalisation permettent l'activation de CREB et de NF κ B.

Le récepteur RET peut également activer les voies JNK, p38, MAPK, ERK5 et la voie de la phospholipase C. [175]

SHANK3, un des gènes candidats majeurs des TSA, est également capable de se fixer à la tyrosine 1062 du récepteur RET, qu'elle soit phosphorylée ou non, et d'activer les voies de signalisation MAPK et PI3K. [176]

B. LA VOIE EDRNB

La voie EDRNB est également importante pour le développement du système nerveux entérique, bien que son rôle soit moins clair : on pense qu'elle inhibe la différenciation des précurseurs entériques et permet leur prolifération afin qu'il y ait assez de neurones pour coloniser tout l'intestin. Tout comme pour la voie RET/GDNF, une altération de la voie EDRNB peut entraîner la maladie de Hirschsprung.[177]

Le gène *EDRNB* code un récepteur Endothéline de type B, un récepteur couplé à une protéine G. Ce récepteur reconnaît les endothélines, EDN1, EDN2 et EDN3, préalablement activées par des enzymes de conversion ECE1 et ECE2. [177]

L'activation du récepteur EDNRB dépend principalement de EDN3 et entraîne, tout comme l'activation du récepteur EDNRA, l'activation de plusieurs voies de signalisation, telles que la voie Rho, la voie de la phospholipase C, la voie PI3K/Akt et la voie de l'adénylyl cyclase. [177]

C. LA VOIE WNT

La voie WNT est une voie de signalisation qui permet de réguler simultanément de nombreux processus biologiques, durant toute la vie d'un organisme. La liaison d'un ligand WNT sur le récepteur Frizzled peut entraîner l'activation de la voie canonique : la voie WNT/ β -caténine.

En l'absence de protéines WNT, la β -caténine forme un complexe avec les protéines APC, CK1 α , GSK3 α/β et l'axine, qui est dégradé par le protéasome. Les ligands Wnt peuvent se lier au récepteur Frizzled, dimérisé avec un corécepteur LRP5/6, ce qui conduit au recrutement de la protéine Dishevelled, qui forme ensuite un complexe avec les protéines GSK3 α/β et l'axine. Ce complexe inhibe l'activité de GSK3 et empêche la dégradation de la β -caténine, qui peut alors être transloquée dans le noyau, où elle modifie la régulation des gènes cibles de la voie WNT/ β -caténine. [178]

Cependant, les protéines WNT peuvent également activer des voies non canoniques : la voie WNT/PCP (Planar Cell Polarity, ou Polarité Cellulaire Planaire) ou la signalisation calcique. Lorsque WNT se lie à un dimère composé du récepteur Frizzled et de ROR/Ryk, le recrutement de Dishevelled entraîne l'activation de la voie PCP, à travers l'activation de la voie Rho et de la voie JNK. La liaison de WNT au récepteur Frizzled entraîne le recrutement de Dishevelled et l'activation de la voie de signalisation calcique. [179]

L'équilibre entre le niveau d'activation de ces différentes voies dépend en partie du ligand WNT impliqué et du récepteur Frizzled auquel il se lie. A ce jour, dix-neuf protéines WNT ont été décrites [180] et 10 récepteurs Frizzled ont été identifiés chez l'humain. [178]

D. LA VOIE TGF- β

La voie de signalisation TGF- β (Transforming Growth Factor β) contrôle également de nombreux processus cellulaires, à tous les stades du développement et du vieillissement : elle participe à la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire.[181]

Le ligand TGF- β se fixe à un dimère formé d'un récepteur de type I et d'un récepteur de type II. Le récepteur de type II phosphoryle alors le domaine kinase du récepteur de type I, ce qui permet la phosphorylation des protéines R-SMAD (SMAD régulées par le récepteur). Ces protéines forment alors un complexe avec SMAD4, qui se transloque dans le noyau, pour réguler la transcription des gènes cibles. SMAD 6 et 7 sont des régulateurs négatifs de la voie de signalisation TGF- β : ils peuvent entrer en compétition avec les R-SMAD pour la liaison aux récepteurs et à SMAD4. Ils peuvent également entraîner la dégradation des récepteurs.[181]

Il existe 42 ligands appartenant à la famille des TGF- β chez l'humain, qui sont regroupés en deux sous-familles : la famille des TGF- β /Activine/Nodal, qui entraîne la phosphorylation des R-SMAD 2 et 3, et la famille des BMP/GDF/MIS, qui cause la phosphorylation des R-SMAD 1,5 et 8.[181]

E. LA VOIE DE LA SEROTONINE

La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine, est une molécule dérivée du Tryptophane (**Figure 22**), fortement conservée au cours de l'évolution, et qui joue un rôle à la fois local, comme neurotransmetteur, ou systémique, comme hormone.

Chez l'homme, le tryptophane n'est pas synthétisé par l'organisme et fait donc partie des acides aminés essentiels qui doivent être apportés par l'alimentation. Il est absorbé dans l'intestin grâce à des canaux tels que SLC6A19. La Tryptophane hydroxylase (TPH) transforme le L-tryptophane en L-5-OH-Tryptophane, qui est ensuite converti en sérotonine par une décarboxylase des acides aminés aromatiques, la DCC ou DAAA. **(Figure 22)** Chez l'homme, il existe deux paralogues de la TPH : TPH1 exprimée dans les cellules entérochromaffines et TPH2 exprimée par les neurones sérotoninergiques.

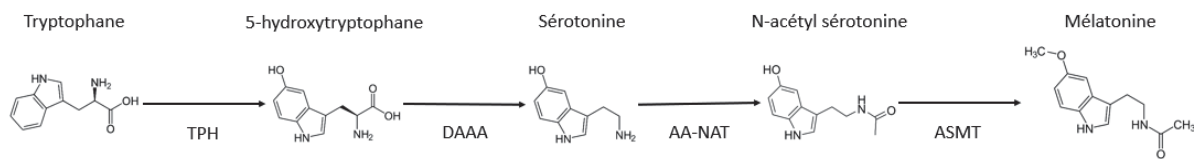


Figure 22: Synthèse de la sérotonine et de la mélatonine.

La sérotonine joue un rôle vasoconstricteur qui permet la régulation de la motilité de l'intestin. La majorité de la sérotonine de l'organisme est synthétisée dans l'intestin par les cellules entérochromaffines. Les neurones sérotoninergiques du cerveau et de l'intestin produisent également une petite quantité de sérotonine. Cependant, la sérotonine responsable de la motilité de l'intestin est la sérotonine sécrétée dans les neurones entériques, grâce à TPH2. En effet, les souris déficientes en *tph1* ne présentent pas de problèmes de motilité intestinale, tandis que les souris déficientes en *tph2* souffrent d'une diminution de la motilité intestinale. [182]

Il existe 7 sous-types de récepteurs à la sérotonine, qui sont exprimés dans différents types cellulaires et qui activent différentes voies de signalisation. **(Figure 23)** Ces récepteurs sont couplés à des protéines G, à l'exception du récepteur HTR3, qui est un canal sodique et qui régule directement l'excitation neuronale. La fixation de la sérotonine sur les récepteurs couplés à une protéine G permet de réguler de nombreux processus, tels que la régulation de l'expression des gènes ou la plasticité synaptique. **(Figure 23)**

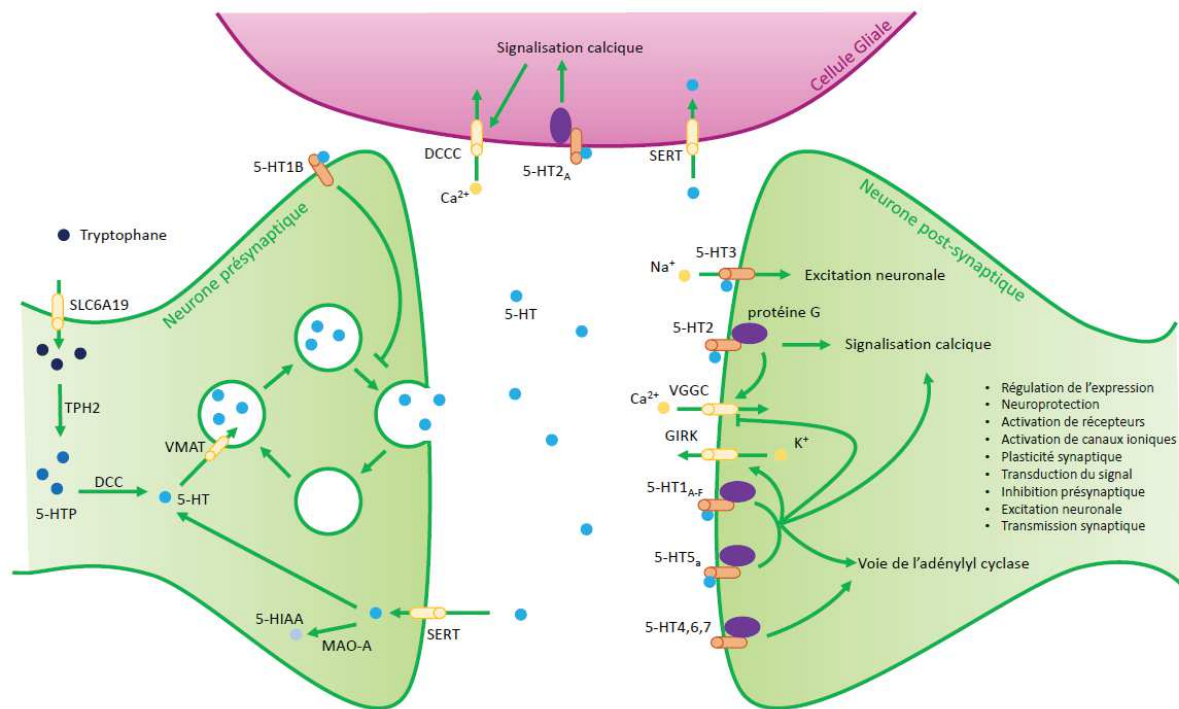


Figure 23: La synapse sérotoninergique, adapté de KEGG pathways.

La sérotonine est également le précurseur de la mélatonine, qui permet la régulation du rythme circadien. (Figure 23) Ces deux composés pourraient être utilisés comme biomarqueurs des TSA. En effet, le taux sanguin de sérotonine est augmenté chez 25 % à 40 % des individus atteints de TSA, tandis que le taux de mélatonine dans les urines est diminué. [183] L'altération de la production de ces deux hormones pourrait expliquer la cooccurrence des troubles du sommeil et des troubles de l'humeur avec les TSA.

Aucune mutation dans *TPH1* ou *TPH2* n'a été associée aux TSA (SFARI Gene). En revanche, des variants dans *TPH2* ont été associés à des troubles de l'attention et de l'hyperactivité, et à la dépression. [184, 185] De plus, plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme (*DDC* [186]), le transport (*SERT* [187], *SLC29A4* [188]) et la signalisation sérotonergique (*HTR1B* [189], *HTR3A* [190], *HTR3C* [191]) ont été associés aux TSA d'après la base de données SFARI Gene.

La sérotonine est également impliquée dans l'inflammation. La sérotonine sécrétée par les cellules entérochromaffines joue un rôle pro-inflammatoire [192, 193] : elle se fixe au récepteur 5-HTR7 localisé à la surface des cellules dendritiques. [194] Cependant, la sérotonine peut également jouer un rôle anti-inflammatoire, en se fixant au récepteur 5-HTR4. [195]

F. LA VOIE DE L'ACÉTYLCHOLINE

L'acétylcholine (ACh) est un dérivé de l'acétyl-CoA et de la choline qui joue le rôle de neurotransmetteur. Elle est synthétisée grâce à la choline acétyltransférase et catabolisée par l'acétylcholinestérase. (**Figure 24**)

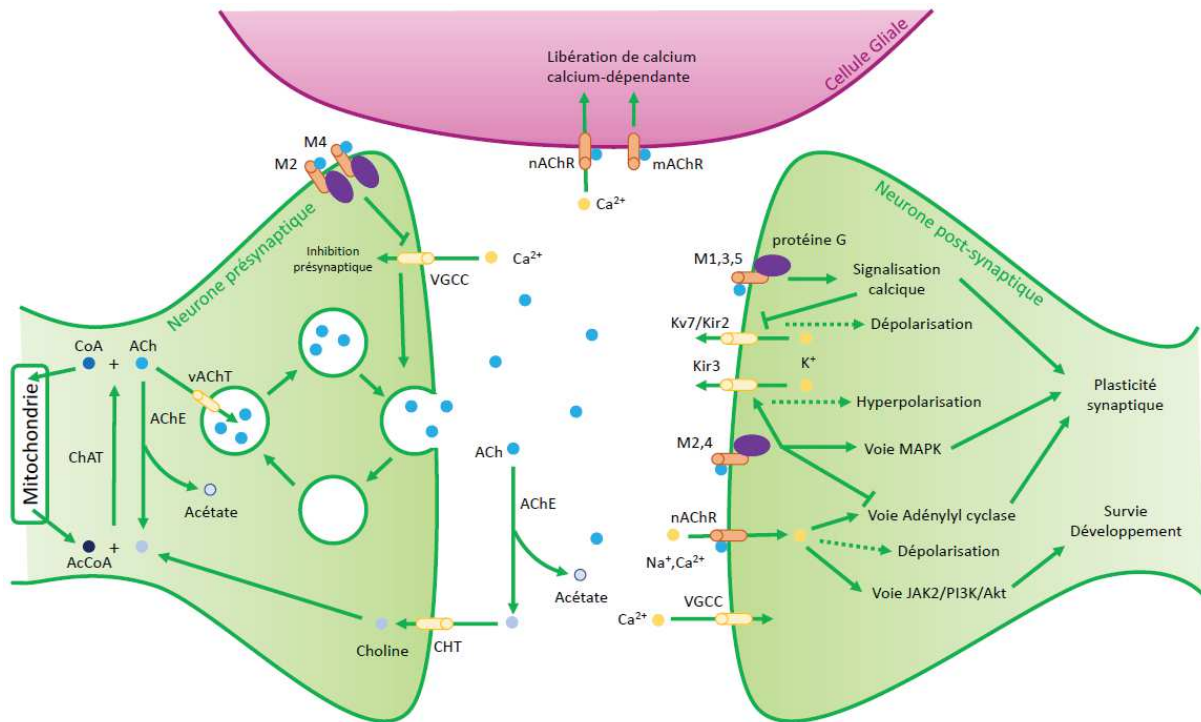


Figure 24: La synapse cholinergique, adapté de KEGG pathways.

Il existe deux types de récepteurs cholinergiques : les récepteurs nicotiniques, qui peuvent également être activés par la nicotine, et les récepteurs muscariniques, qui sont aussi activés par la muscarine. Les récepteurs nicotiniques sont des canaux ioniques à sodium, potassium et calcium. Il en existe deux types : le type muscle (récepteur N2), retrouvé à la jonction neuromusculaire, qui provoque la libération de sodium ; et le type neurone (récepteur N1), présent au niveau des ganglions autonomes et du système nerveux central, qui permet de libérer du sodium et du potassium. Les récepteurs nicotiniques activent la voie de l'adénylyl cyclase et induisent une dépoliarisation de la membrane. [196] (**Figure 24**)

Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, liés à protéine G, qui sont retrouvés dans les systèmes nerveux central et périphérique. Il en existe cinq sous-types : les récepteurs de type M1, M3 et M5 sont des récepteurs activateurs de la signalisation calcique et entraînent une dépoliarisation de la membrane. Les récepteurs de

type M2 et M4 sont des récepteurs qui inhibent la voie de l'adénylyl cyclase et qui entraînent une hyperpolarisation de la membrane. [196] (**Figure 24**)

V. MODELISATION DES TSA *IN VITRO* ET *IN VIVO*

A. MODELISATION DES TSA *IN VITRO*

Les technologies récentes de génération et de manipulation des Cellules Souches Pluripotentes Induites (iPSC) humaines permettent l'étude de nombreuses maladies génétiques et l'évaluation de l'impact des mutations humaines dans un contexte physiologique approprié. Ces technologies permettent, en effet, de reprogrammer des fibroblastes de patients en iPSC puis de les différencier en progéniteurs neuronaux ou en neurones. Dans le cadre de l'étude des gènes impliqués dans les TSA, cela permet de contourner l'obstacle majeur : l'impossibilité de prélever des neurones à des patients vivants.

La génération de neurones corticaux à partir d'iPSC d'individus porteurs d'une mutation à l'état hétérozygote dans *SHANK3*, a permis de montrer que ces neurones forment moins de dendrites *in vitro* et que la morphologie de celles-ci est altérée. [197] Des neurones excitateurs dérivés d'iPSC et porteurs d'une mutation à l'état hétérozygote dans *NRXN1* présentent une augmentation de la signalisation calcique corrélée à une augmentation de l'expression des canaux calciques dépendant du voltage. [198]

De plus, les iPSC permettent également de rechercher les causes moléculaires et cellulaires des TSA même en l'absence de diagnostic génétique. Ainsi, les neurones dérivés d'iPSC générés à partir de fibroblastes d'individus atteints de TSA et de macrocéphalie forment moins de synapses excitatrices et inhibitrices, ce qui entraîne des défauts de connectivité du réseau neuronal.[199]

Ces données récentes sont prometteuses mais l'utilisation des iPSC présente également plusieurs inconvénients. Il s'agit d'un modèle *in vitro*, les neurones générés ne sont donc pas en conditions physiologiques. Par exemple, la communication entre types cellulaires qui a normalement lieu au cours du développement est absente ce qui peut conduire à des observations non physiologiques. De plus, à l'heure actuelle, tous les types de neurones ne peuvent pas être générés à partir d'iPSC. Les iPSC permettent donc de formuler des hypothèses. Ces modèles cellulaires représentent une méthode alternative à

l'expérimentation animale en contribuant au principe des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). A ce jour, leur utilisation ne peut, néanmoins, pas se substituer complètement aux études réalisées chez l'animal.

B. MODELISER DES COMPORTEMENTS HUMAINS CHEZ LE MODELE MURIN

Les deux principaux modèles utilisés sont la souris et le rat, et plusieurs types de tests existent pour modéliser les symptômes caractéristiques des TSA chez ces animaux.

Plusieurs protocoles expérimentaux permettent de détecter un déficit d'interactions sociales. Le nombre et la durée des interactions sociales entre deux souris, placées dans la même cage, peuvent être comptabilisés. Par exemple, la durée des interactions sociales est augmentée pour les souris *Chd8*^{+/-}. [141] La souris testée peut également être placée entre deux compartiments, l'un contenant une souris familière et l'autre une souris étrangère. Les souris sauvages passent plus de temps à proximité de la souris étrangère, tandis que les souris *Chd8*^{+/-} passent autant de temps à proximité des deux souris. [141] La préférence sociale peut également être mesurée en plaçant la souris test entre deux compartiments : l'un vide et l'autre contenant une souris étrangère. Les souris sauvages passent plus de temps à proximité de la souris étrangère, alors que les souris *Shank3B*^{-/-} passent plus de temps à côté du compartiment vide. [200]

Les comportements répétitifs sont l'un des symptômes majeurs des TSA. Les modèles murins de TSA présentent souvent ce type de comportements. Cependant, ils peuvent être dus à l'anxiété et il peut être difficile de déterminer leur origine réelle. Ainsi, les souris *Shank3B*^{-/-} passent plus de temps à se lécher que les souris sauvages [200] On peut également dénombrer le nombre de fois où les souris se redressent et sautent. Les souris porteuses d'une délétion de la région 16p11.2 sautent et se redressent plus souvent que les souris sauvages. [201]

C. LE POISSON-ZEBRE

Le poisson-zèbre, ou *Danio rerio*, est un petit poisson d'eau douce (4-5 cm), qui vit dans des ruisseaux et des mares peu profonds en Inde, au Népal, et au Bangladesh. (**Figure 25A**) A l'âge adulte, il mesure entre 4 et 5 cm et arbore 3 rayures horizontales bleues de chaque côté du corps. La couleur du mâle tire sur le jaune-rouge, tandis que la femelle est plus grise. (**Figure**

25B) Les poissons-zèbres se nourrissent de zooplancton et peuvent vivre en moyenne 3 à 4 ans en laboratoire.[202]

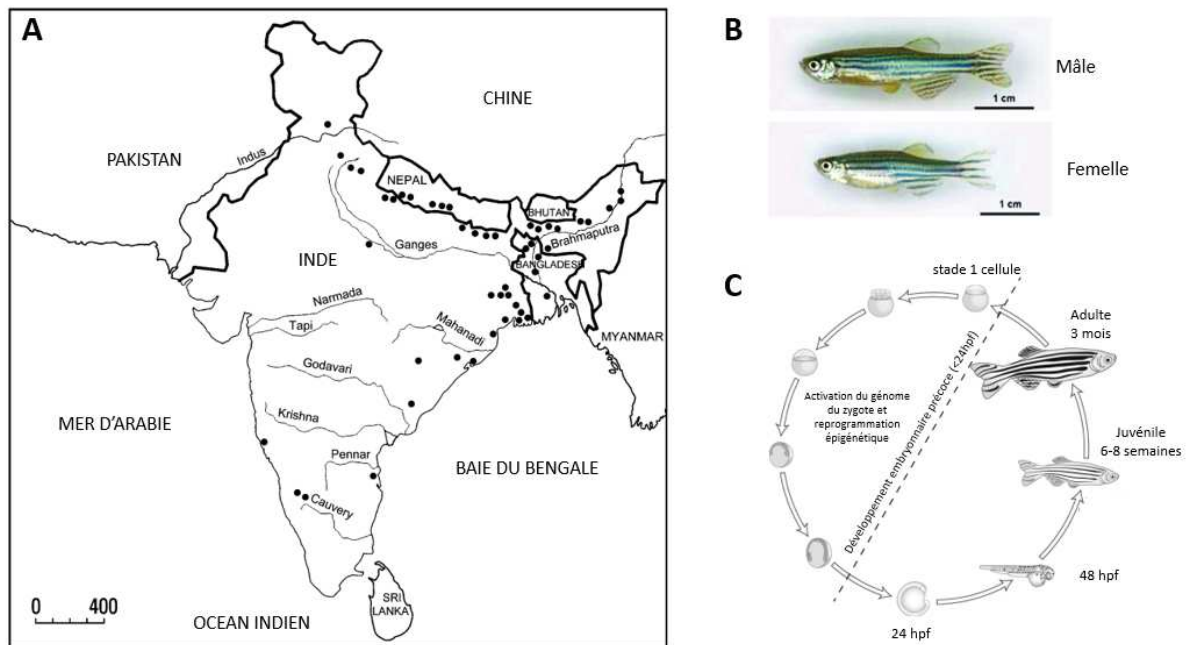


Figure 25: Le poisson-zèbre. A : Carte de répartition du poisson-zèbre dans la péninsule indienne, d'après Spence et al., 2008 [202]. B : Apparence des poissons-zèbres adultes, mâle et femelle. Les mâles sont plus foncés que les femelles, et les femelles ont le dos plus bombé, d'après <https://www.aquariumfishparadise.com.au/zebradanio/>. C : Cycle de vie du poisson-zèbre, adapté de [203]

Le poisson-zèbre est un animal diurne, qui peut se reproduire toute l'année en laboratoire. Au lever du jour, le poisson-zèbre présente un pic d'activité : la femelle pond des œufs que le mâle fertilise. La première division cellulaire a lieu au bout de 40 minutes environ. La gastrulation se déroule à partir de 5 heures post fécondation. Le cerveau commence à se former aux alentours de 9 heures post-fécondation et le cœur commence à battre vers 24 heures post-fécondation.[204] Les larves de poisson-zèbre peuvent se nourrir à environ 6 jours post-fécondation. Les poissons-zèbres sont sexuellement matures aux alentours de 3 mois de vie et leur fertilité est maximale entre 6 mois et 1 an et demi.[202] (**Figure 25C**)

Le poisson-zèbre est un animal social : dans son milieu naturel, il vit en banc. Les bancs ne se forment pas au hasard : les poissons-zèbres ont une préférence pour les individus qui ressemblent à ceux avec lesquels ils ont été élevés et ils préfèrent les bancs plus larges et plus actifs. Les mâles préfèrent rejoindre des bancs constitués de femelles que des bancs constitués de mâles, les femelles n'ont pas de préférence.[202]

Au sein des bancs, les poissons-zèbres établissent des hiérarchies. Pour établir leur dominance, ils peuvent utiliser des comportements agressifs, comme pourchasser ou mordre leur adversaire. Ils peuvent également se tourner autour en déployant leurs nageoires, ce qui peut aussi leur servir à se reconnaître. Les comportements agressifs sont moins fréquents lorsque les relations hiérarchiques ont été établies.[202] Le dominant est plus sombre et occupe plus de place que le dominé. Les relations hiérarchiques sont stables, mais peuvent être ré-établies si les poissons ont été séparés pendant une longue période. La dominance est importante au moment des croisements et de la recherche de nourriture. [202]

Le poisson-zèbre est une espèce sociale, qui vit en banc. Il est donc possible d’observer des altérations de la sociabilité chez des poissons adultes ou juvéniles porteurs de mutations dans des gènes associés aux TSA.

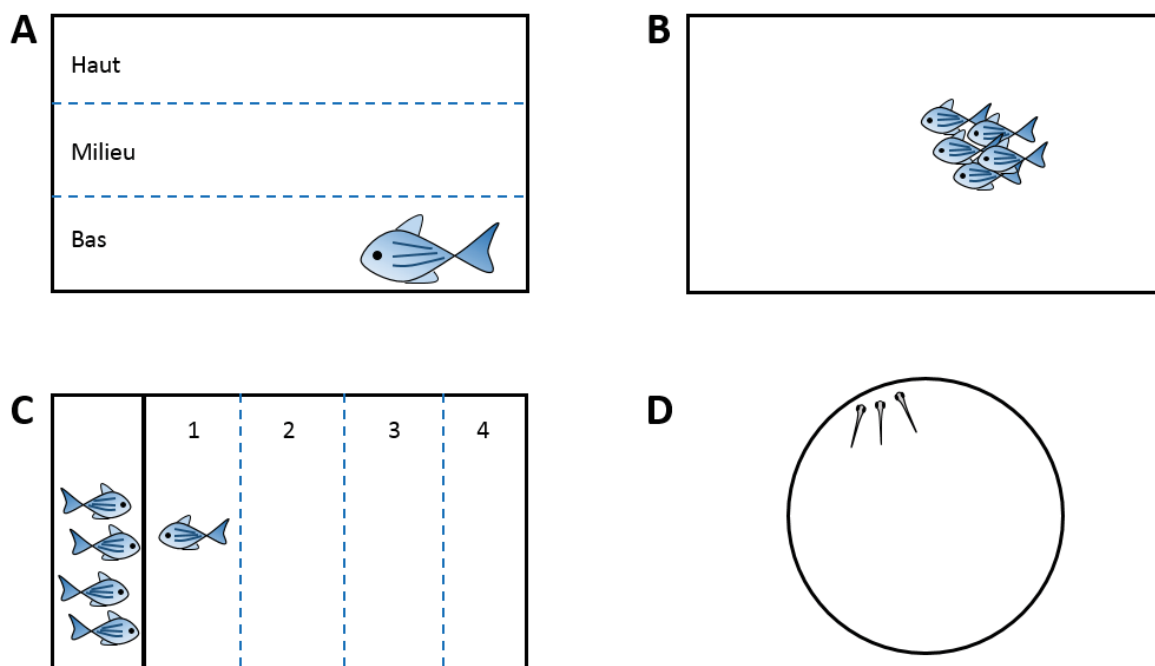


Figure 26: Tests comportementaux pour les TSA chez le poisson-zèbre. A : Test de hauteur de nage. B : Test de nage en banc sur poissons adultes. C : Test de préférence sociale. D : Test de nage en banc sur poissons juvéniles.

Le test de hauteur de nage (**Figure 26A**) permet de mesurer l’anxiété : lorsqu’ils sont en situation de stress, par exemple lorsqu’ils sont placés dans un nouvel aquarium, les poissons-zèbres sauvages ont tendance à nager dans le bas de l’aquarium. En revanche, les poissons *dyrk1aa^{-/-}* occupent tout l’espace de l’aquarium, dès qu’ils y sont placés.[205]

Le test de nage en banc (**Figure 26B et 26D**) permet de mesurer la cohésion sociale chez les poissons-zèbres adultes et juvéniles. Pour cela, la distance moyenne entre les poissons du banc et leurs voisins les plus proches peut être mesurée. Chez les poissons *dyrk1aa^{-/-}* adultes et juvéniles, cette distance inter-individus est plus grande que chez les poissons sauvages. [205] Les poissons *shank3b^{-/-}* présentent le même phénotype. [206]

Le test de préférence sociale (**Figure 26C**) permet de mesurer la sociabilité chez les poissons-zèbres adultes. Un poisson isolé est placé à côté d'un compartiment contenant des poissons connus ou étrangers. Les poissons-zèbres sauvages passent plus de temps à proximité de ses congénères, tandis que les poissons *dyrk1aa^{-/-}* et les poissons *shank3b^{-/-}* passent plus de temps à explorer l'aquarium qu'à proximité des autres poissons. [205, 206] Les larves de poisson-zèbre exposées à l'acide valproïque durant leur développement montrent le même phénotype. [207]

Le rythme circadien des poissons-zèbres peut également être mesuré, en suivant les déplacements de poissons adultes ou de larves au cours de la journée et de la nuit. Ce test permet également de détecter des troubles du niveau d'activité. Par exemple, les larves *shank3b^{-/-}* sont significativement moins actives que les larves sauvages, à la lumière et à l'obscurité. En revanche, elles ne semblent pas présenter de décalage du rythme circadien. [206]

Le poisson-zèbre est donc un bon modèle pour modéliser les troubles de la sociabilité associés aux TSA. En revanche, il n'existe pas, pour le moment, de test qui permettent de modéliser correctement les comportements répétitifs.

OBJECTIFS DE LA THESE

Notre équipe de recherche se consacre à l'étude des bases génétiques des TSA et plus particulièrement des TSA syndromiques (traits autistiques accompagnés d'autres atteintes sur des organes comme l'intestin). Les TSA sont un regroupement de différentes pathologies sur la base de deux symptômes principaux : i) des déficits de communication et d'interactions sociales et ii) des comportements, intérêts et activités restreints et répétitifs.

Malgré les études toujours plus nombreuses sur le sujet, nous ne disposons toujours pas de traitement pour les TSA et certaines comorbidités des TSA, telles que les troubles gastro-intestinaux, sont encore peu étudiées.

Des travaux récents conduits par l'équipe ont montré que des mutations tronquantes dans le remodeleur de la chromatine *CHD8* sont responsables de traits autistiques associés à une macrocéphalie (80 % des cas), des troubles gastro-intestinaux (80 % des cas) et des troubles du sommeil (6 7% des cas).[137] La suppression transitoire par morpholino et CRISPR/Cas9 au stade F0 de *chd8* chez le poisson-zèbre confirme les phénotypes observés chez l'homme avec des larves mutantes présentant une macrocéphalie, causée par une augmentation de la prolifération cellulaire dans le cerveau, et une diminution de la motilité intestinale, due à une diminution du nombre de neurones entériques. Toutefois, le rôle précis de *chd8* dans le développement du système nerveux entérique est encore mal connu.

Durant ma thèse, j'ai utilisé un mutant stable du gène *chd8* dans le modèle poisson-zèbre afin de i) Déterminer l'effet d'une suppression du gène *chd8* sur la migration, prolifération et différenciation des cellules de la crête neurale (CCN ; cellules précurseurs des neurones entériques) au cours du développement du système nerveux entérique ; ii) Identifier les voies de signalisation qui sont contrôlées par *chd8* dans les CCN lors de la mise en place du système nerveux entérique ; iii) déterminer si les troubles du sommeil observés chez les individus porteurs d'une mutation dans *CHD8* sont dus à la mutation ou sont un effet secondaire des troubles gastro-intestinaux.

En parallèle de ce premier projet, j'ai participé à deux collaborations visant à valider fonctionnellement l'implication de deux gènes candidats : *VIM* et *NOVA2*. Pour ces deux

projets, j'ai utilisé le modèle poisson-zèbre afin de modéliser les phénotypes observés chez les patients – défauts crânio-faciaux, défauts de myélinisation des axones périphériques, lipodystrophie et microcéphalie – afin de valider l'implication des variants identifiés par nos collaborateurs dans les maladies étudiées.

Le manuscrit regroupant l'ensemble des données obtenues sur la caractérisation du modèle mutant *chd8* est en cours d'écriture et sera prochainement soumis. Les projets collaboratifs font l'objet de publications dans les journaux suivants :

Cogné B*, Bouameur JE*, **Hayot G***, *et al.* A dominant vimentin variant causes a rare syndrome with premature aging. *European Journal of Human Genetics* 2020 doi : 10.1038/s41431-020-0583-2.*co-premier auteur.

Mattioli F, **Hayot G**, *et al.* De Novo Frameshift Variants in the Neuronal Splicing Factor NOVA2 Result in a Common C-Terminal Extension and Cause a Severe Form of Neurodevelopmental Disorder. *American Journal of Human Genetics* 2020 doi: 10.1016/j.ajhg.2020.02.013.

Mon projet de thèse a fait l'objet de plusieurs communications orales, lors des congrès internationaux suivants :

Autism Comorbidities: Role of *CHD8* during the Development of the Enteric Nervous System ; *Présentation orale C12.4*, 53ème Congrès de la Société Européenne de Génétique Humaine (ESHG), online, 6-9 Juin 2020

Autism Comorbidities: Role of *CHD8* during the Development of the Enteric Nervous System; *Présentation orale*, 19ème XLID Workshop, Sorrento, Italie, 18-21 Septembre 2019

PROJET 1

Etude du rôle de *chd8* dans les troubles gastro-intestinaux associés aux Troubles du Spectre Autistique

Manuscrit en préparation

I. MATERIEL ET METHODES

ELEVAGE DES POISSONS-ZEBRES ET LIGNEES UTILISEES

Les poissons-zèbres adultes sont élevés en aquarium de 15 L, contenant au maximum 24 individus. L'eau est renouvelée en continu et est maintenue à une température de 28,5 °C et à une conductivité de 200 µS. Les poissons sont nourris trois fois par jour avec de la nourriture sèche et de la nourriture vivante (larves d'*Artemia salina*) et suivent un rythme jour-nuit de 14 heures-10 heures.

Nous avons utilisé la lignée *chd8^{sa19827}*, porteuse de la mutation c.C667T (p.Glu223*), que nous avons obtenue auprès du Centre Européen de Ressources pour le Zebrafish (EZRC - European Zebrafish Resource Center) et la lignée *tg(phox2bb:GFP)*, que nous avons obtenue auprès du Centre International de Ressources pour le Zebrafish (ZIRC - Zebrafish International Resource Center).

GENOTYPAGE DES POISSONS DE LA LIGNEE *chd8^{SA19827}*

Nous avons anesthésié les poissons adultes dans une solution de tricaine à 80 µg/ml et coupé l'extrémité de la nageoire caudale à l'aide d'une lame de scalpel. Nous avons ensuite digéré les nageoires dans 50 µl de NaOH 50mM pendant 15 minutes à 95 °C, puis nous avons neutralisé la réaction en ajoutant 5 µl de Tris-HCl pH7 1M. Nous avons amplifié la région génomique encadrant la mutation *sa19827* en réalisant une réaction PCR avec les amorces suivantes : 5'-GTCAGACTCAAGTGCTGCAG-3' et 5'-GACACTTTGAGGTCGGATGC-3'. Nous avons ensuite digéré le produit PCR grâce à l'enzyme *RsaI*, une enzyme de restriction dont le site de restriction est effacé par la mutation *sa19827*. Nous avons fait migrer le produit de digestion sur un gel d'agarose à 2 %, pendant 30 minutes, à 135 V. Pour les poissons *chd8^{+/+}*, nous observons deux bandes : l'une de 250 pb et l'autre de 180 pb ; pour les poissons *chd8^{+/sa19827}*, nous observons trois bandes, de 428 pb, 250 pb et 182 pb ; et pour les poissons *chd8^{-/-}*, nous observons une bande unique de 428 pb.

SEQUENÇAGE DES ARNm CHEZ DES LARVES DE POISSON-ZEBRE

Nous avons croisé des mâles *chd8^{+/+}* et *chd8^{sa19827/sa19827}* avec des femelles *Tg(chd8^{+/+} ; phox2bb :GFP)* et nous avons récolté les œufs, que nous avons incubés à 28,5 °C. A 4 jours post-fécondation, nous avons euthanasié les larves en les plaçant dans une solution de tricaine à 2 mg/ml dans du RPMI et nous avons coupé les têtes des larves derrière la vésicule otique. Nous avons collecté les queues des larves dans un tube Eppendorf de 2 ml,

nous avons enlevé le RPMI et l'avons remplacé par 1 ml de Trypsine-EDTA 1X (Sigma, réf 59417C-100ML). Afin de faciliter la digestion, nous avons homogénéisé la solution de digestion par aspiration refoulement, puis nous avons stoppé la digestion au bout de 10 minutes en ajoutant 50 µl de sérum de veau fœtal inactivé. Nous avons centrifugé les tubes à 2000 g, pendant 2 minutes à température ambiante puis nous avons ôté le surnageant et ajouté 100 µl de milieu FACS Max (amsbio, réf T200100). Nous avons ensuite placé les queues sur un tamis cellulaire (diamètre 40 µm, Dutscher, réf 141378C), préalablement humidifié avec 100 µl de milieu FACS Max, et nous avons utilisé un piston de seringue de 1 ml afin de filtrer les cellules. Nous avons rincé le tamis avec 400 µl de milieu FACS Max afin de récolter les cellules, que nous avons placées dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Nous avons immédiatement trié les cellules exprimant la GFP grâce à un trieur cellulaire ARIA Fusion et une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. Nous avons conservé les cellules exprimant la GFP à -80 °C, dans 10 µl de PBS-RNAsine 1 U/µl.

Tableau 6: Nombre de cellules, de reads et de reads mappés de manière unique pour chaque échantillon utilisé lors de l'expérience de séquençage des ARNm

	Nombre de cellules	Nombre de reads	% de reads mappés de manière unique
chd8 ^{+/+} #1	1200	41 503 654	85,08 %
chd8 ^{+/+} #2	1300	43 037 398	87,69 %
chd8 ^{+/+} #3	959	41 638 176	89,33 %
chd8 ^{+/+} #4	1260	40 329 030	90,52 %
chd8 ^{+/sa19827} #1	1225	48 907 314	87,65 %
chd8 ^{+/sa19827} #2	1200	44 731 334	87,98 %
chd8 ^{+/sa19827} #3	1100	40 896 960	87,84 %
chd8 ^{+/sa19827} #4	1079	43 332 847	88,05 %

Les bibliothèques ont ensuite été préparées avec le kit « SMARTer Universal Low Input RNA Kit for Sequencing », puis elles ont été multiplexées, rassemblées et séquencées (1x50 bases) sur une ligne avec un séquenceur Illumina HiSeq 4000. Les reads ont été prétraités avec cutadapt version 1.10 et mappés sur le génome du poisson-zèbre (version GRCz11) grâce au logiciel STAR version 2.5.3a. Pour toutes les conditions, plus de 85 % des reads ont été mappés à une seule localisation et ont pu être utilisés pour quantifier l'expression des gènes grâce à htseq-

count version 0.6.1p1, avec les annotations d'Ensembl version 98 et en mode "union". Un des échantillons *chd8*^{+/+} a été exclu de l'analyse car *chd8* n'y était pas exprimé, contrairement aux autres échantillons *chd8*^{+/+}. La comparaison du transcriptome des CCN entériques des larves *chd8*^{+/+} et *chd8*^{sa19827} a été réalisée en utilisant le test Wald pour l'expression différentielle du package Bioconductor de DESeq2 version 1.16.1. La méthode Benjamini and Hochberg a été utilisée pour ajuster les p-values.

SEQUENÇAGE DES ARN SUR CELLULE UNIQUE DANS L'INTESTIN DE POISSON-ZEBRE ADULTE

Nous avons euthanasié des poissons-zèbre adultes mâles *chd8*^{+/+} et *chd8*^{sa19827/sa19827} en les plaçant dans une solution de tricaine à 800 µg/ml. Nous avons disséqué les poissons et prélevé la partie de leur tube digestif postérieure au bulbe intestinal, que nous avons placée dans du RPMI à température ambiante. Nous avons roulé les intestins sur du papier absorbant humidifié avec du RPMI, afin d'ôter les résidus de graisse, puis nous avons placé les intestins dans du RPMI additionné de sérum de veau fœtal à 10 % et nous avons utilisé un scalpel afin de les couper en petits morceaux que nous avons placés dans 1 ml de milieu de digestion (1 ml de RPMI + 12 µl de sérum de veau fœtal inactivé + 10 mg de collagénase dispase) pendant 15 minutes, à 37 °C, sous agitation à 500 rpm. Nous avons ensuite séparé les cellules en filtrant la suspension sur un tamis cellulaire (diamètre 40 µm), à l'aide d'un piston de seringue de 1 ml.

Nous avons estimé la concentration des cellules et leur viabilité en les marquant au bleu Trypan et en les dénombrant avec une chambre de comptage de Neubauer. La viabilité était supérieure à 70 % et 10 000 cellules ont été chargées dans le 10X Genomics Chromium Controller. Les bibliothèques ont été préparées grâce au kit « library prep for 3' mRNAseq on single cell » (10X Genomics). Les bibliothèques ont ensuite été multiplexées, rassemblées et séquencées (1x100 pb) sur deux lignes avec un séquenceur Illumina HiSeq 4000. Les reads ont été mappés sur le génome du poisson-zèbre (version GRCz11) et l'expression des gènes a été quantifiée grâce au logiciel Cell Ranger 3.1.0.

IMMUNOMARQUAGES SUR DES LARVES DE POISSON-ZEBRE

Nous avons fixé les larves de poisson-zèbre en PFA 4 % pendant 1 à 3 heures, puis nous les avons incubées 10 minutes en PBS-Triton 0,5 % et lavées trois fois en PBS-Triton 0,1 % pendant 30 minutes, à température ambiante. Nous avons ensuite incubé les larves dans une solution de blocage (PBS-Triton 1 % - DMSO 1 % - BSA 1 % - FBS 1 %) pour 1 heure à température

ambiante. Nous avons incubé les larves dans une solution d'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage, toute la nuit, à température ambiante. Le lendemain, nous avons rincé trois fois les larves en PBS-Triton 0,1 % pour 30 minutes à température ambiante avant d'incuber les larves dans une solution d'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage, pendant 2 heures à température ambiante, dans le noir. Les larves marquées sont conservées en PBS, à 4 °C, dans le noir.

Tableau 7: Anticorps utilisés pour les immunomarquages.

Protéine cible	Fabricant	Espèce	Dilution
HuC/HuD	Invitrogen, A-21271	Souris	1 :200
5-HT	Sigma, S5545-25UL	Lapin	1 :500
PH3	Santa Cruz Biotechnology, sc-8656-R	Lapin	1 :750
GFAP	Thermo Scientific, OPA1-06100	Lapin	1 :500
IgG (H+L) Souris - Alexa Fluor 594	Invitrogen, A-11005	Chèvre	1 :500
IgG (H+L) Souris - Alexa Fluor 488	Invitrogen, A-11001	Chèvre	1 :500
IgG (H+L) Lapin - Alexa Fluor 594	Invitrogen, A-32754	Âne	1 :500
IgG (H+L) Lapin - Alexa Fluor 488	Invitrogen, A-21206	Âne	1 :500

MARQUAGE TUNEL

Nous avons fixé les larves de poisson-zèbre en PFA 4 % sur la nuit, puis nous les avons transférées dans du méthanol 100 % et nous les avons conservées à -20 °C jusqu'au jour du marquage. Le marquage a été réalisé avec le kit ApoTag Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection (Merck-Millipore, réf S7110) Nous avons réhydraté les larves en les incubant dans des concentrations décroissantes de méthanol, pendant 10 minutes à chaque étape. Nous avons perméabilisé les larves en les plaçant dans de la Protéinase K diluée à 10 µg/ml dans du PBS pendant 5 minutes, puis nous les avons rincées deux fois 3 minutes dans de l'eau distillée. Nous avons post-fixé les larves dans de la PFA à 4 %, pendant 20 minutes, à température ambiante. Nous avons transféré les larves dans une solution d'éthanol et d'acide acétique (2vol :1vol) pré-refroidie et nous avons incubé les larves à -20 °C pendant 10 minutes. Nous avons ensuite rincé les larves trois fois 5 minutes dans du PBS-Tween 0,1 %. Nous avons incubé les larves 1 heure dans le tampon d'équilibrage, puis nous les avons incubées pendant la nuit

dans l'enzyme TdT, à 37 °C. Le lendemain, nous avons stoppé la réaction en plaçant les larves dans le tampon Stop/Wash, pendant 15 minutes à température ambiante. Nous avons rincé les larves trois fois 5 minutes dans du PBS et nous les avons incubées 1 heure dans l'anticorps anti-digoxigénine, dilué dans la solution de blocage, à température ambiante. Nous avons enfin rincé les larves trois fois 5 minutes dans du PBS.

IMAGERIE ET DENOMBREMENT DU NOMBRE DE CELLULES DE L'INTESTIN

Nous avons imagé les larves transgéniques et les larves immunomarquées dans du PBS-Tween 0,1 % en vue latérale, en utilisant un microscope MacroFluo ORCA Flash (Leica). Nous avons imagé au moins 15 larves par condition en réalisant des piles d'images en z. Nous avons utilisé le logiciel ImageJ pour réaliser une projection « Intensité Maximum » et nous avons dénombré les cellules fluorescentes en utilisant le plugin ICTN.

ANALYSE DU COMPORTEMENT DE LARVES DE POISSON-ZEBRE

Nous avons croisé des poissons *chd8^{+/+}* entre eux et des poissons *chd8^{+/sa19827}* entre eux. A 7 jours post-fécondation, nous avons placé une larve par puits dans une plaque 24 puits à fond plat. Nous avons ensuite suivi les mouvements de chaque larve pendant 24 heures, 14 heures de jour et 10 heures de nuit, grâce à la Zebrabox (Viewpoint). Nous avons ensuite calculé la distance parcourue par chaque larve par période 30 minutes. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec la plateforme AMATrace (Université Paris-Saclay) et constitue des résultats préliminaires. Nous sommes actuellement en train de répéter cette expérience sur des larves issues du croisement de poissons *chd8^{+/+}* et *chd8^{sa19827/sa19827}* avec des poissons AB. Cette deuxième expérience est réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Ravindra Peravali, du Karlsruhe Institut für Technologie.

II. RESULTATS

LA LIGNEE MUTANTE *chd8sa19827* REPRODUIT LES SIGNES CLINIQUES PRESENTS CHEZ LES INDIVIDUS PORTEURS D'UNE MUTATION DANS *CHD8*.

Afin d'étudier les effets de la perte de fonction de *chd8* sur les neurones entériques, nous avons obtenu une lignée de poisson-zèbre porteuse d'une mutation dans le gène *chd8*. Dans la lignée *chd8sa19827*, la mutation c.C667T (p.Glu223*) entraîne l'apparition d'un codon-stop précoce dans l'exon 3, qui est le premier exon codant de *chd8*.

Nous avons tout d'abord vérifié que la lignée *chd8sa19827* présentait les mêmes phénotypes que les individus porteurs d'une mutation dans *CHD8*. Ces individus présentent un TSA associé à une macrocéphalie (80 % des cas), des troubles gastro-intestinaux (80 % des cas) et des troubles du sommeil (67 % des cas).[137]

Premièrement, nous avons cherché à savoir si la lignée *chd8sa19827* présentait une macrocéphalie. Nous avons donc fixé des larves de poisson-zèbre sauvages et *chd8^{+/sa19827}* à 5 jours post-fécondation et mesuré la distance entre les yeux. (**Figure 1A**) En effet, à ce stade de développement, la distance entre les yeux est proportionnelle à la taille de la tête.[53] Nous avons observé une augmentation significative de la taille de la tête chez les larves *chd8^{+/sa19827}*, par rapport aux larves contrôles (p-value = $7,198 \cdot 10^{-5}$) (**Figure 1A'**).

Nous avons ensuite vérifié que la lignée *chd8sa19827* présentait une diminution du nombre de neurones entériques, conformément à ce qui a été précédemment décrit par Bernier *et al.* [137] en utilisant un modèle poisson-zèbre dans lequel l'expression de *chd8* avait été transitoirement diminuée. Pour cela, nous avons réalisé un immunomarquage, avec un anticorps dirigé contre HuC/D, une protéine exprimée par les neurones post-mitotiques, sur des larves sauvages et mutantes à 5 jours post-fécondation (**Figure 1B**). Nous avons imagé les larves en vue latérale et dénombré les neurones entériques et nous avons observé une diminution significative du nombre de neurones entériques chez les larves *chd8^{+/sa19827}*, par rapport aux larves *chd8^{+/+}* (p-value= $6,665 \cdot 10^{-15}$). Cette diminution du nombre de neurones entériques était plus importante chez les larves *chd8^{sa19827/sa19827}* que chez les larves *chd8^{+/sa19827}* (p-value *chd8^{+/sa19827} / chd8^{sa19827/sa19827}* = $3,365 \cdot 10^{-05}$; p-value *chd8^{sa19827/sa19827} / chd8^{+/+}* < $2,2 \cdot 10^{-16}$).

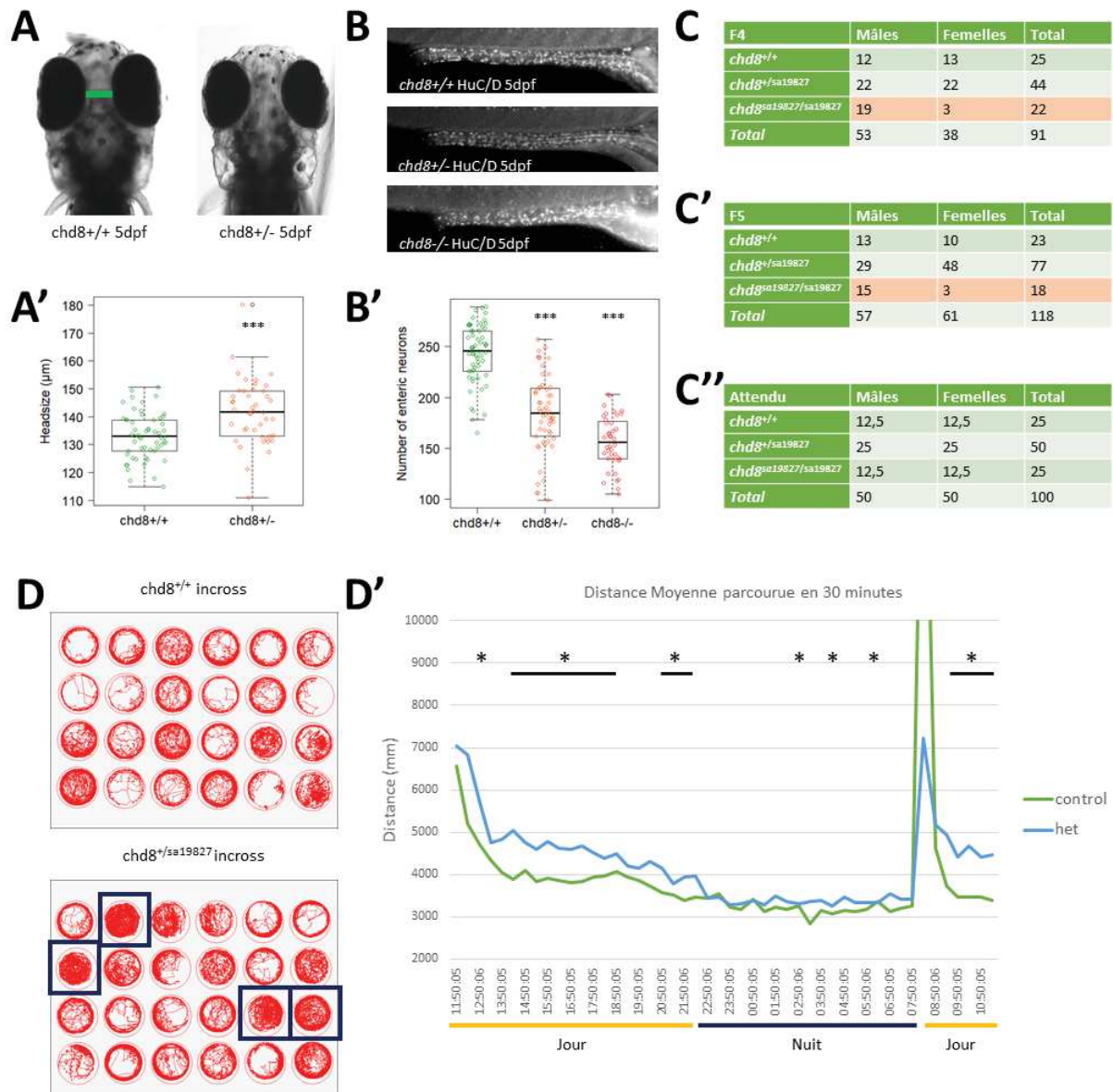


Figure 1: La lignée *chd8sa19827* reproduit les phénotypes présents chez les individus porteurs d'une mutation dans *CHD8*. (A-A') : Larves de poisson-zèbre, à 5 dpf, en vue dorsale. La barre verte représente la distance entre les yeux, utilisée comme mesure de la taille de la tête. La distance entre les yeux a été mesurée et la distribution des mesures a été comparée entre les conditions. Un t-test a été réalisé entre paires de conditions. **(B-B') :** Immunomarquage de larves de poisson-zèbre avec un anticorps anti-HuC/D montre, à 5 dpf, en vue latérale, les neurones entériques. Les neurones entériques ont été dénombrés et la distribution des mesures a été comparée entre les conditions. Un t-test a été réalisé entre paires de conditions. **(C-C')** Les poissons-zèbres adultes de deux générations successives générées à partir d'un croisement *chd8^{+/sa19827} x chd8^{+/sa19827}* ont été sexés. Le sex-ratio a été comparé à celui attendu **(C'')** et un test exact de Fisher a été réalisé. **(D-D')** : Les mouvements de larves de poisson-zèbre ont été suivis pendant 24 heures. La trace des larves pendant 30 minutes est montrée, les larves présentant une activité supérieure aux autres sont encadrées en bleu. La distance moyenne parcourue par les larves a été comparée entre les conditions et un t-test a été réalisé toutes les 30 minutes. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01 ; *** : p-value < 0,001.

En plus de ces phénotypes caractéristiques des individus porteurs d'une mutation dans *CHD8*, nous avons remarqué un sex-ratio anormal parmi les poissons *chd8^{sa19827/sa19827}*. Après avoir génotypé les individus adultes issus d'un croisement *chd8^{+/sa19827}* x *chd8^{+/sa19827}*, nous les avons sexés. Nous avons effectué cette expérience sur deux générations successives. (**Figure 1C et 1C'**) La proportion des trois génotypes dans chaque génération n'est pas significativement différente de celle attendue. De même, le sex-ratio de chaque génération n'est pas significativement différent du ratio attendu (1 :1) (**Figure 1C''**). En revanche, parmi les poissons *chd8^{sa19827/sa19827}*, mais pas les poissons *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}*, le sex-ratio est significativement différent de celui attendu : on observe environ 1 femelle pour 5 mâles, pour les deux générations testées (Test Exact de Fisher, p-value F4 = 0,0017 et p-value F5 = 0,0099).

Enfin, nous avons monitoré l'activité de larves issues de croisements entre *chd8^{+/+}* et entre *chd8^{+/sa19827}* pendant 24 heures. (**Figure 1D**) Nous avons observé que les larves issues d'un croisement entre poissons *chd8^{+/sa19827}* parcourent une plus grande distance en 30 minutes que les larves *chd8^{+/+}*, durant la journée et la nuit. (**Figure 1D'**)

LA PERTE DE FONCTION DE *chd8* ENTRAINE DES DEFAUTS DE MIGRATION DES PROGENITEURS NEURONAUX.

Afin de comprendre l'origine de la diminution du nombre de neurones entériques, nous avons exploré plusieurs hypothèses : la migration, la prolifération et/ou la différenciation des cellules de la crête neurale vagale (CCN) – les progéniteurs des neurones entériques – pourraient être affectées. Nous avons également émis l'hypothèse d'une diminution du nombre de CCN émergeant du tube neural.

Tout d'abord, nous avons dénombré les CCN effectuant la transition épithélium-mésenchyme au niveau du tube neural. Pour cela, nous avons croisé des mâles *chd8^{+/+}* et *chd8^{sa19827/sa19827}* avec des femelles *tg(phox2bb :GFP)*. Nous avons fixé les embryons *tg(chd8^{+/+} ;phox2bb :GFP)* et *tg(chd8^{+/sa19827} ;phox2bb :GFP)* à 24 hpf, nous les avons imagés en vue latérale et nous avons dénombré les CCN, et mesuré la distance maximale séparant les CCN du tube neural. (**Figure 2A**) Nous avons observé une diminution significative du nombre de CCN chez les embryons *chd8^{+/sa19827}*, par rapport aux embryons *chd8^{+/+}* à 24 hpf (t-test, p-value = 8,675.10⁻⁵) (**Figure 2A'**). Nous avons également noté une diminution significative de la distance de migration des CCN à 24 hpf chez les embryons *chd8^{+/sa19827}*, par rapport aux embryons *chd8^{+/+}* (t-test, p-value = 0,0004538). (**Figure 2A'**)

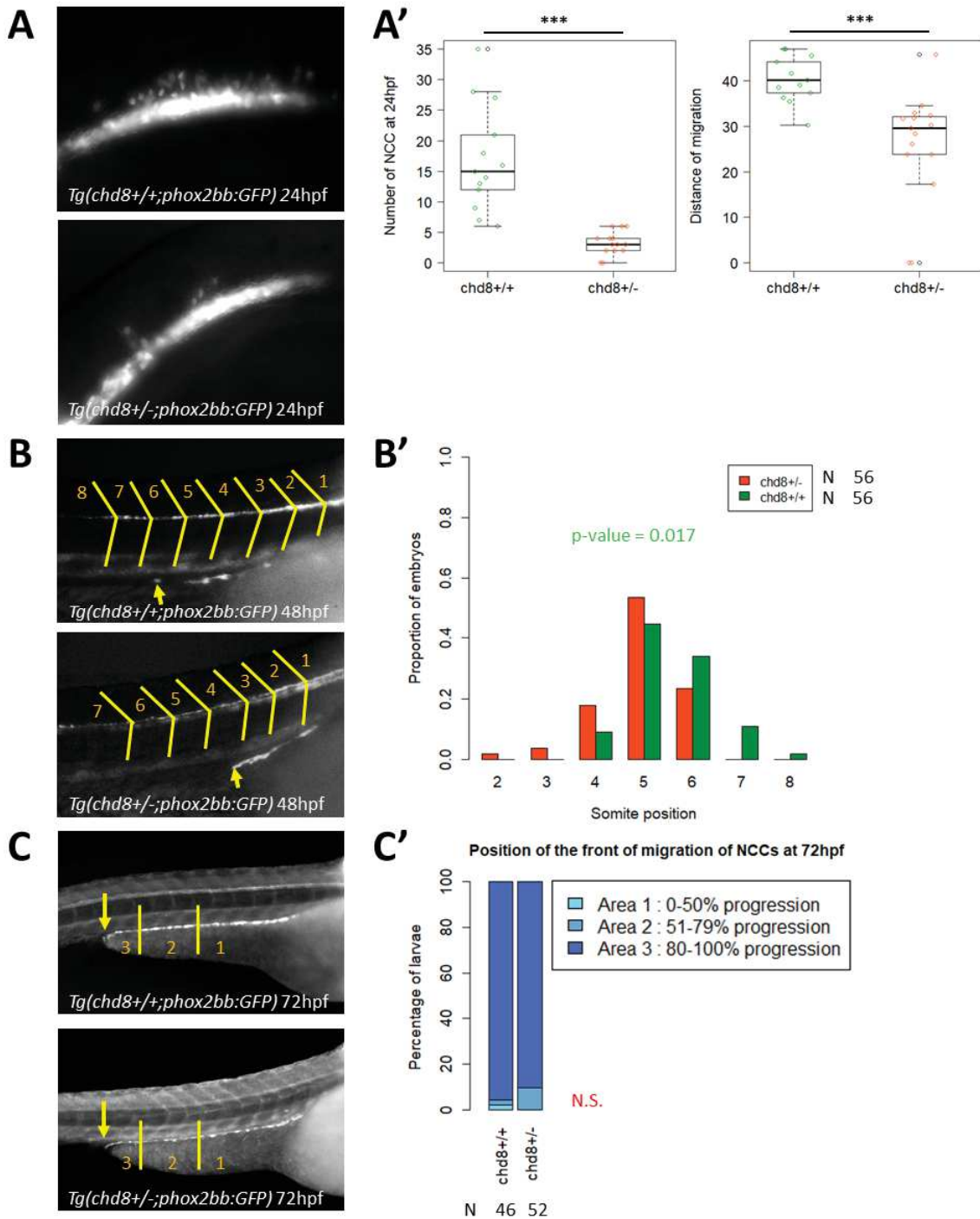


Figure 2 : Le nombre et la migration des CCN entériques sont altérés chez les larves de la lignée *chd8*^{sa19827}. (A-A') : Embryons de poisson-zèbre, exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *phox2bb*, à 24 hpf, en vue latérale. Les CCN ont été dénombrées, la distance maximale de migration mesurée, et la distribution des mesures a été comparée entre les conditions. Un t-test a été réalisé entre paires de conditions. (B-B') : Larves de poisson-zèbre, exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *phox2bb*, à 48 hpf, en vue latérale. Les somites sont dessinés en jaune et le front de migration est indiqué par une flèche jaune. La position du front de migration par rapport aux somites a été évaluée et la distribution des mesures a été comparée entre les conditions. Un test exact de Fisher a été réalisé entre paires de conditions. (C-C') : Larves de poisson-zèbre, exprimant la GFP sous

le contrôle du promoteur de *phox2bb*, à 72 hpf, en vue latérale. La position du front de migration a été évaluée en mesurant la proportion de l'intestin colonisé par les CCN. La distribution des mesures a été comparée entre les conditions et un test exact de Fisher a été réalisé entre paires de conditions. N.S. : non significatif

Nous avons ensuite suivi la migration des cellules de la crête neurale vagale le long de l'intestin. Pour cela, nous avons croisé des mâles *chd8^{+/+}* et *chd8^{sa19827/sa19827}* avec des femelles *tg(phox2bb :GFP)*. Nous avons fixé les larves *tg(chd8^{+/+} ;phox2bb :GFP)* et *tg(chd8^{+/sa19827} ;phox2bb :GFP)* à 48 et 72 heures post-fécondation, nous les avons imagées en vue latérale et nous avons évalué l'état d'avancement de la migration des CCN, en prenant pour repère les somites. (**Figure 2B et 2C**) Nous avons observé un retard significatif d'environ 2 somites des CCN chez les larves *chd8^{+/sa19827}*, par rapport aux larves *chd8^{+/+}* à 48 heures post-fécondation (Test Exact de Fisher, p-value = 0,017) (**Figure 2B'**). Cependant, les CCN parviennent à atteindre l'extrémité distale de l'intestin à 72 heures post-fécondation chez les larves *chd8^{+/sa19827}*, comme chez les larves *chd8^{+/+}* (**Figure 2C'**) (Test Exact de Fisher, p-value = 0,1515).

Ensuite, nous avons voulu déterminer si la prolifération des CCN était réduite chez les larves *chd8^{+/sa19827}*. Tout d'abord, nous avons croisé des mâles *chd8^{+/+}* et *chd8^{sa19827/sa19827}* avec des femelles *tg(phox2bb :GFP)*. Nous avons fixé les larves *tg(chd8^{+/+} ;phox2bb :GFP)* et *tg(chd8^{+/sa19827} ;phox2bb :GFP)* à 4 et 5 heures post-fécondation, nous les avons imagées en vue latérale et nous avons dénombré les CCN. (**Figure 3A**) Nous avons observé une diminution significative du nombre de CCN chez les larves *chd8^{+/sa19827}*, par rapport aux larves *chd8^{+/+}*, à 4 et 5 jours post-fécondation (t-test, p-value à 4 jpf = $1,954 \cdot 10^{-9}$ et p-value à 5 jpf = $2,634 \cdot 10^{-5}$) (**Figure 3A'**). Cependant, l'augmentation du nombre de neurones entériques entre 4 et 5 jours post-fécondation est comparable entre les larves *tg(chd8^{+/+} ;phox2bb :GFP)* et *tg(chd8^{+/sa19827} ;phox2bb :GFP)*, ce qui indiquerait qu'il n'y a pas de défaut de prolifération. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé un immunomarquage avec un anticorps anti-phosphohistone H3 (PH3) – un marqueur des cellules en cours de mitose – sur des larves *tg(chd8^{+/+} ;phox2bb :GFP)* et *tg(chd8^{+/sa19827} ;phox2bb :GFP)* à 4 jours post-fécondation. (**Figure 3B**) Nous avons observé une augmentation significative du nombre total de cellules mitotiques dans l'intestin des larves *tg(chd8^{+/sa19827} ;phox2bb :GFP)* par rapport aux contrôles (t-test, p-value = $1,088 \cdot 10^{-9}$) (**Figure 3C**). Cependant, nous n'avons pas noté de différence significative du nombre de CCN en cours de mitose chez les larves

$tg(chd8^{+/sa19827};phox2bb :GFP)$ par rapport aux larves $tg(chd8^{+/+};phox2bb :GFP)$ (t-test, p-value = 0,1973)(Figure 3C').

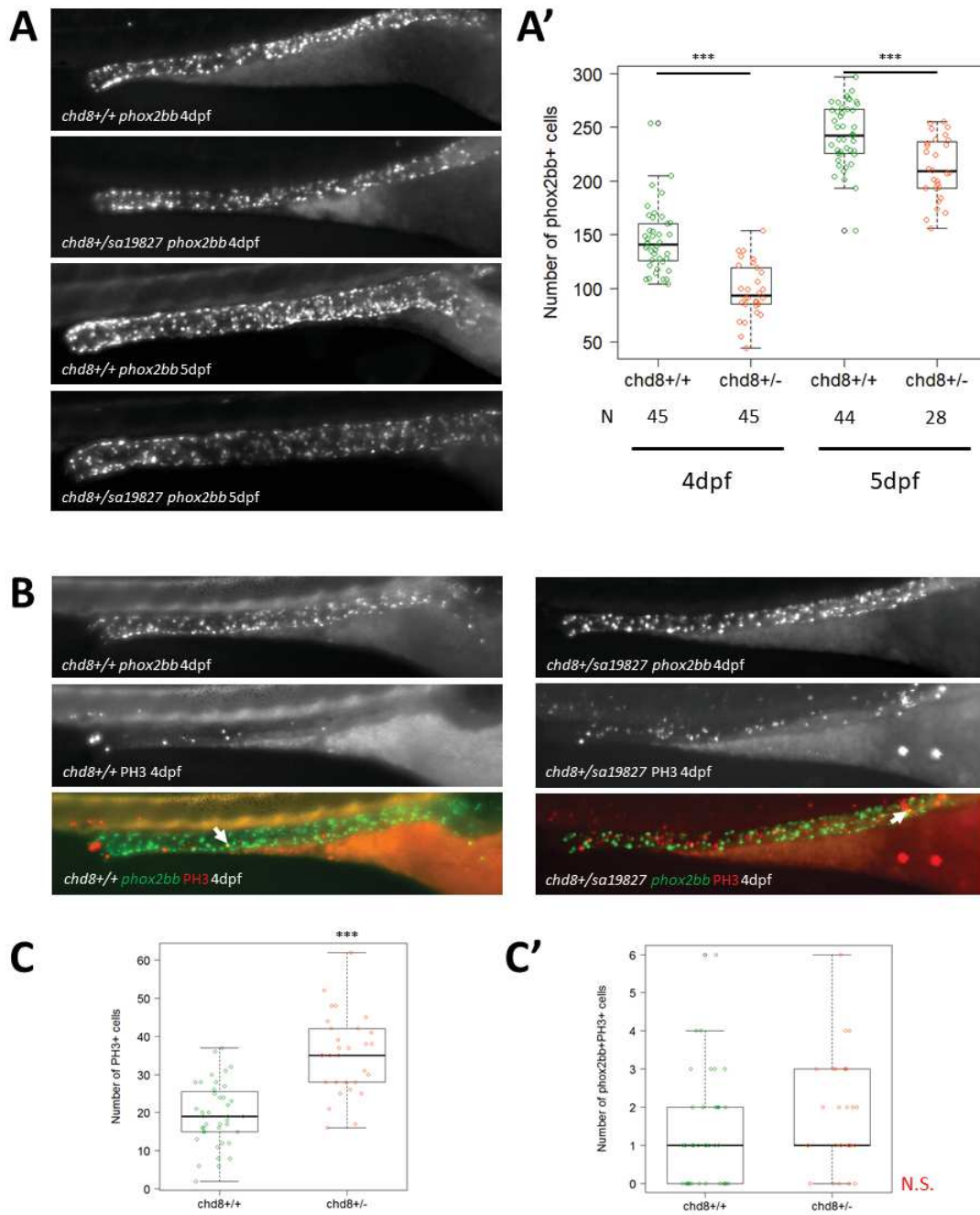


Figure 3: La lignée *chd8sa19827* présente une sur-prolifération cellulaire anormale dans l'intestin à 4 dpf. (A-A') : Larves de poisson-zèbre exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *phox2bb*, à 4 et 5 jpf, en vue latérale. Les CCN entériques ont été dénombrées et la distribution des mesures a été comparée entre les conditions. Un t-test a été réalisé entre paires de conditions. **(B-B')** : L'immunomarquage de larves de poisson-zèbre, exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *phox2bb*, avec un anticorps anti-PH3 montre, à 4 jpf, en vue latérale, les CCN entériques et les cellules mitotiques. Les cellules mitotiques (PH3 positives) et les CCN mitotiques (PH3 et *phox2bb* positives) ont été dénombrées et la distribution des mesures a été comparée entre

les conditions. Un t-test a été réalisé entre paires de conditions. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01 ; p-value < 0,001 ; N.S. : non significatif.

Puisque nous n'avons pas observé de défaut de prolifération des CCN, nous avons réalisé un marquage TUNEL afin de dénombrer les cellules en apoptose dans l'intestin de larves *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}* à 4 jours post-fécondation. Nous avons imagé les larves en vue latérale, et nous n'avons pas observé d'apoptose dans l'intestin pour les larves *chd8^{+/+}*, ni pour les larves *chd8^{+/sa19827}*. (Figure S1)

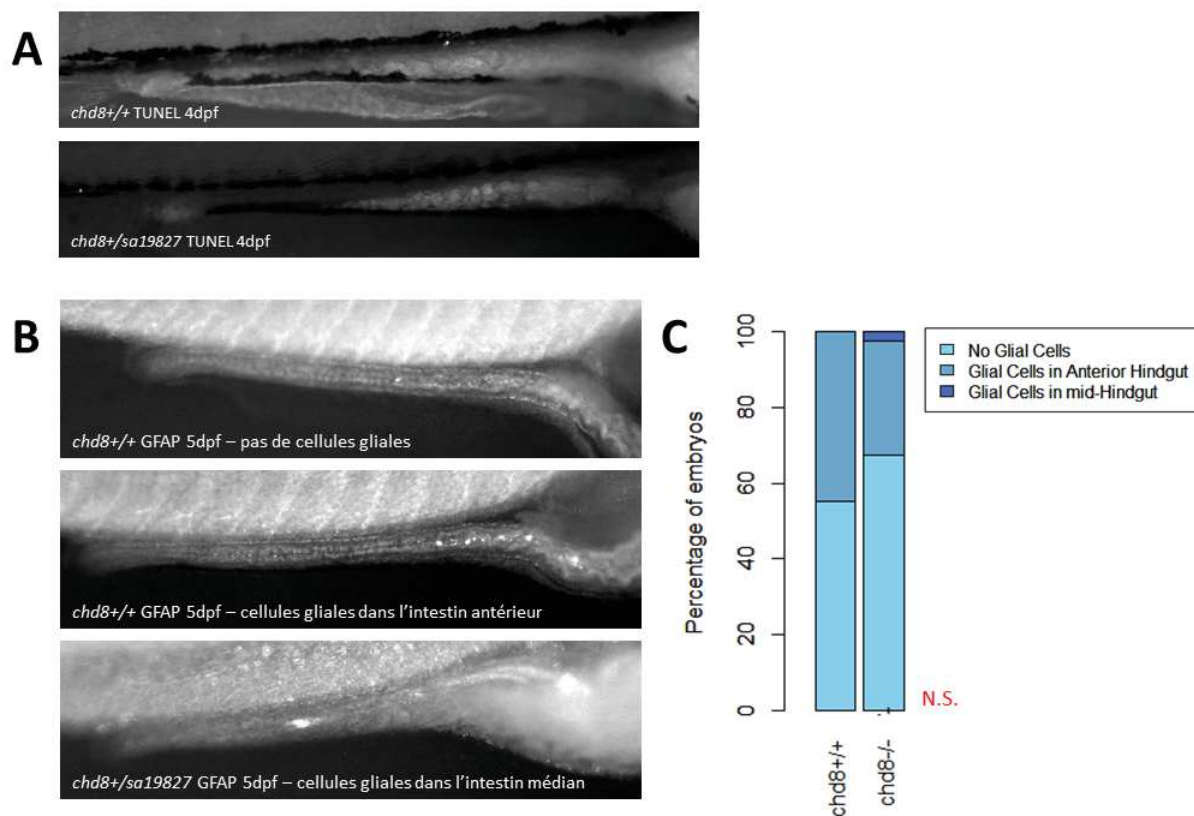


Figure S 1: Il n'y a pas défaut d'apoptose ou de différenciation des CCN entériques chez les larves de la lignée *chd8sa19827*. **A** : L'immunomarquage de larves de poisson-zèbre grâce à la technique TUNEL montre, à 4 jpf, en vue latérale, les cellules apoptotiques. Nous n'avons pas observé de différence entre les larves *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}*. **B** : L'immunomarquage de larves de poisson-zèbre avec un anticorps anti-GFAP montre, à 5 jpf, en vue latérale, les cellules gliales. Les larves ont été classées en trois catégories, basées sur la présence et la localisation de cellules exprimant la GFAP. **C** : La répartition des larves dans les trois catégories a été comparée entre les conditions et un test exact de Fisher a été réalisé entre paires de conditions. N.S. : non significatif.

Les CCN peuvent donner naissance à la fois aux neurones et aux cellules gliales de l'intestin. Nous avons voulu vérifier si l'équilibre entre ces deux destins cellulaires était affecté chez les larves *chd8^{+/sa19827}*. Nous avons donc réalisé un immunomarquage avec un anticorps anti-

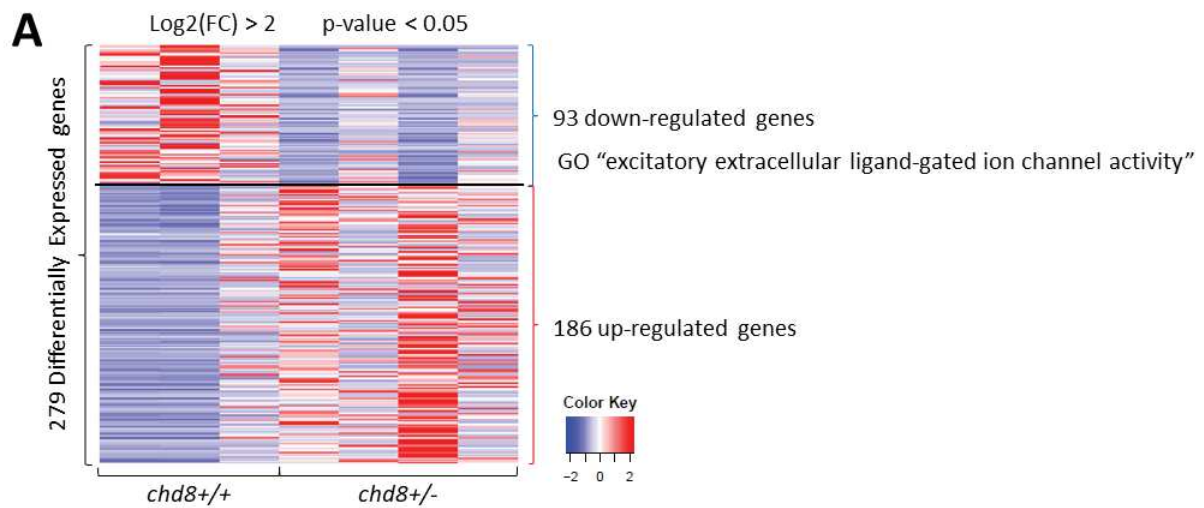
GFAP – une protéine fibrillaire synthétisée par les cellules gliales – sur des larves *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}* à 5 jpf. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les larves *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}* : environ 65 % des larves ne présentaient pas de cellules synthétisant la GFAP et environ 45 % présentaient quelques cellules positives pour la GFAP dans la partie antérieure de l'intestin (test exact de Fisher, p-value = 0,2419). (**Figure S1**)

LA PERTE DE *chd8* ENTRAINE UNE DEREGULATION DU TRANSCRIPTOME DES PROGENITEURS DES NEURONES ENTERIQUES.

Afin de comprendre l'origine des défauts observés chez les larves *chd8^{+/sa19827}*, nous avons réalisé un séquençage des ARNm des CCN vagales. Pour cela, nous avons disséqué l'intestin de larves *tg(chd8^{+/+};phox2bb:GFP)* et *tg(chd8^{+/sa19827};phox2bb:GFP)* à 4 jours post-fécondation, nous avons dissocié les cellules et trié celles exprimant la GFP – les CCN vagales – et séquencé les ARNm par séquençage à haut débit. Nous avons séquencé 4 échantillons *chd8^{+/+}* et 4 échantillons *chd8^{+/sa19827}*, chaque échantillon étant composé de 900 à 1200 CCN obtenues à partir d'un lot de 80 larves. Le gène *chd8* n'était pas exprimé dans l'un des échantillons *chd8^{+/+}* et par conséquent, nous l'avons exclu de nos analyses.

Au total, 279 gènes étaient différentiellement exprimés (DE) entre les CCN *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}* ($|\log_2(\text{FC})| > 2$ et p-value ajustée $< 0,05$). 186 gènes étaient surexprimés chez les larves *chd8^{+/sa19827}* par rapport aux larves *chd8^{+/+}* et 93 étaient sous-exprimés (**Figure 4A**).

Nous avons réalisé une analyse des termes GO, grâce à la base de données geneontology.org, et nous avons noté que le terme « excitatory extracellular ligand-gated ion channel activity » était significativement enrichi parmi les gènes sous-exprimés (p-value = $8,95 \cdot 10^{-6}$). De plus, nous avons utilisé l'outil d'annotation fonctionnelle de DAVID (version 6.8) pour analyser tous les gènes DE et nous avons observé un enrichissement significatif de gènes impliqués dans le « complexe de canaux régulés par l'acétylcholine » et dans « la liaison à l'acétylcholine » (p-value = 0,011 et p-value = 0,041, respectivement). Nous avons aussi noté que 80 gènes DE codent des « composants de la membrane » et que 13 gènes DE font partie de la voie de signalisation KEGG « interaction récepteur-ligand neuro-actif », bien que ces deux catégories ne soient pas significativement enrichies. (**Figure 4A et 4B**)



B

		Nombre de gènes	p-value	Benjamini	
Cluster 1	GOTERM_CC_DIRECT	acetylcholine-gated channel complex	4	0,000087	0,0037
	GOTERM_MF_DIRECT	acetylcholine binding	4	0,00011	0,012
	INTERPRO	Nicotinic acetylcholine-gated receptor, transmembrane domain	4	0,00012	0,022
	GOTERM_BP_DIRECT	cation transmembrane transport	4	0,00021	0,032
	GOTERM_BP_DIRECT	synaptic transmission, cholinergic	4	0,00036	0,028
	KEGG_PATHWAY	Neuroactive ligand- receptor interaction	8	0,00043	0,0086
	UP_KEYWORDS	Transport	12	0,0007	0,049
	GOTERM_BP_DIRECT	transport	13	0,00077	0,039
	GOTERM_CC_DIRECT	postsynaptic membrane	4	0,0026	0,036
		Nombre de gènes	p-value	Benjamini	
Cluster 2	GOTERM_CC_DIRECT	hemoglobin complex	3	0,0018	0,036

Figure 4: Gènes différenciellement exprimés chez les larves *chd8^{sa19827}* et leur annotation fonctionnelle. A : La heatmap montre l'expression des gènes (en nombre de reads; avec une correction pour l'effet de lot ; chaque ligne représente un gène) pour les 279 gènes différenciellement exprimés. Les 93 gènes sous-exprimés dans les larves *chd8^{+/sa19827}* sont montrés dans la partie supérieure et les 186 gènes sur-exprimés sont montrés dans la partie inférieure. Le terme GO "excitatory extracellular ligand-gated ion channel activity" était le seul statistiquement enrichi pour les gènes sous-exprimés (geneontology.org). **B :** Les voies de signalisation et termes identifiés comme significativement enrichis par DAVID (p-value ajustée < 0,05) dans les gènes sous-exprimés sont montrés.

Nous avons ensuite réalisé une analyse STRING sur la liste complète des gènes DE et nous avons observé que le réseau d'interactions Protéine-Protéine (PPI) possédait significativement plus de nœuds que ce qui était attendu (p-value = $1,36 \cdot 10^{-7}$), ce qui pourrait indiquer que les gènes régulés par *chd8* dans les CNN vagues sont connectés biologiquement. (**Figure 5**) Nous avons donc groupé les gènes impliqués dans le réseau PPI, en utilisant la méthode de

regroupement MCL et un paramètre d'inflation de 3,1. Nous avons trouvé un groupe de 14 gènes dont 4 font partie de la voie de signalisation de la sérotonine et un groupe de 4 gènes dont 3 sont des récepteurs nicotinergiques de l'acétylcholine. (**Figure 5**)

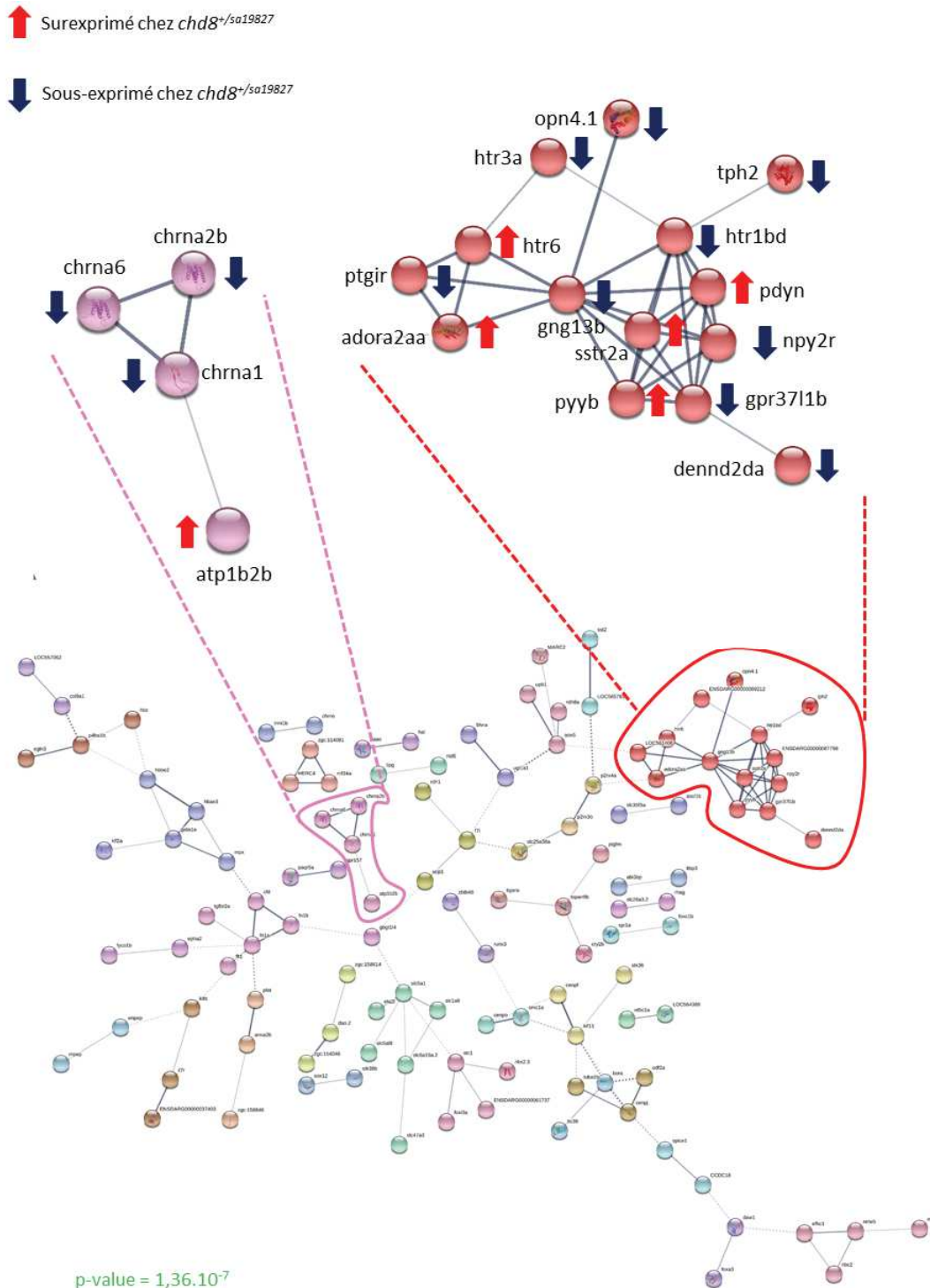


Figure 5: *chd8* régule un réseau de gènes. Le réseau d'interactions Protéine-Protéine (PPI) des gènes différemment exprimés dans les larves *chd8^{+/sa19827}* est montré dans la partie inférieure de la figure. Les nœuds ne présentant pas d'interactions avec les autres protéines du réseau PPI ne sont pas montrés. Les gènes

du réseau ont été regroupés, en utilisant la méthode de regroupement MCL et un paramètre d'inflation de 3,1, et un regroupement de 14 gènes et un autre de 4 gènes sont montrés en détail dans la partie supérieure de la figure. Le réseau PPI est présenté en Annexe 4.

De plus, parmi les gènes DE, nous avons trouvé 14 gènes dont l'orthologue humain est référencé dans la base de données SFARI et 74 gènes dont l'orthologue humain est associé avec une maladie listée dans la base de données OMIM.

Enfin, nous avons observé que *nrOb1* et *akr1c4*, deux gènes dont les orthologues sont impliqués dans l'inversion sexuelle 46 XY (MIM 300473 et 600451, respectivement) chez l'humain, sont sous-exprimés chez les larves *chd8^{+/sa19827}* par rapport aux larves *chd8^{+/+}* (p-value ajustée = 0,0014 et p-value ajustée = 0,014, respectivement). Cette observation pourrait expliquer, au moins en partie, le biais du sex-ratio observé chez les poissons-zèbres *chd8^{sa19827/sa19827}*. (**Figure 1C, C' et 1C''**)

LA PERTE DE *chd8* ENTRAINE DES PERTURBATIONS DU METABOLISME DE LA SEROTONINE.

Chez les individus atteints de TSA, le niveau de sérotonine dans le sang est plus élevé que chez les individus neurotypiques. [183] De plus, nous avons observé que plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme de la sérotonine (*slc6a19.2*, *tph2*, *htr1d*, *htr3a*, *htr6*, *aox5*) sont différentiellement exprimés entre les larves *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}*. (**Figure 6A**) Nous avons donc voulu étudier l'impact de la mutation de *chd8* sur le nombre de cellules sérotonergiques dans l'intestin et nous avons réalisé un double immunomarquage, en utilisant des anticorps dirigés contre HuC/D et contre la sérotonine (5-HT), sur des larves *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}* à 5 jours post-fécondation. (**Figure 6B**). Nous avons imagé les larves en vue latérale et dénombré les neurones (cellules exprimant HuC/D), les cellules sérotonergiques (cellules exprimant 5-HT) et les neurones sérotonergiques (cellules exprimant à la fois HuC/D et 5-HT). Nous avons observé une diminution significative du nombre de neurones sérotonergiques dans l'intestin des larves *chd8^{+/sa19827}* par rapport aux larves *chd8^{+/+}* (p-value = 0,0002968)(**Figure 6C**).

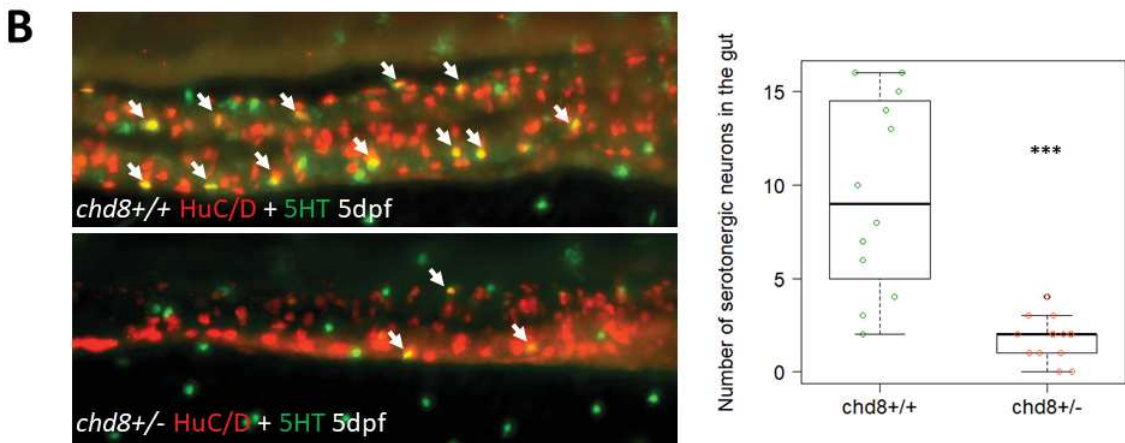
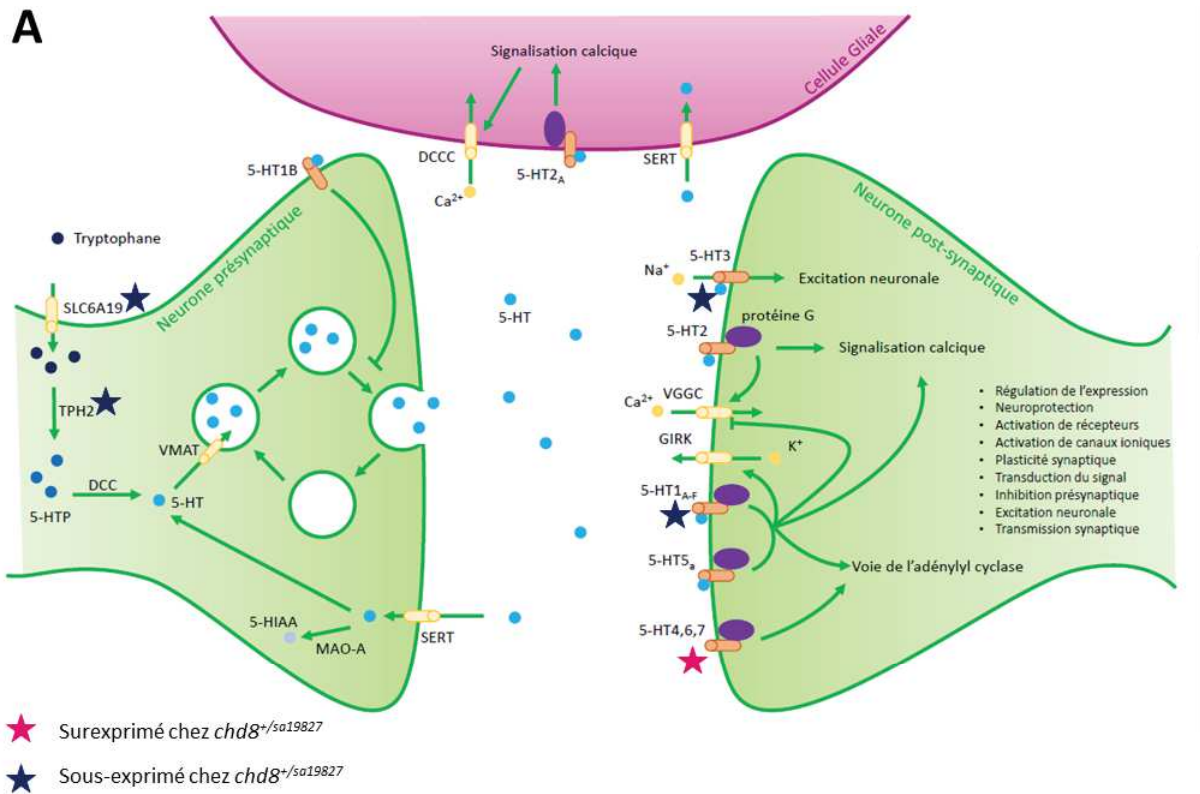


Figure 6: La voie de signalisation de la sérotonine est altérée chez les larves *chd8^{sa19827}*. A : La synapse sérotoninergique est montrée, adaptée de KEGG pathways. Les gènes sur-exprimés chez les larves *chd8^{+/sa19827}* sont indiqués avec une étoile rose et les gènes sous-exprimés avec une étoile bleue. (B-B') : Le double immunomarquage de larves de poisson-zèbre avec un anticorps anti-HuC/D et un anticorps anti-5-HT montre, à 5 jpf, en vue latérale, les neurones entériques et les cellules sécrétrices de sérotonine (5-HT). Les neurones (HuC/D positives) et les cellules sérotoninergiques (5-HT positives) ont été dénombrés et la distribution des mesures a été comparée entre les conditions. Un t-test a été réalisé entre paires de conditions. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01 ; p-value < 0,001 ; N.S. : non significatif.

LA PERTE DE *chd8* AFFECTE LES LYMPHOCYTES T DANS L'INTESTIN DE POISSONS-ZEBRE ADULTES

Nous avons prélevé et dissocié l'intestin de poissons-zèbres mâles adultes *chd8*^{+/+} et *chd8*^{sa19827/sa19827}. Nous avons alors réalisé un séquençage des ARNm sur cellule unique, grâce à la technologie 10X Genomics. Nous avons séquencé 4222 cellules pour les poissons *chd8*^{+/+} et 4671 pour les poissons *chd8*^{sa19827/sa19827}. Nous avons détecté en moyenne 669 gènes par cellule pour les poissons *chd8*^{+/+} et 598 gènes par cellule, en moyenne, pour les poissons *chd8*^{sa19827/sa19827}. Nous avons utilisé le logiciel Loupe Browser afin d'analyser les résultats, en combinant les deux conditions. Nous avons visuellement identifié cinq clusters sur la projection t-SNE de nos données de séquençage. (**Figure 7A**) Nous avons ensuite réalisé une comparaison des caractéristiques significatives globales afin de découvrir quels étaient les gènes significativement sur-exprimés dans chaque cluster par rapport à l'ensemble des cellules séquencées et nous avons utilisé l'outil d'annotation fonctionnelle de DAVID (version 6.8) sur les gènes sur-exprimés de chaque cluster afin d'identifier les types cellulaires les composant. (**Figure 7B**) Nous avons ensuite utilisé les marqueurs de différentes populations cellulaires, identifiés par des études de séquençage d'ARNm sur cellules uniques publiées, afin de confirmer l'identité de chaque cluster.

Le cluster 1 est composé majoritairement de lymphocytes T (cellules exprimant *lck*, *cd8a*, *cd8b*, *cd4-1*, *cd28*). [208] Nous avons identifié deux sous-groupes au sein du cluster 1 (**Figure 7C**) et nous avons réalisé une comparaison des caractéristiques significatives locales afin de découvrir quels étaient les gènes significativement sur-exprimés dans chaque sous-groupe par rapport à l'autre. Nous avons observé une augmentation significative de l'expression de *hsp70l* (p-value = $3,24 \cdot 10^{-30}$), *hsp70.2* (p-value = $2,95 \cdot 10^{-26}$), *hsp70.1* (p-value = $1,78 \cdot 10^{-25}$), et *hsp70.3* (p-value = $1,02 \cdot 10^{-23}$) dans le sous-groupe 2. (**Figure 7D**) Nous avons observé une différence significative de la proportion de lymphocytes T HSP70+, par rapport aux lymphocytes T totaux entre les poissons *chd8*^{+/+} et *chd8*^{sa19827/sa19827} (test exact de Fisher, p-value = $1,06 \cdot 10^{-252}$). (**Figure 7E**)

Cependant, ces résultats sont encore incomplets : une seule ligne de séquençage a été effectuée pour le moment. La deuxième ligne permettra d'augmenter la profondeur du séquençage sur les cellules capturées, ce qui améliorera l'identification des clusters.

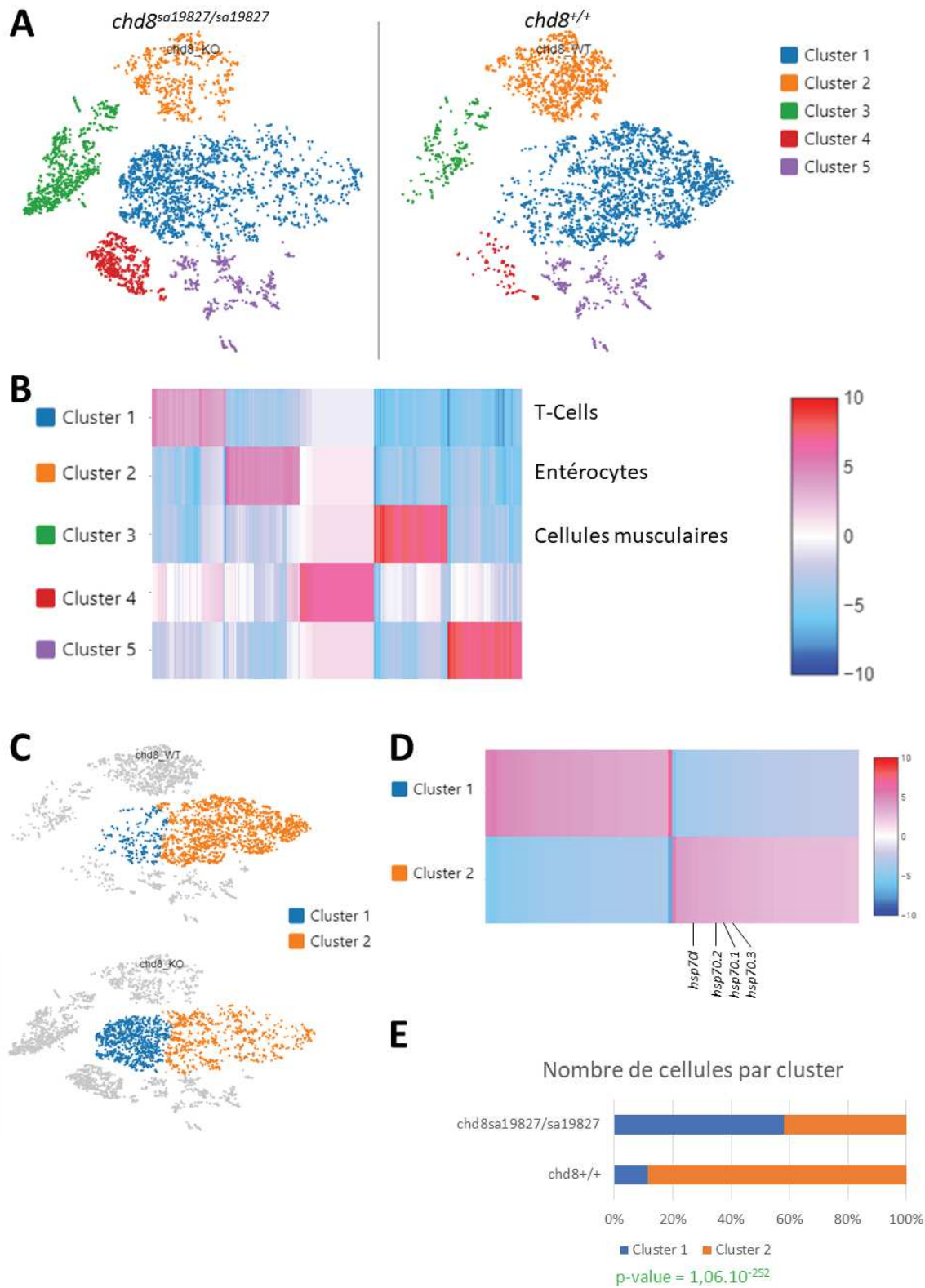


Figure 7: Single cell. **A** : Regroupement en types cellulaire par la méthode t-SNE de cellules uniques (4222 pour *chd8^{+/+}* et 4671 pour *chd8^{sa19827/sa19827}*), colorées par groupe. **B** : Heatmap montrant les gènes différentiellement exprimés entre groupes et identification des différents clusters. **C** : Identification de deux sous-clusters au sein du cluster regroupant les lymphocytes T. **D** : Heatmap montrant les gènes différentiellement exprimés entre les

clusters 1 et 2 des lymphocytes T. E : Dénombrement des cellules appartenant aux cluster 1 et au cluster 2 chez les poissons *chd8*^{+/+} et *chd8*^{sa19827/sa19827}. Un test exact de Fisher a été réalisé pour comparer les conditions.

III. DISCUSSION

Nous avons montré que la lignée de poisson-zèbre *chd8sa19827* présente les phénotypes caractéristiques des individus porteurs d'une mutation dans *CHD8* [137]: une macrocéphalie, une diminution du nombre de neurones entériques, probablement à l'origine des troubles gastro-intestinaux, et une hyperactivité pouvant être en lien avec les troubles du sommeil. La lignée *chd8sa19827* permet de modéliser correctement les conséquences d'une mutation de *CHD8* et pourrait donc être utilisé pour tester les effets de petites molécules pour un criblage moyen débit.

Nous avons investigué l'origine de la diminution du nombre de neurones entériques et nous n'avons noté ni défaut de prolifération des CCN, ni apoptose massive dans l'intestin des larves mutantes pour *chd8*. Les progéniteurs neuronaux ne se différencient pas non plus en cellules gliales et la vitesse de migration des CCN dans l'intestin ne semble pas réduite chez les larves mutantes. En revanche, nous avons observé une diminution du nombre de CCN au moment de quitter le tube neural chez les embryons mutants, à 24 hpf. De plus, le gène *msx1*, dont l'expression est diminuée dans les CCN entériques à 4 jpf, joue un rôle prépondérant dans l'induction de la Crête Neurale.[209] *chd8* semble donc jouer un rôle dans l'induction de la Crête Neurale, en régulant, de manière directe ou indirecte, les facteurs d'induction de la Crête Neurale. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser un séquençage des ARNm sur les cellules de la plaque neurale. Nous pourrions également réaliser une expérience de séquençage de chromatine immuno-précipitée sur ces mêmes cellules afin d'évaluer si *chd8* régule les facteurs d'induction de la Crête Neurale de manière directe ou indirecte.

Notre expérience de séquençage des ARNm a montré une dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans les synapses sérotonergiques et cholinergiques : le récepteur de la sérotonine *htr3a* est sous-exprimé ce qui pourrait entraîner une diminution de l'excitabilité neuronale, et *chrne*, *chrna2b* et *chrna6*, trois gènes codant des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine sont dérégulés, ce qui pourrait affecter la dépolarisation de la membrane neuronale. De plus, le récepteur de la sérotonine *htr6* est sur-exprimé, et *htr1d* est sous-exprimé. Ces deux récepteurs, tout comme les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, permettent de réguler la voie de l'adénylyl cyclase qui permet de réguler, entre autres, l'hyper-excitabilité des neurones. [210, 211]La mutation *chd8sa19827* pourrait donc entraîner une perturbation des

signaux neuronaux dans l'intestin. Cette perturbation pourrait être observée en cultivant des neurones dérivés de CCN *chd8^{+/+}* et *chd8^{+/sa19827}* sur des puces à multi-électrodes (MEA) et en testant si les neurones mutants présentent un motif d'activité similaire à celui des neurones sauvages.

Nous avons également observé que *tph2*, le gène codant l'enzyme responsable de la synthèse de la sérotonine dans les neurones entériques, est sous-exprimé dans les CCN des larves mutantes, tout comme *slc6a19.2*, codant un transporteur participant à l'absorption du tryptophane, le précurseur de la sérotonine. Cette sous-expression de gènes impliqués dans la synthèse de la sérotonine est confirmée par la diminution du nombre de cellules sérotonergiques dans l'intestin des larves *chd8^{+/sa19827}*. Cette observation pourrait paraître contradictoire avec l'élévation du taux de sérotonine observée dans le sang d'individus TSA [183], mais nous n'avons pas pu mesurer le taux de sérotonine dans le sang des larves. De plus, nous n'avons pas étudié le transcriptome des cellules non neurales de l'intestin et il est possible que *tph1*, le gène codant l'enzyme responsable de la synthèse de la sérotonine dans les cellules entérochromaffines, soit sur-exprimé. Enfin, les enzymes permettant la transformation de la sérotonine en mélatonine pourraient être sous-exprimées et la sérotonine pourrait alors s'accumuler dans l'intestin et dans la circulation sanguine.

La sérotonine joue un rôle dans l'inflammation : elle possède des propriétés à la fois pro et anti inflammatoires. Elle permet, par exemple, d'augmenter l'activation de lymphocytes T [212], mais elle empêche également la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages.[213] HSP70 permet aux lymphocytes T reg de neutraliser les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ et joue donc un rôle immunosuppresseur. [214] Nous avons noté une diminution de la proportion de lymphocytes T HSP70+ dans l'intestin de poissons *chd8^{sa19827/sa19827}*, par rapport aux poissons *chd8^{+/+}*, ce qui pourrait indiquer une augmentation de l'activité des lymphocytes T, et donc une réaction inflammatoire chez les poissons mutants. La diminution du nombre de cellules sérotoninergiques dans l'intestin des larves de poisson-zèbre pourrait également entraîner une réaction inflammatoire, à travers l'activité des macrophages.

Enfin, nous avons observé un excès de mâles chez les poissons *chd8^{sa19827/sa19827}*, mais pas chez les poissons *chd8^{+/+}* ni chez les poissons *chd8^{+/sa19827}*. Ce biais du sex-ratio fait écho à celui

observé chez les patients atteints de TSA [10, 12, 21], et il peut être en partie expliqué par la sous-expression de *nrOb1* et *akr1c4*, deux gènes dont les orthologues humains sont associés à l'inversion sexuelle 46XY, chez les larves mutantes. Cette observation pourrait suggérer une origine génétique directe au biais du sex-ratio observé chez les individus présentant un TSA. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions comparer le sexe phénotypique et le sexe génétique de patients porteurs d'une mutation dans *CHD8*.

PROJET 2

A dominant *vimentin* variant causes a rare syndrome
with premature aging

PROJET 2 RESUME

La Progéria, ou syndrome de Hutchinson-Gilford, est une pathologie extrêmement rare (1 naissance sur 4-8 millions) qui provoque un vieillissement précoce des individus affectés. Dans 90 % des cas, la Progéria est causée par une mutation dans le gène *LMNA* codant la Lamine A/C, une protéine essentielle au maintien de l'intégrité nucléaire.

Un patient présentant un syndrome progéroïde (vieillesse précoce, dysostose crânio-faciale, neuropathie périphérique et lipodystrophie) a été référé auprès de notre collaborateur clinicien. Après exclusion du gène *LMNA*, le séquençage d'exome a permis de trouver une mutation faux-sens dans le gène *VIM*, codant la Vimentine, une protéine appartenant à la famille des filaments intermédiaires III et interagissant avec la Lamine A/C.

Les symptômes du patient étant aisément modélisables chez le poisson-zèbre, j'ai surexprimé soit la forme sauvage, soit la forme mutée du gène humain chez des embryons poisson-zèbre. J'ai ensuite réalisé différents marquages afin d'étudier le rôle de *VIM*, et l'effet de la mutation p.Leu387Pro, dans les différents phénotypes observés chez le patient. Un marquage au bleu alcian, mettant en évidence les cartilages crânio-faciaux, m'a permis de montrer que la surexpression de la forme sauvage ou mutée de *VIM* entraînait une déformation de ces cartilages. La surexpression de la forme mutée de *VIM* causait un phénotype plus sévère que la surexpression de la forme sauvage. J'ai ensuite réalisé un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la tubuline acétylée afin de visualiser l'architecture des neurones périphériques. J'ai observé une augmentation du nombre d'axones défectueux chez les embryons surexprimant la forme sauvage de *VIM*. Cet effet était accentué chez les embryons surexprimant la forme mutée de *VIM*. Enfin, j'ai modélisé la lipodystrophie observée chez le patient en réalisant un marquage des lipides au Oil Red O. La surexpression de la forme sauvage ou mutée de *VIM* entraînait une accumulation de lipides dans le tube digestif des embryons. Cependant, la surexpression de la forme mutée de *VIM* ne causait pas un phénotype plus sévère que la surexpression de la forme sauvage de *VIM*.

Ces résultats permettent de conclure que la mutation dans *VIM* est bien responsable des signes cliniques observés chez le patient. De plus, nos expériences nous permettent de conclure que la mutation p.Leu387Pro n'est pas une mutation perte de fonction. Elle peut être gain de fonction ou dominant négative.

PROJET 3

De Novo Frameshift Variants in the Neuronal Splicing
Factor *NOVA2* Result in a Common C-Terminal
Extension and Cause a Severe Form of
Neurodevelopmental Disorder

PROJET 3 : RESUME

La déficience intellectuelle (DI) est une maladie neurodéveloppementale fréquemment associée aux TSA, bien qu'elle puisse apparaître de manière isolée ou en présence de comorbidités. Elle est caractérisée par un quotient intellectuel inférieur à 70 avant l'âge de 18 ans, qui se traduit par des limitations intellectuelles et des troubles de l'adaptation. Tout comme les TSA, la DI a des origines génétiques très variées.

Un patient présentant une forte DI a été référé à notre collaboratrice clinicienne. Un séquençage d'exome a permis de trouver une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture dans le gène *NOVA2*. *NOVA2* code une protéine supposée réguler l'épissage alternatif des ARNm dans certains neurones. Cinq patients supplémentaires porteurs de mutation dans *NOVA2* ont été identifiés par des collaborateurs. Les patients présentent une DI sévère, associée à un retard du développement moteur et du langage, et des caractéristiques autistiques.

Notre collaboratrice avait réalisé des essais cellulaires montrant que l'inactivation de *NOVA2* affecte la différenciation des neurones et la croissance des neurites. J'ai donc utilisé le modèle du poisson-zèbre afin de confirmer ce résultat. Pour cela, j'ai réduit transitoirement l'expression de *nova1*, l'orthologue de *NOVA2*, chez des embryons de poisson-zèbre, en utilisant un morpholino. J'ai ensuite réalisé un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la tubuline acétylée afin d'évaluer la morphologie du cerveau des larves. J'ai observé une diminution du nombre d'axones reliant les tectum optiques chez les larves morphantes. L'ARNm sauvage de *NOVA2*, mais pas la forme portant la mutation 1, permet de sauver le phénotype induit par le morpholino. De plus, la surexpression de la forme sauvage ou mutante de *NOVA2* n'entraîne pas de défauts de la morphologie cérébrale. Ces résultats indiquent que la mutation 1 est une mutation perte de fonction.

DISCUSSION GENERALE

DE L'UTILISATION DU POISSON-ZEBRE POUR MODELISER DES MALADIES RARES

Les maladies génétiques rares sont des maladies qui touchent moins d'une naissance sur 2000. Cependant, plus de 7000 maladies rares ont été identifiées à ce jour et elles affectent au total plus de 300 millions de personnes dans le monde. Environ 80 % des maladies rares ont une origine génétique, que ce soit une mutation dans un seul gène (maladie monogénique), une interaction entre un ou plusieurs gènes et l'environnement (maladie multifactorielle ou oligogénique), ou un réarrangement génomique comme une duplication, une délétion ou une inversion.

Le séquençage de nouvelle génération a permis de découvrir un grand nombre de gènes responsables de maladies lorsqu'ils sont mutés. Cependant, dans la plupart des cas, plusieurs variants candidats sont détectés chez les patients. Des analyses *in silico* sont conduites afin d'éliminer les variants non pathogéniques se basant sur l'effet de la mutation sur la séquence de la protéine et sur le degré de conservation de l'acide aminé touché par la mutation. Toutefois, ces analyses ne constituent que des prédictions et sont sujettes à des faux positifs et des faux négatifs.

Le poisson-zèbre permet d'évaluer l'effet de mutations retrouvées chez des patients. En effet, le poisson-zèbre permet de réaliser des expériences de sauvetage phénotypique grâce à la micro-injection d'ARNm et/ou de morpholino dans des œufs de poisson-zèbre sauvages ou mutants.[215] Le modèle poisson-zèbre possède plusieurs caractéristiques le rendant particulièrement adapté à ce type d'expérience : le développement de l'embryon est rapide et se fait *ex utero*. De plus, l'embryon de poisson-zèbre est transparent, ce qui rend possible la visualisation de phénomènes biologiques *in vivo* et permet de modéliser un grand nombre de pathologies différentes, affectant divers organes. (**Figure 27**) De plus, environ 70% des gènes humains possèdent un orthologue chez le poisson-zèbre.

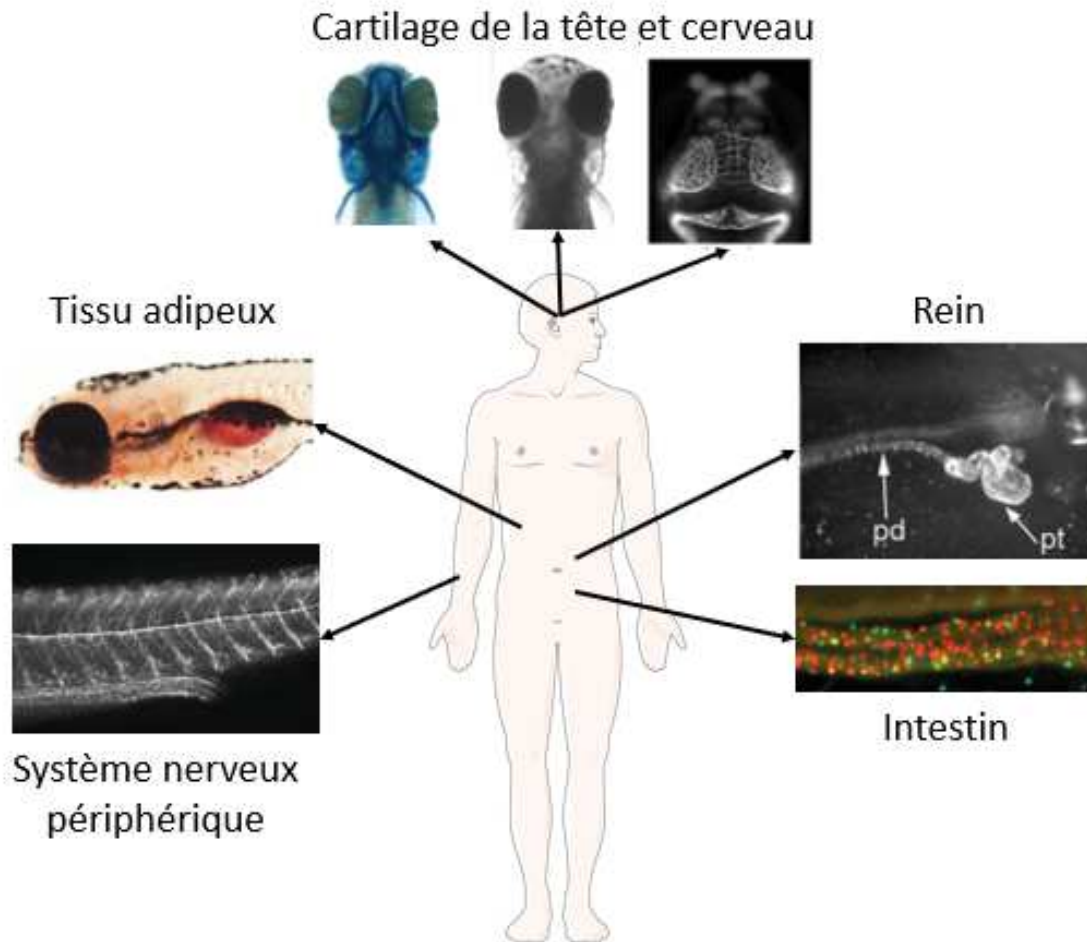


Figure 27: De nombreux organes sont observables chez le poisson-zèbre. [216-218]

LIMITES DE L'UTILISATION DU MODELE POISSON-ZEBRE

Comme tout modèle, le poisson-zèbre présente des limites. Tout d'abord, de nombreux gènes humains possèdent plus d'un orthologue chez le poisson-zèbre. Cela est dû à une duplication complète du génome des poissons téléostéens ayant eu lieu il y a environ 350 millions d'années. [219] La présence d'un ou plusieurs paralogues peut compliquer l'étude de la perte de fonction d'un gène chez le poisson-zèbre : il convient alors de tester la perte de fonction séparée et combinée de tous les paralogues du gène d'intérêt.

La pertinence de l'utilisation de morpholinos a été le sujet de vastes débats, en raison d'une mauvaise corrélation des résultats obtenus en utilisant des morpholinos et des lignées mutantes. [220, 221] Cependant, des études plus récentes suggèrent la présence de mécanismes de compensation génétique activés chez les embryons mutants, mais pas chez les embryons morphants. [222-224] Dans le cas de *chd8*, les observations que nous avons

réalisées sur la lignée mutante *chd8^{sa19827}* sont parfaitement cohérentes avec les données précédemment obtenues en utilisant un morpholino ciblant *chd8*. Les larves mutantes présentent, tout comme les morphantes, une macrocéphalie et une diminution du nombre de neurones entériques.

De plus, l'utilisation de modèles mutants est sujette à un effet parental, qui peut être maternel ou paternel. L'effet maternel a été étudié de manière approfondie chez le poisson-zèbre et résulte du dépôt par la femelle d'ARNm dans l'ovocyte. Ces ARNm maternels sont essentiels au développement précoce de l'embryon : l'activation du génome zygotique, accompagné de la destruction des ARNm maternels, a lieu durant la transition à mi-blastula, à environ 3 hpf. [225] Jusqu'à ce stade, l'embryon dépend entièrement des ARNm maternels pour réaliser les premiers cycles de division.

L'effet paternel peut être expliqué par le fait que seul le méthylome paternel est conservé par l'embryon de poisson-zèbre, tandis que méthylome maternel est progressivement effacé à partir du stade 16 cellules (environ 1,5 hpf).[226] Si la mutation d'intérêt induit un changement du méthylome paternel, celui-ci sera donc transmis à la descendance, indépendamment du génotype de celle-ci.

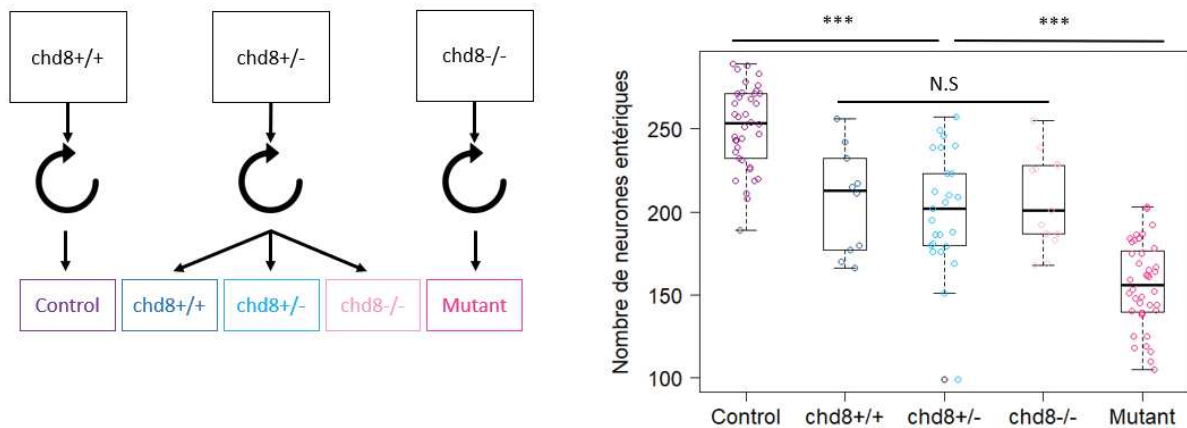


Figure 28: Détection d'un effet parental dans la lignée *chd8^{sa19827}*. A : Schéma des croisements réalisés pour détecter un effet parental. B : En présence d'un effet parental, il n'y a pas de différence significative entre les phénotypes des individus *chd8^{+/+}*, *chd8^{+/sa19827}* et *chd8^{sa19827/sa19827}* issus du croisement *chd8^{+/sa19827}* x *chd8^{+/sa19827}*. En revanche le phénotype des individus issus du croisement *chd8^{+/sa19827}* x *chd8^{+/sa19827}* est significativement différent de celui des individus issus du croisement *chd8^{+/+}* x *chd8^{+/+}* et de celui des individus issus du croisement *chd8^{sa19827/sa19827}* x *chd8^{sa19827/sa19827}*. * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01 ; p-value < 0,001 ; N.S. : non significatif.

L'effet parental, paternel ou maternel, d'un gène peut être détecté en réalisant un incross de parents sauvages et un incross de parents hétérozygotes et en observant le phénotype des individus issus de ces croisements. (**Figure 28**) Il est alors possible de visualiser la présence de l'effet parental : on n'observera pas de différence significative entre les phénotypes des individus sauvages, hétérozygotes et homozygotes issus du croisement entre poissons hétérozygotes. En revanche le phénotype des individus issus du croisement entre poissons hétérozygotes sera différent de celui des individus issus du croisement poissons sauvages. Lorsque l'on est confronté à un effet parental, il est alors nécessaire d'utiliser des poissons homozygotes pour la mutation d'intérêt : ainsi, tous les embryons produits seront hétérozygotes et pourront être comparés à des embryons issus d'un croisement entre poissons sauvages, issus de la même lignée que les poissons mutants.

ETUDE DE LA FONCTION DU GENE *chd8* DANS LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE

Les troubles gastro-intestinaux sont une comorbidité fréquente des TSA. Cependant, leur origine est encore peu étudiée. Durant ma thèse, j'ai cherché à élucider la cause de la réduction du nombre de neurones entériques observée chez des larves mutantes pour *chd8*. Cette diminution du nombre de neurones entériques est probablement en partie responsable des troubles gastro-intestinaux présents chez les individus porteurs d'une mutation dans *CHD8*.

J'ai tout d'abord vérifié que la lignée mutante *chd8sa19827* reproduit bien les phénotypes présentés par les patients porteurs d'une mutation dans *CHD8*. Les larves *chd8sa19827* présentent une macrocéphalie, une diminution du nombre de neurones entériques et une hyperactivité. Ces observations nous paraissaient contradictoires : les larves présentent plus de neurones dans la tête et moins dans l'intestin. La lignée *chd8sa19827* nous a permis de résoudre cette contradiction apparente : l'intestin des larves mutantes est le siège d'une hyper-prolifération, tout comme la tête [137], indiquant donc que *chd8* inhibe la prolifération cellulaire. Cependant, les CCN entériques ne prolifèrent pas plus chez les larves mutantes que chez les sauvages. Les cellules, dont la prolifération augmente chez les larves mutantes, pourraient être des cellules de l'épithélium intestinal, par exemple des cellules souches dont la prolifération serait amplifiée par la perte de *chd8*, ou encore des cellules du système immunitaire, ce qui pourrait indiquer la présence d'une réaction inflammatoire dans l'intestin.

Cette deuxième hypothèse est confortée par nos résultats de séquençage des ARNm sur cellules uniques dans l'intestin de poissons-zèbres adultes, qui indiquent une activation possible des lymphocytes T. L'inflammation chronique de la paroi du tube digestif est une des caractéristiques des maladies inflammatoires de l'intestin (MII), comme la maladie de Crohn ou la rectocolique hémorragique. Ces MII sont plus fréquentes chez les individus atteints de TSA, que dans le reste de la population.[227, 228] Des altérations de la flore intestinale ont été observées chez les individus atteints de TSA et chez les individus atteints de MII [229, 230] et plusieurs groupes ont émis l'hypothèse que ces altérations pouvaient jouer un rôle dans la genèse des TSA et des MII.[231, 232] Cette hypothèse est confortée par une étude dans laquelle une altération du microbiote est observée dans un modèle murin TSA induit par de l'acide valproïque. [233] Cependant, on pourrait tout aussi bien proposer que la dérégulation du système immunitaire soit à l'origine des TSA, des troubles gastro-intestinaux associés et de la modification du microbiote.

Conformément à de nombreuses études, les données que nous avons collectées suggèrent l'existence d'un axe Cerveau-Intestin-Système immunitaire. [234, 235] La sérotonine pourrait être le lien entre les différentes composantes de cet axe. En effet, la sérotonine est synthétisée à la fois dans le cerveau et dans l'intestin et elle joue le rôle de neurotransmetteur et d'hormone. En tant que neurotransmetteur, la sérotonine influe sur le signal nerveux : une dérégulation du niveau de sérotonine dans le cerveau peut entraîner de l'hyperactivité ou de la dépression [184, 185], tandis que dans l'intestin, la dérégulation du niveau de la sérotonine peut affecter le péristaltisme ou la survie des neurones.[182] En tant qu'hormone, la sérotonine joue un rôle dans le système immunitaire : la diminution de la synthèse de la sérotonine entraîne une diminution des capacités prolifératives des lymphocytes T et B chez le crapet arlequin.[236] La baisse du nombre de neurones sérotoninergiques que nous observons dans l'intestin des larves mutantes ne correspond pas à ce qui est observé chez les patients atteints de TSA, puisqu'ils présentent une élévation du taux de sérotonine dans le sang.[183]

Dans le cerveau, l'hyper-prolifération ne concerne pas uniquement les neurones. En effet, des observations réalisées au sein de l'équipe montrent une augmentation du nombre de cellules gliales dans l'hypothalamus de larves mutantes pour *chd8* à 3 jpf. En utilisant une lignée transgénique exprimant la GFP dans les CCN vagues, nous avons montré que le nombre de

progéniteurs des neurones entériques est réduit dès la sortie des CCN du tube neural. De plus, *msx1*, un gène important pour l'induction de la crête neurale, est sous-exprimé chez les larves mutantes.[209] Il est donc possible que la perte de *chd8* entraîne un défaut d'induction de la plaque neurale ou empêche le bon déroulement de la transition épithélium-mésenchyme des CCN. Si certaines CCN ne parviennent pas à quitter le tube neural et restent dans le neuroépithélium, elles pourraient devenir des progéniteurs de neurones et de cellules gliales supplémentaires.

Toutefois, l'origine de la réduction du nombre de neurones entériques pourrait être encore plus précoce que l'induction de la plaque neurale. En effet, nous avons été confrontés à un effet maternel dans la lignée *chd8sa19827* : les larves sauvages issues d'une femelle *chd8^{+/sa19827}* présentent une réduction du nombre de neurones entériques. L'effet maternel est dû au dépôt par la femelle d'ARNm mutés dans l'oocyte. Cependant, ces ARNm sont détruits et remplacés par les ARNm de l'embryon aux alentours de 3 hpf. [225] La réduction du nombre de neurones entériques trouve donc son origine durant les trois premières heures du développement de l'embryon.

Ces trois premières heures sont également le siège de la reprogrammation épigénétique de l'embryon. En effet, chez le poisson-zèbre, si l'embryon hérite du méthylome paternel et maternel lors de la fécondation, le dernier est effacé et remplacé par le méthylome paternel lors des premières heures du développement.[226] *chd8* est un remodeleur de la chromatine capable de réguler la méthylation des dinucléotides CpG en formant un complexe avec CTCF.[112] Siu *et al.*, ont montré que les individus porteurs d'une mutation dans *CHD8* possèdent un « méthylome signature », qui permet de les distinguer de la population générale.[113] Dans la lignée *chd8sa19827*, nous avons observé un effet paternel : les larves sauvages issues d'un mâle *chd8^{+/sa19827}* présentent une réduction du nombre de neurones entériques. Cette observation suggère que la transmission du méthylome d'un mâle hétérozygote à sa progéniture sauvage suffit à induire une réduction du nombre de neurones entériques. De plus, les enzymes permettant l'effacement du méthylome maternel et la copie du méthylome paternel proviennent des ARNm déposés par la femelle dans l'oocyte. La perte de *chd8* chez la mère pourrait entraîner l'établissement d'un méthylome altéré chez l'embryon.

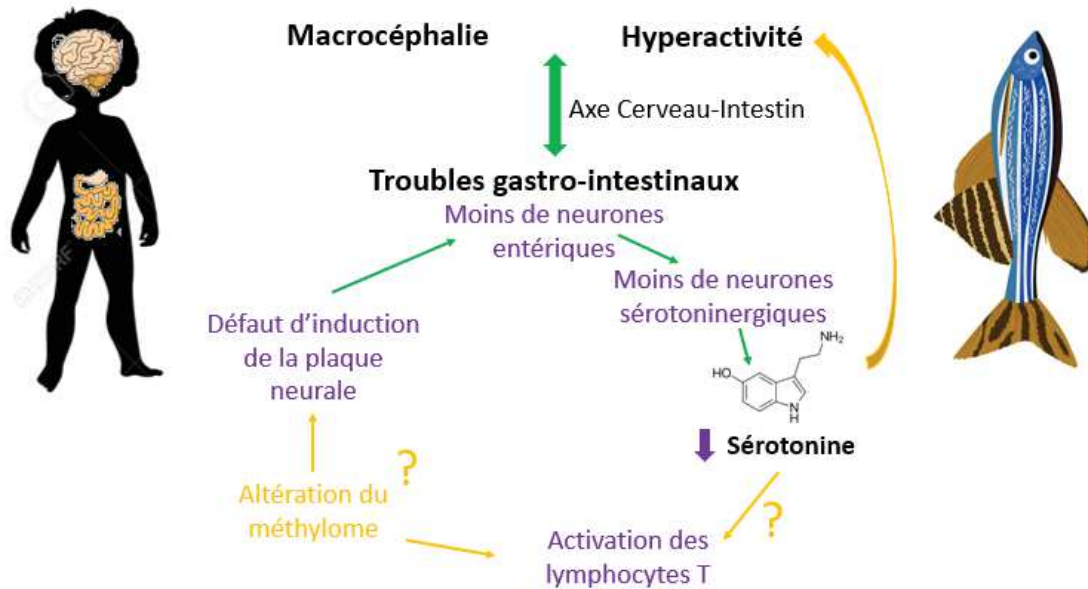


Figure 29: Modèle de travail.

Nous proposons donc un modèle dans lequel la perte de *chd8* empêche les CCN vagues de réaliser correctement la transition épithélium-mésenchyme pour quitter le tube neural. Cela entraîne par ricochet une diminution du nombre de progéniteurs neuronaux et donc une diminution du nombre de neurones entériques. Celle-ci conduit à une diminution du nombre de neurones sérotoninergiques, entraînant une diminution de la synthèse de sérotonine. Cette diminution du niveau de sérotonine pourrait être responsable de l'hyperactivité observée chez les larves mutantes, mais également sur la suractivation des lymphocytes T observée dans l'intestin des poissons adultes mutants. (Figure 29)

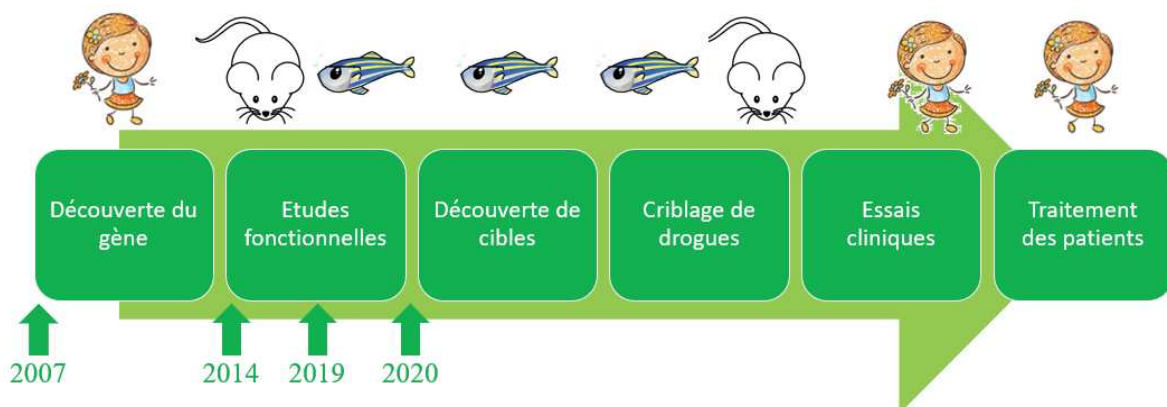


Figure 30: Du patient au patient : avancée de la recherche sur *CHD8* dans les TSA.

Mon travail de thèse a donc permis de compléter les études fonctionnelles réalisées pour comprendre l'implication de *CHD8* dans les TSA, en abordant un aspect encore peu exploré des TSA : les comorbidités gastro-intestinales. Le modèle que nous avons décrit pourra ensuite servir à la découverte de cibles thérapeutiques et au criblage de drogues agissant sur celles-ci. Ces drogues pourront ensuite être testées chez la souris puis chez l'humain, et pourront peut-être soigner un jour les patients porteurs d'une mutation dans *CHD8*. (**Figure 30**)

BIBLIOGRAPHIE

1. Sauka-Spengler, T. and M. Bronner-Fraser, *A gene regulatory network orchestrates neural crest formation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(7): p. 557-68.
2. Kanner, L., *Autistic disturbances of affective contact*. Acta Paedopsychiatr, 1968. **35**(4): p. 100-36.
3. Hans, A., *'Autistic psychopathy' in childhood*. 1943.
4. American Psychiatric Association. Task Force on Nomenclature and Statistics. and American Psychiatric Association. Committee on Nomenclature and Statistics., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 3d ed. 1980, Washington, D.C.: American Psychiatric Association. 494 p.
5. American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. Work Group to Revise DSM-III., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-III-R*. 3rd ed. 1987, Washington, DC: American Psychiatric Association. xxix, 567 p.
6. American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV*. 4th ed. 1994, Washington, DC: American Psychiatric Association. xxvii, 886 p.
7. American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV-TR*. 4th ed. 2000, Washington, DC: American Psychiatric Association. xxxvii, 943 p.
8. American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*. 5th ed. 2013, Washington, D.C.: American Psychiatric Association. xlv, 947 p.
9. Lai, M.C., M.V. Lombardo, and S. Baron-Cohen, *Autism*. Lancet, 2014. **383**(9920): p. 896-910.
10. Levy, S.E., et al., *Autism spectrum disorder and co-occurring developmental, psychiatric, and medical conditions among children in multiple populations of the United States*. J Dev Behav Pediatr, 2010. **31**(4): p. 267-75.
11. Kohane, I.S., et al., *The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e33224.
12. Mazurek, M.O., et al., *Anxiety, sensory over-responsivity, and gastrointestinal problems in children with autism spectrum disorders*. J Abnorm Child Psychol, 2013. **41**(1): p. 165-76.
13. Wang, L.W., D.J. Tancredi, and D.W. Thomas, *The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members*. J Dev Behav Pediatr, 2011. **32**(5): p. 351-60.

14. Hologue, C., et al., *Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence*. *Autism Res*, 2018. **11**(1): p. 24-36.
15. Sacco, R., S. Gabriele, and A.M. Persico, *Head circumference and brain size in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis*. *Psychiatry Res*, 2015. **234**(2): p. 239-51.
16. Fombonne, E., et al., *Microcephaly and macrocephaly in autism*. *J Autism Dev Disord*, 1999. **29**(2): p. 113-9.
17. Benabou, M., et al., *Heritability of the melatonin synthesis variability in autism spectrum disorders*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 17746.
18. D'Angelo, D., et al., *Defining the Effect of the 16p11.2 Duplication on Cognition, Behavior, and Medical Comorbidities*. *JAMA Psychiatry*, 2016. **73**(1): p. 20-30.
19. Ryan, A.K., et al., *Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study*. *J Med Genet*, 1997. **34**(10): p. 798-804.
20. Rutter, M. and L. Bartak, *Causes of infantile autism: some considerations from recent research*. *J Autism Child Schizophr*, 1971. **1**(1): p. 20-32.
21. Gurney, J.G., M.L. McPheeters, and M.M. Davis, *Parental report of health conditions and health care use among children with and without autism: National Survey of Children's Health*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2006. **160**(8): p. 825-30.
22. King, M. and P. Bearman, *Diagnostic change and the increased prevalence of autism*. *Int J Epidemiol*, 2009. **38**(5): p. 1224-34.
23. Durkin, M.S., et al., *Autism Spectrum Disorder Among US Children (2002-2010): Socioeconomic, Racial, and Ethnic Disparities*. *Am J Public Health*, 2017. **107**(11): p. 1818-1826.
24. Williams, E., et al., *Prevalence and characteristics of autistic spectrum disorders in the ALSPAC cohort*. *Dev Med Child Neurol*, 2008. **50**(9): p. 672-7.
25. Leonard, H., et al., *Autism and intellectual disability are differentially related to sociodemographic background at birth*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17875.
26. Delobel-Ayoub, M., et al., *Socioeconomic Disparities and Prevalence of Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disability*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0141964.
27. Rai, D., et al., *Parental socioeconomic status and risk of offspring autism spectrum disorders in a Swedish population-based study*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2012. **51**(5): p. 467-476 e6.
28. Baio, J., et al., *Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014*. *MMWR Surveill Summ*, 2018. **67**(6): p. 1-23.

29. Christensen, D.L., et al., *Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012*. MMWR Surveill Summ, 2018. **65**(13): p. 1-23.
30. Rynkiewicz, A. and I. Lucka, *Autism spectrum disorder (ASD) in girls. Co-occurring psychopathology. Sex differences in clinical manifestation*. Psychiatr Pol, 2018. **52**(4): p. 629-639.
31. Loomes, R., L. Hull, and W.P.L. Mandy, *What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2017. **56**(6): p. 466-474.
32. Jacquemont, S., et al., *A higher mutational burden in females supports a "female protective model" in neurodevelopmental disorders*. Am J Hum Genet, 2014. **94**(3): p. 415-25.
33. Berkel, S., et al., *Sex Hormones Regulate SHANK Expression*. Front Mol Neurosci, 2018. **11**: p. 337.
34. Sarachana, T., et al., *Sex hormones in autism: androgens and estrogens differentially and reciprocally regulate RORA, a novel candidate gene for autism*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17116.
35. Bettelheim, B., *The empty fortress; infantile autism and the birth of the self*. 1967, New York,: Free Press. xiv, 484 p.
36. Kolvin, I., R.F. Garside, and J.S. Kidd, *Studies in the childhood psychoses. IV. Parental personality and attitude and childhood psychoses*. Br J Psychiatry, 1971. **118**(545): p. 403-6.
37. Folstein, S. and M. Rutter, *Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs*. J Child Psychol Psychiatry, 1977. **18**(4): p. 297-321.
38. McQuaid, P.E., *Infantile autism in twins*. Br J Psychiatry, 1975. **127**: p. 530-4.
39. Christianson, A.L., N. Chesler, and J.G. Kromberg, *Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs*. Dev Med Child Neurol, 1994. **36**(4): p. 361-9.
40. Williams, P.G. and J.H. Hersh, *A male with fetal valproate syndrome and autism*. Dev Med Child Neurol, 1997. **39**(9): p. 632-4.
41. Agrawal, S., et al., *Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Preterm Infants: A Meta-analysis*. Pediatrics, 2018. **142**(3).
42. Jiang, H.Y., et al., *Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis*. Brain Behav Immun, 2016. **58**: p. 165-172.
43. Atladottir, H.O., et al., *Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders*. J Autism Dev Disord, 2010. **40**(12): p. 1423-30.

44. Taylor, L.E., A.L. Swerdfeger, and G.D. Eslick, *Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies*. Vaccine, 2014. **32**(29): p. 3623-9.
45. Hagerman, R.J., et al., *Fragile X syndrome*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17065.
46. Sitzmann, A.F., et al., *Rare FMR1 gene mutations causing fragile X syndrome: A review*. Am J Med Genet A, 2018. **176**(1): p. 11-18.
47. Ramaswami, G. and D.H. Geschwind, *Genetics of autism spectrum disorder*. Handb Clin Neurol, 2018. **147**: p. 321-329.
48. Jones, A.C., et al., *Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(12): p. 2155-61.
49. Beunders, G., et al., *Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(2): p. 210-20.
50. Al Shehhi, M., et al., *NRXN1 deletion syndrome; phenotypic and penetrance data from 34 families*. Eur J Med Genet, 2019. **62**(3): p. 204-209.
51. Sato, D., et al., *SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(5): p. 879-87.
52. Berkel, S., et al., *Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation*. Nat Genet, 2010. **42**(6): p. 489-91.
53. Golzio, C., et al., *KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 363-7.
54. Arbogast, T., et al., *Kctd13-deficient mice display short-term memory impairment and sex-dependent genetic interactions*. Hum Mol Genet, 2019. **28**(9): p. 1474-1486.
55. Loviglio, M.N., et al., *Chromosomal contacts connect loci associated with autism, BMI and head circumference phenotypes*. Mol Psychiatry, 2017. **22**(6): p. 836-849.
56. Loviglio, M.N., et al., *The Immune Signaling Adaptor LAT Contributes to the Neuroanatomical Phenotype of 16p11.2 BP2-BP3 CNVs*. Am J Hum Genet, 2017. **101**(4): p. 564-577.
57. Durand, C.M., et al., *Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders*. Nat Genet, 2007. **39**(1): p. 25-7.
58. Jamain, S., et al., *Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 27-9.

59. Parente, D.J., et al., *Neurologin 2 nonsense variant associated with anxiety, autism, intellectual disability, hyperphagia, and obesity*. Am J Med Genet A, 2017. **173**(1): p. 213-216.
60. van Bon, B.W., et al., *Disruptive de novo mutations of DYRK1A lead to a syndromic form of autism and ID*. Mol Psychiatry, 2016. **21**(1): p. 126-32.
61. O'Roak, B.J., et al., *Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 246-50.
62. Doan, R.N., et al., *Recessive gene disruptions in autism spectrum disorder*. Nat Genet, 2019. **51**(7): p. 1092-1098.
63. Maurer, P., et al., *The Ets transcription factor Fev is specifically expressed in the human central serotonergic neurons*. Neurosci Lett, 2004. **357**(3): p. 215-8.
64. Chubykin, A.A., et al., *Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2*. Neuron, 2007. **54**(6): p. 919-31.
65. Zaslavsky, K., et al., *SHANK2 mutations associated with autism spectrum disorder cause hyperconnectivity of human neurons*. Nat Neurosci, 2019. **22**(4): p. 556-564.
66. Ung, D.C., et al., *Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse*. Mol Psychiatry, 2018. **23**(5): p. 1356-1367.
67. Sun, X. and Y. Lin, *Npas4: Linking Neuronal Activity to Memory*. Trends Neurosci, 2016. **39**(4): p. 264-275.
68. Heavner, W.E. and S.E.P. Smith, *Resolving the Synaptic versus Developmental Dichotomy of Autism Risk Genes*. Trends Neurosci, 2020. **43**(4): p. 227-241.
69. Russo, F.B., et al., *Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells*. Biol Psychiatry, 2018. **83**(7): p. 569-578.
70. Tang, G., et al., *Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits*. Neuron, 2014. **83**(5): p. 1131-43.
71. Parkhurst, C.N., et al., *Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1596-609.
72. Suzuki, K., et al., *Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder*. JAMA Psychiatry, 2013. **70**(1): p. 49-58.
73. Kim, H.J., et al., *Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects*. Mol Psychiatry, 2017. **22**(11): p. 1576-1584.
74. Koyama, R. and Y. Ikegaya, *Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders*. Neurosci Res, 2015. **100**: p. 1-5.
75. Phan, B.N., et al., *A myelin-related transcriptomic profile is shared by Pitt-Hopkins syndrome models and human autism spectrum disorder*. Nat Neurosci, 2020. **23**(3): p. 375-385.

76. van Vreeswijk, C. and H. Sompolinsky, *Chaos in neuronal networks with balanced excitatory and inhibitory activity*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1724-6.
77. Dehghani, N., et al., *Dynamic Balance of Excitation and Inhibition in Human and Monkey Neocortex*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23176.
78. Daniel Maxim Iascone, Y.L., Uygur Sümbül, Michael Doron, Hanbo Chen, Valentine Andreu, Finola Goudy, Idan Segev, Hanchuan Peng, Franck Polleux, *Whole-neuron synaptic mapping reveals local balance between excitatory and inhibitory synapse organization*. bioRxiv, 2018.
79. Hengen, K.B., et al., *Firing rate homeostasis in visual cortex of freely behaving rodents*. Neuron, 2013. **80**(2): p. 335-42.
80. Kim, K.C., et al., *Clinical and Neurobiological Relevance of Current Animal Models of Autism Spectrum Disorders*. Biomol Ther (Seoul), 2016. **24**(3): p. 207-43.
81. Rubenstein, J.L. and M.M. Merzenich, *Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems*. Genes Brain Behav, 2003. **2**(5): p. 255-67.
82. Wang, J., et al., *Common Regulatory Variants of CYFIP1 Contribute to Susceptibility for Autism Spectrum Disorder (ASD) and Classical Autism*. Ann Hum Genet, 2015. **79**(5): p. 329-340.
83. Davenport, E.C., et al., *Autism and Schizophrenia-Associated CYFIP1 Regulates the Balance of Synaptic Excitation and Inhibition*. Cell Rep, 2019. **26**(8): p. 2037-2051 e6.
84. Salpietro, V., et al., *AMPA receptor GluA2 subunit defects are a cause of neurodevelopmental disorders*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3094.
85. Hussman, J.P., *Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism*. J Autism Dev Disord, 2001. **31**(2): p. 247-8.
86. Mahdavi, M., et al., *Meta-Analysis of the Association between GABA Receptor Polymorphisms and Autism Spectrum Disorder (ASD)*. J Mol Neurosci, 2018. **65**(1): p. 1-9.
87. Horder, J., et al., *GABAA receptor availability is not altered in adults with autism spectrum disorder or in mouse models*. Sci Transl Med, 2018. **10**(461).
88. Duffney, L.J., et al., *Epigenetics and autism spectrum disorder: A report of an autism case with mutation in H1 linker histone HIST1H1E and literature review*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2018. **177**(4): p. 426-433.
89. Bolzer, A., et al., *Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes*. PLoS Biol, 2005. **3**(5): p. e157.
90. Pueschel, R., F. Coraggio, and P. Meister, *From single genes to entire genomes: the search for a function of nuclear organization*. Development, 2016. **143**(6): p. 910-23.

91. Bascom, G.D., T. Kim, and T. Schlick, *Kilobase Pair Chromatin Fiber Contacts Promoted by Living-System-Like DNA Linker Length Distributions and Nucleosome Depletion*. J Phys Chem B, 2017. **121**(15): p. 3882-3894.
92. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
93. Gates, L.A., et al., *Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation*. J Biol Chem, 2017. **292**(35): p. 14456-14472.
94. Jacobs, S.A., et al., *Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3*. EMBO J, 2001. **20**(18): p. 5232-41.
95. Kourmouli, N., et al., *Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2491-501.
96. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
97. Graff, J. and I.M. Mansuy, *Epigenetic codes in cognition and behaviour*. Behav Brain Res, 2008. **192**(1): p. 70-87.
98. Marshall, C.R., et al., *Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 477-88.
99. Zhang, A., et al., *Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33799-805.
100. Iossifov, I., et al., *The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder*. Nature, 2014. **515**(7526): p. 216-21.
101. Champagne, N., N. Pelletier, and X.J. Yang, *The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase*. Oncogene, 2001. **20**(3): p. 404-9.
102. Neale, B.M., et al., *Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 242-5.
103. Harada, A., et al., *Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate*. EMBO J, 2012. **31**(13): p. 2994-3007.
104. Iossifov, I., et al., *Low load for disruptive mutations in autism genes and their biased transmission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(41): p. E5600-7.
105. Srinivasan, S., K.M. Dorigi, and J.W. Tamkun, *Drosophila Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II*. PLoS Genet, 2008. **4**(10): p. e1000217.
106. Fu, Y., et al., *The insulator binding protein CTCF positions 20 nucleosomes around its binding sites across the human genome*. PLoS Genet, 2008. **4**(7): p. e1000138.
107. Xiang, Y., et al., *JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19226-31.

108. Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics, C., *Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia.* Mol Autism, 2017. **8**: p. 21.
109. Grozinger, C.M., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 4868-73.
110. Nord, A.S., et al., *Reduced transcript expression of genes affected by inherited and de novo CNVs in autism.* Eur J Hum Genet, 2011. **19**(6): p. 727-31.
111. Hurlstone, A.F., et al., *Cloning and characterization of hELD/OSA1, a novel BRG1 interacting protein.* Biochem J, 2002. **364**(Pt 1): p. 255-64.
112. Ishihara, K., M. Oshimura, and M. Nakao, *CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling.* Mol Cell, 2006. **23**(5): p. 733-42.
113. Siu, M.T., et al., *Functional DNA methylation signatures for autism spectrum disorder genomic risk loci: 16p11.2 deletions and CHD8 variants.* Clin Epigenetics, 2019. **11**(1): p. 103.
114. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.* Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
115. Yuen, R.K., et al., *Genome-wide characteristics of de novo mutations in autism.* NPJ Genom Med, 2016. **1**: p. 160271-1602710.
116. Ong, W.Y. and L.J. Garey, *Ultrastructural characteristics of human adult and infant cerebral cortical neurons.* J Anat, 1991. **175**: p. 79-104.
117. Sarkander, H.I. and H.J. Dulce, *Characteristics of transcriptionally active and inactive neuronal and nonastrocytic glial rat brain chromatin fractions.* Exp Brain Res, 1979. **35**(1): p. 109-25.
118. Meshorer, E., et al., *Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells.* Dev Cell, 2006. **10**(1): p. 105-16.
119. Kishi, Y., et al., *HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells.* Nat Neurosci, 2012. **15**(8): p. 1127-33.
120. Tyagi, M., et al., *Chromatin remodelers: We are the drivers!!* Nucleus, 2016. **7**(4): p. 388-404.
121. Roberts, S.M. and F. Winston, *Essential functional interactions of SAGA, a Saccharomyces cerevisiae complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes.* Genetics, 1997. **147**(2): p. 451-65.
122. Trouche, D., et al., *RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11268-73.
123. Yasui, D., et al., *SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances.* Nature, 2002. **419**(6907): p. 641-5.

124. Sakamoto, I., et al., *A novel beta-catenin-binding protein inhibits beta-catenin-dependent Tcf activation and axis formation*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32871-8.
125. Koonin, E.V., S. Zhou, and J.C. Lucchesi, *The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(21): p. 4229-33.
126. Ryan, D.P. and T. Owen-Hughes, *Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(5): p. 649-56.
127. Caruthers, J.M. and D.B. McKay, *Helicase structure and mechanism*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(1): p. 123-33.
128. Doerks, T., et al., *Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions*. Genome Res, 2002. **12**(1): p. 47-56.
129. Thompson, B.A., et al., *CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): p. 3894-904.
130. Nishiyama, M., et al., *CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 172-82.
131. Katayama, Y., et al., *CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice*. Nature, 2016. **537**(7622): p. 675-679.
132. Durak, O., et al., *Chd8 mediates cortical neurogenesis via transcriptional regulation of cell cycle and Wnt signaling*. Nat Neurosci, 2016. **19**(11): p. 1477-1488.
133. Emanuela Kerschbamer, T.T., Serkan Erdin, Elisa Salviato, Francesca Di Leva, Endre Sebestyén, Michele Arnoldi, Matteo Benelli, James F. Gusella, Silvano Piazza, Francesca Demichelis, Michael E. Talkowski, Francesco Ferrari, Marta Biagioli, *CHD8 Suppression Impacts on Histone H3 Lysine 36 Trimethylation and Alters RNA Alternative Splicing*. BioRxiv, 2020.
134. Kobayashi, M., et al., *Nuclear localization of Duplin, a beta-catenin-binding protein, is essential for its inhibitory activity on the Wnt signaling pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5816-22.
135. Nishiyama, M., et al., *Early embryonic death in mice lacking the beta-catenin-binding protein Duplin*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(19): p. 8386-94.
136. Terriente-Felix, A., et al., *A conserved function of the chromatin ATPase Kismet in the regulation of hedgehog expression*. Dev Biol, 2011. **350**(2): p. 382-92.
137. Bernier, R., et al., *Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development*. Cell, 2014. **158**(2): p. 263-276.
138. Zahir, F., et al., *Novel deletions of 14q11.2 associated with developmental delay, cognitive impairment and similar minor anomalies in three children*. J Med Genet, 2007. **44**(9): p. 556-61.

139. Sugathan, A., et al., *CHD8 regulates neurodevelopmental pathways associated with autism spectrum disorder in neural progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(42): p. E4468-77.
140. Gompers, A.L., et al., *Germline Chd8 haploinsufficiency alters brain development in mouse*. Nat Neurosci, 2017. **20**(8): p. 1062-1073.
141. Platt, R.J., et al., *Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits*. Cell Rep, 2017. **19**(2): p. 335-350.
142. Xu, Q., et al., *Autism-associated CHD8 deficiency impairs axon development and migration of cortical neurons*. Mol Autism, 2018. **9**: p. 65.
143. Zhao, C., et al., *Dual Requirement of CHD8 for Chromatin Landscape Establishment and Histone Methyltransferase Recruitment to Promote CNS Myelination and Repair*. Dev Cell, 2018. **45**(6): p. 753-768 e8.
144. Ballas, N., et al., *REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis*. Cell, 2005. **121**(4): p. 645-657.
145. Brugman, S., *The zebrafish as a model to study intestinal inflammation*. Dev Comp Immunol, 2016. **64**: p. 82-92.
146. van der Flier, L.G. and H. Clevers, *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 241-60.
147. Latorre, R., et al., *Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication*. Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(5): p. 620-30.
148. Kobayashi, N., et al., *The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2345.
149. Wallace, K.N. and M. Pack, *Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish*. Dev Biol, 2003. **255**(1): p. 12-29.
150. Alvers, A.L., et al., *Single continuous lumen formation in the zebrafish gut is mediated by smoothed-dependent tissue remodeling*. Development, 2014. **141**(5): p. 1110-9.
151. Bagnat, M., et al., *Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 954-60.
152. Simoes-Costa, M. and M.E. Bronner, *Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe*. Development, 2015. **142**(2): p. 242-57.
153. Barembaum, M. and M. Bronner-Fraser, *Early steps in neural crest specification*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(6): p. 642-6.
154. Theveneau, E. and R. Mayor, *Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration*. Dev Biol, 2012. **366**(1): p. 34-54.
155. Shi, J., et al., *Snail2 controls mesodermal BMP/Wnt induction of neural crest*. Development, 2011. **138**(15): p. 3135-45.

156. Teng, L., et al., *Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors*. *Development*, 2008. **135**(9): p. 1615-24.
157. Kratochwil, C.F., et al., *Molecular Evolution of the Neural Crest Regulatory Network in Ray-Finned Fish*. *Genome Biol Evol*, 2015. **7**(11): p. 3033-46.
158. Le Douarin, N., *The neural crest*. Developmental and cell biology series. 1982, Cambridge Cambridgeshire ; New York: Cambridge University Press. xi, 259 p.
159. Le Douarin, N.M. and M.A. Teillet, *The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo*. *J Embryol Exp Morphol*, 1973. **30**(1): p. 31-48.
160. Creuzet, S.E., *Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(37): p. 15774-9.
161. Aguiar, D.P., S. Sghari, and S. Creuzet, *The facial neural crest controls fore- and midbrain patterning by regulating Foxg1 expression through Smad1 activity*. *Development*, 2014. **141**(12): p. 2494-505.
162. Hutchins, E.J., et al., *Migration and diversification of the vagal neural crest*. *Dev Biol*, 2018. **444 Suppl 1**: p. S98-S109.
163. Schmitz, B., C. Papan, and J.A. Campos-Ortega, *Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish *Brachydanio rerio**. *Roux Arch Dev Biol*, 1993. **202**(5): p. 250-259.
164. Shepherd, I. and J. Eisen, *Development of the zebrafish enteric nervous system*. *Methods Cell Biol*, 2011. **101**: p. 143-60.
165. Burns, A.J. and N.M. Le Douarin, *Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras*. *Anat Rec*, 2001. **262**(1): p. 16-28.
166. Burns, A.J., J.M. Delalande, and N.M. Le Douarin, *In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation*. *Development*, 2002. **129**(12): p. 2785-96.
167. Heanue, T.A., I.T. Shepherd, and A.J. Burns, *Enteric nervous system development in avian and zebrafish models*. *Dev Biol*, 2016. **417**(2): p. 129-38.
168. Kapur, R.P., C. Yost, and R.D. Palmiter, *A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice*. *Development*, 1992. **116**(1): p. 167-75.
169. Fu, M., et al., *Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study*. *Anat Embryol (Berl)*, 2004. **208**(1): p. 33-41.
170. Jiang, Y., M.T. Liu, and M.D. Gershon, *Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas*. *Dev Biol*, 2003. **258**(2): p. 364-84.

171. Fu, M., et al., *HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts*. Dev Dyn, 2003. **228**(1): p. 1-10.
172. Lake, J.I. and R.O. Heuckeroth, *Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **305**(1): p. G1-24.
173. Olden, T., et al., *Differentiation of the zebrafish enteric nervous system and intestinal smooth muscle*. Genesis, 2008. **46**(9): p. 484-98.
174. Shepherd, I.T., et al., *Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development*. Development, 2004. **131**(1): p. 241-9.
175. Arighi, E., M.G. Borrello, and H. Sariola, *RET tyrosine kinase signaling in development and cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(4-5): p. 441-67.
176. Schuetz, G., et al., *The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells*. J Cell Biol, 2004. **167**(5): p. 945-52.
177. Bondurand, N., S. Dufour, and V. Pingault, *News from the endothelin-3/EDNRB signaling pathway: Role during enteric nervous system development and involvement in neural crest-associated disorders*. Dev Biol, 2018. **444 Suppl 1**: p. S156-S169.
178. Steinhart, Z. and S. Angers, *Wnt signaling in development and tissue homeostasis*. Development, 2018. **145**(11).
179. Chae, W.J. and A.L.M. Bothwell, *Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells*. Trends Immunol, 2018. **39**(10): p. 830-847.
180. Nusse, R., *An ancient cluster of Wnt paralogues*. Trends Genet, 2001. **17**(8): p. 443.
181. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
182. Li, Z., et al., *Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons*. J Neurosci, 2011. **31**(24): p. 8998-9009.
183. Pagan, C., et al., *The serotonin-N-acetylserotonin-melatonin pathway as a biomarker for autism spectrum disorders*. Transl Psychiatry, 2014. **4**: p. e479.
184. Ottenhof, K.W., et al., *TPH2 polymorphisms across the spectrum of psychiatric morbidity: A systematic review and meta-analysis*. Neurosci Biobehav Rev, 2018. **92**: p. 29-42.
185. Sheehan, K., et al., *Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(10): p. 944-9.

186. Toma, C., et al., *Neurotransmitter systems and neurotrophic factors in autism: association study of 37 genes suggests involvement of DDC*. World J Biol Psychiatry, 2013. **14**(7): p. 516-27.
187. McCauley, J.L., et al., *Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2004. **127B**(1): p. 104-12.
188. Adamsen, D., et al., *Autism spectrum disorder associated with low serotonin in CSF and mutations in the SLC29A4 plasma membrane monoamine transporter (PMAT) gene*. Mol Autism, 2014. **5**: p. 43.
189. Orabona, G.M., et al., *HTR1B and HTR2C in autism spectrum disorders in Brazilian families*. Brain Res, 2009. **1250**: p. 14-9.
190. Anderson, B.M., et al., *Examination of association of genes in the serotonin system to autism*. Neurogenetics, 2009. **10**(3): p. 209-16.
191. Rehnstrom, K., et al., *Allelic variants in HTR3C show association with autism*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2009. **150B**(5): p. 741-6.
192. Bischoff, S.C., et al., *Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(3): p. G685-95.
193. Ghia, J.E., et al., *Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1649-60.
194. Li, N., et al., *Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation*. Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 662-71.
195. Spohn, S.N., et al., *Protective Actions of Epithelial 5-Hydroxytryptamine 4 Receptors in Normal and Inflamed Colon*. Gastroenterology, 2016. **151**(5): p. 933-944 e3.
196. Picciotto, M.R., M.J. Higley, and Y.S. Mineur, *Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior*. Neuron, 2012. **76**(1): p. 116-29.
197. Gouder, L., et al., *Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 94.
198. Avazzadeh, S., et al., *Increased Ca(2+) signaling in NRXN1alpha (+/-) neurons derived from ASD induced pluripotent stem cells*. Mol Autism, 2019. **10**: p. 52.
199. Marchetto, M.C., et al., *Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals*. Mol Psychiatry, 2017. **22**(6): p. 820-835.
200. Peca, J., et al., *Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 437-42.

201. Arbogast, T., et al., *Reciprocal Effects on Neurocognitive and Metabolic Phenotypes in Mouse Models of 16p11.2 Deletion and Duplication Syndromes*. PLoS Genet, 2016. **12**(2): p. e1005709.
202. Spence, R., et al., *The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2008. **83**(1): p. 13-34.
203. Aluru, N., *Epigenetic effects of environmental chemicals: insights from zebrafish*. Curr Opin Toxicol, 2017. **6**: p. 26-33.
204. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev Dyn, 1995. **203**(3): p. 253-310.
205. Kim, O.H., et al., *Zebrafish knockout of Down syndrome gene, DYRK1A, shows social impairments relevant to autism*. Mol Autism, 2017. **8**: p. 50.
206. Liu, C.X., et al., *CRISPR/Cas9-induced shank3b mutant zebrafish display autism-like behaviors*. Mol Autism, 2018. **9**: p. 23.
207. Dwivedi, S., et al., *Larval zebrafish model for studying the effects of valproic acid on neurodevelopment: An approach towards modeling autism*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2019. **95**: p. 56-65.
208. Hernandez, P.P., et al., *Single-cell transcriptional analysis reveals ILC-like cells in zebrafish*. Sci Immunol, 2018. **3**(29).
209. Monsoro-Burq, A.H., E. Wang, and R. Harland, *Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during Xenopus neural crest induction*. Dev Cell, 2005. **8**(2): p. 167-78.
210. Zhong, Y., V. Budnik, and C.F. Wu, *Synaptic plasticity in Drosophila memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade*. J Neurosci, 1992. **12**(2): p. 644-51.
211. Zhong, Y. and C.F. Wu, *Neuronal activity and adenylyl cyclase in environment-dependent plasticity of axonal outgrowth in Drosophila*. J Neurosci, 2004. **24**(6): p. 1439-45.
212. Leon-Ponte, M., G.P. Ahern, and P.J. O'Connell, *Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3139-46.
213. Dominguez-Soto, A., et al., *Serotonin drives the acquisition of a profibrotic and anti-inflammatory gene profile through the 5-HT7R-PKA signaling axis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14761.
214. Wachstein, J., et al., *HSP70 enhances immunosuppressive function of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T regulatory cells and cytotoxicity in CD4(+)CD25(-) T cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51747.
215. Niederriter, A.R., et al., *In vivo modeling of the morbid human genome using Danio rerio*. J Vis Exp, 2013(78): p. e50338.

216. Cogne, B., et al., *A dominant vimentin variant causes a rare syndrome with premature aging*. Eur J Hum Genet, 2020.
217. Bolar, N.A., et al., *Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(1): p. 174-87.
218. Mattioli, F., et al., *De Novo Frameshift Variants in the Neuronal Splicing Factor NOVA2 Result in a Common C-Terminal Extension and Cause a Severe Form of Neurodevelopmental Disorder*. Am J Hum Genet, 2020. **106**(4): p. 438-452.
219. Christoffels, A., et al., *Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes*. Mol Biol Evol, 2004. **21**(6): p. 1146-51.
220. Kok, F.O., et al., *Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish*. Dev Cell, 2015. **32**(1): p. 97-108.
221. Eve, A.M., E.S. Place, and J.C. Smith, *Comparison of Zebrafish tmem88a mutant and morpholino knockdown phenotypes*. PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0172227.
222. Rossi, A., et al., *Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns*. Nature, 2015. **524**(7564): p. 230-3.
223. El-Brolosy, M.A., et al., *Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation*. Nature, 2019. **568**(7751): p. 193-197.
224. Ma, Z., et al., *PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components*. Nature, 2019. **568**(7751): p. 259-263.
225. Lee, M.T., et al., *Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition*. Nature, 2013. **503**(7476): p. 360-4.
226. Jiang, L., et al., *Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos*. Cell, 2013. **153**(4): p. 773-84.
227. Lee, M., et al., *Association of Autism Spectrum Disorders and Inflammatory Bowel Disease*. J Autism Dev Disord, 2018. **48**(5): p. 1523-1529.
228. Doshi-Velez, F., et al., *Prevalence of Inflammatory Bowel Disease Among Patients with Autism Spectrum Disorders*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(10): p. 2281-8.
229. Tomova, A., et al., *Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia*. Physiol Behav, 2015. **138**: p. 179-87.
230. Manichanh, C., et al., *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. Gut, 2006. **55**(2): p. 205-11.
231. Pulikkan, J., A. Mazumder, and T. Grace, *Role of the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorders*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1118**: p. 253-269.
232. Vuong, H.E. and E.Y. Hsiao, *Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder*. Biol Psychiatry, 2017. **81**(5): p. 411-423.

233. Lim, J.S., et al., *Modeling environmental risk factors of autism in mice induces IBD-related gut microbial dysbiosis and hyperserotonemia*. Mol Brain, 2017. **10**(1): p. 14.
234. Hsiao, E.Y., et al., *Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1451-63.
235. Kang, D.W., et al., *Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 10.
236. Duffy-Whritenour, J.E. and J.T. Zelikoff, *Relationship between serotonin and the immune system in a teleost model*. Brain Behav Immun, 2008. **22**(2): p. 257-64.

ANNEXES

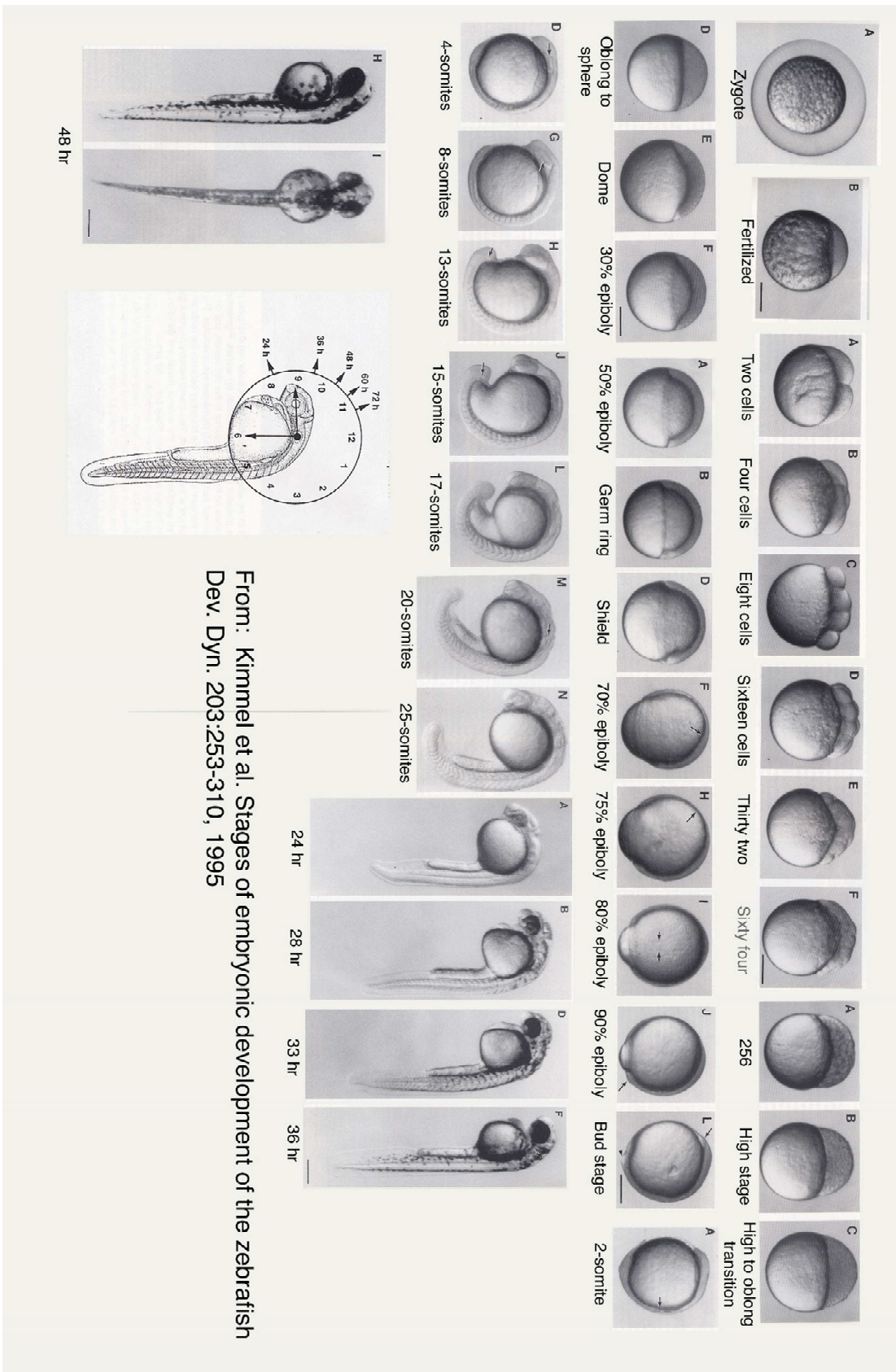
ANNEXE 1 : CRITERES D'ETABLISSEMENT DES SCORES SFARI

Score	Critères
S Syndromic	The syndromic category includes mutations that are associated with a substantial degree of increased risk and consistently linked to additional characteristics not required for an ASD diagnosis. If there is independent evidence implicating a gene in idiopathic ASD, it will be listed as “#S” (e.g., 2S, 3S). If there is no such independent evidence, the gene will be listed simply as “S”.
1 High confidence	Genes in this category are all found on the SPARK gene list, or on the list of genes reported by Satterstrom et al., Cell 180, 1-17 (2020). Each of these genes has been clearly implicated in ASD—typically by the presence of at least three de novo likely-gene-disrupting mutations being reported in the literature—and such mutations identified in the sequencing of the SPARK cohort are typically returned to the participants. Some of these gene meet the most rigorous threshold of genome-wide significance; all at least meet a threshold false discovery rate of < 0.1
2 Strong candidate	Genes with two reported de novo likely-gene-disrupting mutations. A gene uniquely implicated by a genome-wide association study, either reaching genome-wide significance or, if not, consistently replicated and accompanied by evidence that the risk variant has a functional effect.
3 Suggestive evidence	Genes with a single reported de novo likely-gene-disrupting mutation. Evidence from a significant but unreplicated association study, or a series of rare inherited mutations for which there is not a rigorous statistical comparison with controls.

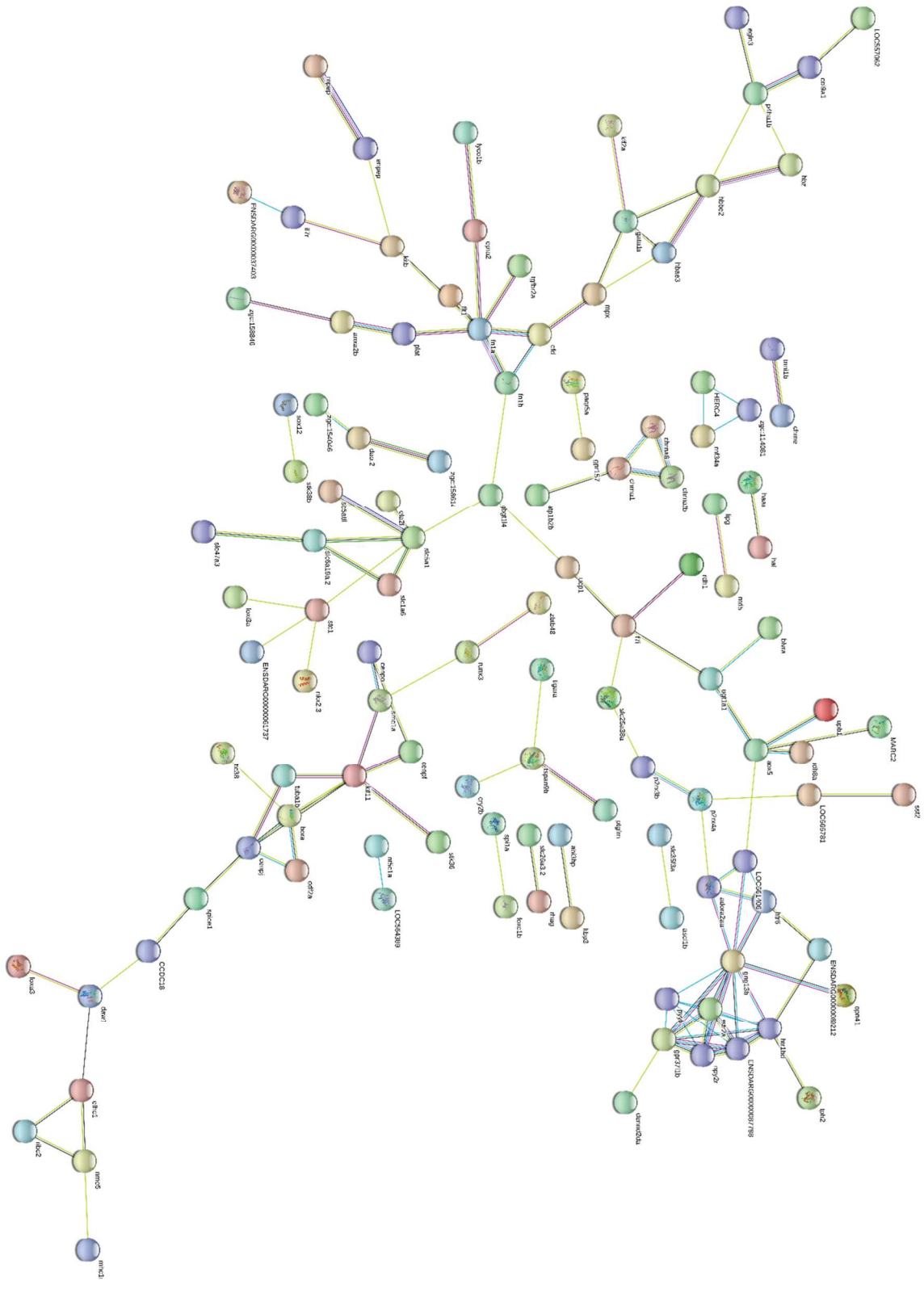
ANNEXE 2 : STADES CARNEGIE DU DEVELOPPEMENT HUMAIN



ANNEXE 3 : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU POISSON-ZEBRE



ANNEXE 4 : RESEAU D'INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE DES GENES DEREGULES CHEZ LES LARVES *chd8^{+/so19827}*



Etude du rôle de *chd8* dans les troubles gastro-intestinaux associés aux Troubles du Spectre Autistique

Résumé

Les patients porteurs d'une mutation dans *CHD8*, gène candidat majeur pour les Troubles du Spectre Autistique (TSA), présentent une macrocéphalie, des troubles gastro-intestinaux et des troubles du sommeil. Nous avons utilisé une lignée mutante stable pour *chd8* et avons observé qu'elle reproduit les phénotypes observés chez les individus porteurs d'une mutation dans *CHD8*. Les larves mutantes présentent une diminution du nombre de neurones entériques, dont nous avons cherché l'origine. Nous avons observé des défauts de prolifération, de migration ou de différenciation des Cellules de la Crête Neurale entériques. De plus, la synthèse de la sérotonine et la signalisation sérotoninergique étaient altérées dans les larves mutantes, ce qui pourrait induire une mauvaise transduction du signal dans les neurones entériques, ainsi qu'une activation de l'inflammation dans l'intestin des larves mutantes.

Mots-clefs : TSA, poisson-zèbre, cellules de la Crête Neurale, *CHD8*

Summary

CHD8 is one of the major candidate genes for autism spectrum disorders (ASD). Individuals carrying a mutation in *CHD8* present with ASD, macrocephaly, gastro-intestinal defects, and sleep disorders. We used a stable zebrafish mutant line for *chd8* to recapitulate the phenotypes displayed by individuals carrying a mutation in *CHD8*. Mutant larvae present with a reduced number of enteric neurons, confirming previous results obtained with a transient knock-down of *chd8* in zebrafish. We then investigated the origin of the reduced number of enteric neurons and we found that migration, proliferation, and differentiation of the enteric Neural Crest Cells were affected in mutant zebrafish larvae. In addition, the serotonin synthesis and signaling pathway was dysregulated in mutant larvae, leading to possible disruption of signal transduction in enteric neurons, and likely driving the activation of inflammation in the gut of mutant larvae.

Keywords: ASD, zebrafish, Neural Crest cells, *CHD8*